



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS - PB

**ANÁLISE DO PERFIL ENZIMÁTICO DA CATALASE EM
PLÂNTULAS DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

DANNIELY ALVES BENÍCIO

Patos – PB

2011

DANNIELY ALVES BENÍCIO

**ANÁLISE DO PERFIL ENZIMÁTICO DA CATALASE EM
PLÂNTULAS DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Unidade Acadêmica de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Campina Grande - Campus Patos, como
requisito para o título de graduada em
Licenciatura em Ciências Biológicas.

PROF. DR. CARLOS EDUARDO ALVES SOARES
ORIENTADOR

Patos- PB

2011

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

B467a

2011

Benício, Danniely Alves

Análise do perfil enzimático da catalase em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan sob condições de estresse oxidativo / Danniely Alves Benício. - Patos - PB: UFCG/UACB, 2011.

47f. : il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador (a): Carlos Eduardo Alves Soares.

(Graduação em Licenciatura em Biologia). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 - Enzimas antioxidantes – Monografia. 2 – Defesa vegetal. 3 – Atividades enzimáticas. 4 – Estresse oxidativo. I – Título.

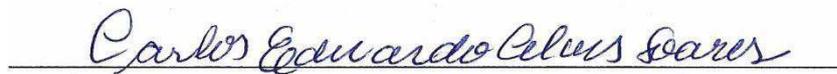
CDU:577.15

DANNIELY ALVES BENÍCIO

**ANÁLISE DO PERFIL ENZIMÁTICO DA CATALASE EM
PLÂNTULAS DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Aprovado em: 16/06/2011

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. CARLOS EDUARDO ALVES SOARES (CSTR/UACB)

Orientador



Profa. Dra. MARIA DO CARMO LEARTH CUNHA (CSTR/UAEF)

1º Examinador



Profa. Dra. MÁRCIA ALMEIDA DE MELO (CSTR/UAMV)

2º Examinadora

Aos meus pais
Francisco e Jusinete

DEDICO

As minhas irmãs
Kaliane, Mabel e Janaína
Ao meu namorado
Ubiratan

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda a força naquele momento que parecia impossível, pela vitória de mais um sonho concretizado.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves Soares pela brilhante orientação e condução dos trabalhos realizados, não medindo esforços para que tudo fosse realizado.

A Prof^a. Dra Maria do Carmo Learth Cunha por ter nos cedido o Laboratório de Sementes e a Sheyla por toda a paciência dos seus ensinamentos.

A Prof^a. Dra Márcia de Almeida Melo pela grande contribuição em nos propiciar o uso do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Semiárido para a realização dos trabalhos e toda sua equipe, em especial Tereza, Danielle e Aline.

A Prof^a Rosália Severo de Medeiros e ao Prof. Dr. Diércules Rodrigues dos Santos pelas atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia.

A Prof^a Dra Maria das Graças Veloso Marinho por toda simplicidade e apreço, pela força e motivação.

A equipe do Laboratório de Glicobiologia Celular, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, na pessoa do Prof. Dr. João Paulo de Matos S. Lima e dos alunos, Taffarel, Ivanice, Érika, Gabriela, João Filipe, pelos ensinamentos adquiridos no estágio.

A Gisela pela ajuda e colaboração essenciais para a realização dos trabalhos.

As minhas amigas e companheiras de curso Jaiana, Carla e Tássia pela ajuda e tantas partilhas realizadas.

Á minha família, em especial meus pais, pelos ensinamentos e exemplos de vida, pela força e por acreditarem que tudo isso fosse ser um dia realizado. As minhas irmãs por fazerem parte da minha vida, por todo o apoio e incentivo.

Ao meu namorado Ubiratan Borges, por acreditar em meu potencial e me apoiar em todos os momentos difíceis, com sua alegria e companheirismo.

A minha amiga Catarinne Xavier, pelas partilhas, fazendo com que as dificuldades virassem simples etapas a serem vencidas.

A toda a turma de Ciências Biológicas 2006.2, serão inesquecíveis todos os momentos juntos.

Ao Curso de Ciências Biológicas, a todos os professores que dele fazem parte, por todo o esforço em sempre querer realizar o melhor.

A Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, por ser a fonte de mais uma etapa realizada na minha vida.

*"Não se pode falar de educação sem amor."
(Paulo Freire)*

ANÁLISE DO PERFIL ENZIMÁTICO DA CATALASE EM PLÂNTULAS DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE OXIDATIVO

BENÍCIO, D. A, SOARES, C. E. A¹

¹Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura). (dannybenicio@gmail.com, ceduardoas@yahoo.com.br).

RESUMO:

Diante de condições adversas do ambiente, as plantas sofrem uma série de estresses proporcionados por diversos fatores, bióticos e abióticos. Por meio de tais situações, mecanismos de defesa são gerados, de forma a ordenar a homeostase celular. Um exemplo de estresse sofrido pelas plantas é o estresse oxidativo, que produz substâncias conhecidas como EROs, espécies reativas de oxigênio. Nessa situação, moléculas com função de defesa são ativadas, as enzimas antioxidantes. Uma dessas enzimas, a catalase, tem a função de degradar o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. O presente estudo tem como objetivo analisar o efeito do peróxido de hidrogênio em plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan germinadas dois diferentes substratos, papel Germitest® e areia estéril. A atividade enzimática da catalase em plantas submetidas a soluções de peróxido nas concentrações de 0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,50 mM, 10,0 mM foi medida. Igualmente os teores de proteínas totais solúveis em tecidos foliares foram quantificados. Como resultados, a porcentagem de germinação no papel obteve um valor estatisticamente superior (Teste pareado de t, $p < 0,05$) ao da areia, 91,68% e 76,50%, respectivamente. A perda de água durante o período de estresse para todos os tratamentos foi superior decorrido o tempo de 48 horas. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na quantificação de proteínas extraídas de plântulas germinadas nos dois sistemas (areia e papel, ANOVA, $p > 0,05$). O perfil eletroforético das proteínas extraídas de plântulas crescidas em areia mostrou a presença de bandas exclusivas nas concentrações 2,5 e 5,0 mM. A atividade de catalase, para os tratamentos mencionados anteriormente, foi alta quando comparada ao grupo controle e maior para o tratamento com a concentração de 5,0 mM. Isso pode ser devido a maior expressão protéica nessas situações. Para as plântulas germinadas em papel, não foi possível quantificar a atividade da catalase em todos os tratamentos e nos dois intervalos de tempo. Conclui-se que a concentração de 5,0 mM utilizada em plântulas crescidas em

areia induziu maior atividade da catalase. Nesse substrato o padrão de bandas no perfil eletroforético foi específico e provavelmente proteínas relacionadas ao estresse oxidativo foram super expressadas. Por fim, a germinação de *A. colubrina* no sistema que utilizou areia estéril é sugerida como a mais eficaz para estudos de defesa vegetal.

Palavras-chave: defesa vegetal, estresse oxidativo, atividade enzimática, SDS - PAGE

**ANALYSIS OF THE ENZYMATIC PROFILE OF CATALASE IN *Anadenanthera colubrina* (Vell.)
Brenan SEEDLINGS UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS**

BENÍCIO, D. A¹ , SOARES, C. E. A¹

¹Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura). (dannibenicio@gmail.com, ceduardoas@yahoo.com.br).

ABSTRACT:

On the adverse environmental conditions, plants suffer different kinds of stress promoted by various factors, biotic and abiotic. By the way, these situations discharge plant defense mechanisms to keep the cell homeostasis. An example of stress suffered by the plants is oxidative stress that produces certain compounds named ROS, reactive oxygen species. On this situation, defense molecules are activated such as antioxidant enzymes. One of them is catalase, which has the function to degradate the oxygen peroxide in water and oxygen. The aim of this work was evaluate the effect of oxygen peroxide in seedlings of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan grown in two different substrates, Germitest® paper and sterile sand. The activity of the catalase enzyme in challenged plants with peroxide solutions in 0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM, 7.50 mM, 10.0 mM was measured. Equally the soluble protein concentration in leave tissue was determined. In the system based on paper grown, the percentual of grown (91.68%) was higher than the sand system-based (76.50%). Statistical differences were observed between sand system and paper one (t paired test, $p < 0,05$). The water lost during the stress period for all treatments was high, after 48 hours. No statistical differences were observed for the concentration of extracted proteins for both systems (sand and paper, ANOVA, $p > 0,05$). The SDS-PAGE for seedlings grown in sand showed specific bands at the concentrations of 2.5 and 5.0 mM. The catalase activity for the treatments mentioned increased in comparison with the control group and the highest activity was observed for 5.0 mM concentration. In conclusion, 5.0mM concentration for seedlings grown in sterile sand induced catalase activity increased. For this treatment specific bands were observed in SDS-PAGE, probably proteins related to oxidative stress. Finally, we could suggest the sand system as appropriate to studying defense plant.

Keywords: plant defense, oxidative stress, enzymatic activity, SDS-PAGE

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da porcentagem de germinação seguidos do tamanho médio de plântulas nos substratos rolam de papel e entre areia	34
Tabela 2. Quantificação de proteínas (em $\mu\text{g/mL}$) pelo método de Bradford extraídas de plântulas crescidas no substrato papel	39
Tabela 3. Quantificação de proteínas (em $\mu\text{g/mL}$) pelo método de Bradford extraídas de plântulas crescidas no substrato areia	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentrações utilizadas de peróxido de hidrogênio para indução do estresse oxidante	31
Figura 2. Folhas maceradas com nitrogênio líquido em almofariz	32
Figura 3. Aspecto visual de plântulas normais de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan nos substratos RP(A) e EA (B)	35
Figura 4. Porcentagem de perda de água pelo sistema no intervalo de 24 e 48 horas durante o estresse oxidativo no substrato papel	36
Figura 5. Porcentagem de perda de água pelo sistema no intervalo de 24 e 48 horas durante o estresse oxidativo no substrato papel	36
Figura 6. Análise visual das plântulas submetidas aos tratamentos com peróxido de hidrogênio no substrato papel. A: Controle; B: 2,5 mM; C: 5,0 mM; D: 7,5 mM; E: 10 mM no tempo de 0, 24 e 48 horas de estresse respectivamente	37
Figura 7. Análise visual das plântulas submetidas aos tratamentos com peróxido de hidrogênio no substrato areia. A: Tratamentos no tempo inicial (0 hora); B: Tratamentos após 24 horas; C: Tratamentos após 48 horas	38
Figura 8. Perfil protéico obtido da extração enzimática de <i>A. colubrina</i> , em gel poliacrilamida em diferentes concentrações de estresse oxidativo com o H ₂ O ₂ , germinadas no substrato papel	40
Figura 9. Perfil protéico obtido da extração enzimática de <i>A. colubrina</i> , em gel poliacrilamida em diferentes concentrações de estresse oxidativo com o H ₂ O ₂ , germinadas no substrato areia.	41
Figura 10. Atividade de Catalase em tecidos foliares de plântulas de <i>A. colubrina</i> no substrato papel em diferentes concentrações de H ₂ O ₂	42
Figura 11. Atividade de Catalase em tecidos foliares de plântulas de <i>A. colubrina</i> no substrato areia em diferentes concentrações de H ₂ O ₂	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
O ₂ •-	Superóxido
•OH	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
SOD	Superóxido dismutase
APX	Ascorbato peroxidase
GR	Glutanona redutase
O ₂	Oxigênio
H ₂ O	Água
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
HCL	Ácido clorídrico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
MF	Massa fresca
kDa	Kilo Dalton

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 O Semiárido e o Bioma Caatinga	17
2.2 Caracterização da Família Fabaceae (Leguminosae) e o Modelo Vegetal <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	18
2.3 O Metabolismo inicial das plantas	20
2.4 O Estresse Oxidativo	21
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material vegetal	30
3.2 Germinação das sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	30
3.3 Condições experimentais de estresse oxidativo	31
3.4 Obtenção do extrato foliar	32
3.5 Determinação da Quantificação de proteínas totais	32
3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
3.7 Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	33
3.8 Delineamento experimental e análise estatística	33
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Germinação das sementes de <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	34
4.2 Aspectos Visuais de plântulas submetidas ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	37
4.2.1 Substrato Papel	37

4.2.2 Substrato Areia	38
4.3 Quantificação de Proteínas totais	39
4.4 Perfil eletroforético de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
4.5 Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	41
5. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Semiárido brasileiro é caracterizado por frequentes períodos de seca que podem ser delimitadas tanto pela ausência, como por alta variabilidade espacial e temporal das chuvas. Diante desta realidade, as chuvas são importantes fontes de água para consumo humano, agricultura, produção de alimentos, eliminação de resíduos e manutenção dos ecossistemas naturais no Nordeste Semiárido (SANTOS et al., 2009). As características dessa região semiárida condicionam fortemente a população local a sobreviver principalmente de atividades econômicas ligadas basicamente à agricultura e a pecuária.

O bioma Caatinga ocupa a maior parte do semiárido, sendo restrito ao território brasileiro. Sua vegetação é constituída de espécies lenhosas, herbáceas, cactáceas e bromeliáceas (ROCHA et al., 2007). Apresenta fauna e flora únicas, formada por rica biodiversidade, com grande número de espécies e também remanescentes de vegetação ainda preservada, que incluem táxons raros e endêmicos (GIULIETTI et al., ROCHA et al., 2007).

O crescimento e o desenvolvimento normal de uma planta são muitas vezes afetados por condições ambientais ditas desfavoráveis, como condições extremas de temperatura, excesso de água, alta radiação solar, excesso de salinidade no solo, presença de substâncias tóxicas (SMILLIE; HETHERINGTON, 1983). À medida que o estresse é imposto, o mecanismo de defesa das plantas é ativado, de forma a contornar tal situação de injúria e desequilíbrio.

Apesar de espécies de plantas variarem sua sensibilidade e resposta ao estresse, todas elas têm a capacidade de percepção, sinalização e resposta mediante a situação desfavorável ao seu equilíbrio (BOHNERT et al., 1995). O sistema de defesa antioxidante das plantas é formado pelas enzimas antioxidantes, tendo estas funções de diminuir os danos oxidativos causados pelas EROs (espécies reativas de oxigênio), que são produzidas normalmente no metabolismo ou induzidas por estresses (ARORA; et al., 2002).

A medição visual é um método disponível para medir o estado de estresse atual na planta, onde muitas vezes são manifestações tardias de lesão tecidual. No

entanto a quantificação do efeito causado pelo estresse pode ser realizada através de análises bioquímicas, de forma a analisar mais detalhadamente as moléculas que agem diretamente no controle e no equilíbrio do sistema antioxidante (SMILLIE; HETHERINGTON, 1983).

Nesse contexto o estudo do perfil bioquímico avaliado pelo estresse oxidativo na espécie angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) é de suma importância pois esta espécie nativa do semiárido tem grandes utilidades e potenciais e o estudo de suas formas de defesa frente a tais estresses possibilitará uma maneira de compreender a importância do papel bioquímico nas plantas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Semiárido e o Bioma Caatinga

O Semiárido brasileiro é delimitado por uma extensão de 1.037.000 Km², pois com a inclusão do Norte de Minas, hoje ele ocupa uma área que corresponde a 12% do território nacional e 70% do Nordeste, onde nessas áreas habitam 12% da população brasileira e 63% da nordestina (MALVEZZI, 2007). Essa área abrange o norte dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, os Sertões da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e uma parte do sudeste do Maranhão (ABRANTES, 2011). Segundo o mesmo autor, é uma região com características bastante peculiares, que merecem ser destacadas para melhor compreensão da dinâmica de produção nessa região. Podemos destacar como característica peculiar aspectos como o índice pluviométrico, pouco significativo nessa área; as chuvas são mal distribuídas, física e temporalmente, o que torna complexa a produção agrícola.

Ao relatar a importância da região semiárida brasileira e suas particularidades, é de grande relevância inserir nesse contexto os biomas que o compõem, onde podemos definir um bioma como as comunidades biológicas constituídas pelos seres vivos de uma determinada região, cuja vegetação é similar e contínua, onde o clima é mais ou menos uniforme. No Nordeste brasileiro, onde está localizada a maior parte da região semiárida do país, a cobertura vegetal predominante é a Caatinga, com plantas adaptadas às condições de deficiência hídrica (TROVÃO et al., 2009).

O bioma Caatinga é o único com ocorrência restrita ao território nacional (SOUSA, 2008). Apresenta características como floresta baixa e espinhosa, dominada por arbustos e árvores de pequeno porte que perdem sua folhagem na época da estação seca, com a precipitação média situada em torno de 650 mm anuais (ARAUJO FILHO, 1990).

Como reporta Pareyn (2010) a vegetação da Caatinga desempenhou papel importante na agropecuária tradicional como restaurador da fertilidade de solo e como suporte forrageiro para a criação extensiva de ovinos, bovinos e caprinos. Com isso, nada melhor que atribuir à estreita relação existente na região entre os

produtores rurais e seu ambiente através do vasto conhecimento e uso tradicional de um elenco significativo de espécies nativas na região, destacando-se as leguminosas de grande importância econômica na agricultura (GIULIETTI et al., 2004). Outras formas de importância econômica são as espécies forrageiras, apícolas, frutíferas, medicinais, oleaginosas, ornamentais e produtoras de fibra (MACIEL; SILVA).

A região semiárida é caracterizada pelo alto índice de evaporação da água, em função da intensidade de energia solar e altas temperaturas. O uso dos recursos naturais do semiárido produz consequências drásticas na diversidade potencial, como podemos citar o corte raso da Caatinga hiperxerófito, para atender a demanda de lenha; os cortes seletivos; supressão para uso agrícola; queima para limpeza da área; predação de espécies vegetais pela pecuária (caprinos e bovinos) (COSTA et al., 2009).

Brasileiro (2009) é bem expressivo ao relatar que um dos motivos do aceleramento dos impactos ambientais na região semiárida do Nordeste está relacionado ao crescente processo de desertificação e das áreas suscetíveis à desertificação encontradas nessa região, onde a prática indevida de atividades para fins lucrativos é o grande alvo das atividades exploradas. O bioma Caatinga é considerado o menos protegido dentre os biomas brasileiros, com menos de 2% de sua área estando sob a forma de unidades de proteção integral, pois com as restrições das condições climáticas próprias desse bioma, o impacto da atividade humana aumenta os níveis de degradação (SANTANA et al., 2009).

2.2 Caracterização da Família Fabaceae e o Modelo Vegetal *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

A família Fabaceae inclui aproximadamente 650 gêneros de árvores, arbustos, ervas e trepadeiras, representada por cerca de 16 a 19 mil espécies, sendo assim uma das maiores famílias das Angiospermas e umas das principais sob o ponto de vista econômico, onde no Brasil, ocorrem cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies (ALLEN; ALLEN, 1981; JAIWAL; SINGH, 2003; LHAMAS, 2003; SOUZA; LORENZI, 2008). Existem muitas espécies xerófitas, plantas adaptadas a viver em clima seco, e que desenvolvem diversos mecanismos de adaptação, como caule e

raízes que armazenam água, folhas reduzidas com uma cobertura de cera para diminuir a evaporação.

A família Fabaceae é subdividida em três subfamílias, com base na morfologia da flor, segundo Lhamas (2003), em: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Tem como característica a presença de frutos em forma de vagem (embora haja exceções) e englobam desde espécies arbóreas até espécies herbáceas anuais, muitas de grande importância econômica e principalmente alimentar (soja, feijão, entre outras) (CARVALHO; GAIAD, 2011). Apesar de apresentar larga variedade de formas, a família das leguminosas é facilmente reconhecida pelo seu fruto ou legume. O tipo básico do fruto é uma vagem com duas valvas que abre e retorce para expelir as sementes (SOUSA, 2008).

A subfamília Mimosoideae inclui 40 gêneros, onde a maior parte são árvores e arbustos. As folhas são bipinadas, alternadas e compostas. As flores são bissexuais e radialmente simétricas, com a presença de pétalas e sépalas geralmente pequenas e bem escondidas pelos estames (ALLEN; ALLEN, 1981).

O angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) é uma espécie pertencente à família Fabaceae, podendo atingir 20 metros de altura, com tronco de 40 a 60 centímetros de diâmetro. É uma espécie de ampla distribuição na vegetação das caatingas. Habita a Mata Atlântica, o Cerrado, o Pantanal Mato Grossense, ocorrendo do Maranhão até São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Na região Nordeste, ocorre nos solos de origem sedimentar, principalmente areníticos, calcários e aluviais (MAIA, 2004; LORENZI, 2002).

Como utilidades da espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan podemos citar o potencial madeireiro (MAIA, 2004; SOUZA; LORENZI, 2008), assim como para produção de carvão, cercas e estacas. Na medicina caseira é utilizada a casca, resina, flores e folhas. O poder medicinal da casca é obtido por meios de infusão, xarope, maceração e tintura com ações hemostáticas, depurativas, adstringentes, peitorais e antigripais (MAIA, 2004). É própria para arborização de parques e praças, pois revela seu poder ornamental, pois floresce exuberantemente todos os anos bem como é utilizada para reflorestamentos de áreas degradadas de preservação permanente. A casca e as sementes são ricas em tanino, sendo empregadas no setor industrial para curtir couros (LORENZI, 2002).

2.3 O Metabolismo inicial das plantas

As sementes representam uma etapa única no processo reprodutivo das plantas, onde desenvolvem um crescente estado metabólico, com fenômenos indispensáveis para seu crescimento e sobrevivência. No início da germinação das sementes, as estruturas internas das células são reorganizadas e muitas atividades metabólicas são realizadas, visando uma germinação de sucesso (BLACK; BRADFORD; RAMOS, 1999).

Sob o ângulo fisio-bioquímico, as sementes passam por fases do processo germinativo, que compreendem a reidratação (embebição), aumento da respiração, formação de enzimas, digestão enzimática das reservas, mobilização e transporte de reservas, assimilação metabólica, crescimento e diferenciação dos tecidos (POPIGINIS, 1977).

A germinação é uma sequência ordenada de atividades metabólicas, que resulta na formação de uma plântula, é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais da maturação (BEWLEY; BLACK, 1994; POPIGINIS, 1977); envolve a embebição de água, um rápido aumento da frequência da atividade respiratória, a mobilização das reservas de nutrientes e o início do crescimento do embrião (FENNER; THOMPSON, 2005). O processo de germinação está completo quando a nutrição não mais depende dos materiais de reserva e ao mesmo tempo realiza autotrofia, que é a primeira condição para a plântula se estabelecer (LARCHER, 2004).

O estágio de plântula é um período bastante sensível, pois é quando ocorre um abastecimento de nutrientes, indispensáveis para prover o aumento de energia e metabólitos utilizados na biossíntese e manter o estado de hidratação. Neste período ocorre o rápido crescimento em extensão e diferenciação da parede celular (LARCHER, 2004).

Embora as plantas absorvam somente substâncias inorgânicas, muitas vezes elas não são absorvidas nas proporções ideais. Assim substâncias inúteis, ou absorvidas em excesso precisam ser eliminadas (OLIVEIRA, 2003). Submetida ao estresse, a planta desenvolve mecanismos que tem a função ajustar qualquer anormalidade presente em seu meio, contribuindo para entender como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

2.4 O Estresse Oxidativo

O estresse é definido como um fator externo, que exerce influência desvantajosa sobre a planta (TAIZ; ZEIGER, 2009). As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses, de forma a propiciar predisposição a danos e reduções nos rendimentos (SMILLIE; HETHERINGTON, 1983).

Um das funções mais importantes das células vegetais é a sua capacidade de responder a flutuações no seu ambiente. Através da modulação de respostas, a planta produz mudanças na constituição de compostos moleculares para gerar mecanismos de defesa e proteção; durante sua evolução esses mecanismos são gerados e aperfeiçoados, com o propósito de reconhecer tais danos (GRENE, 2002; SOARES; MACHADO, 2007; SHEWRY; LUCAS, 1997). A presença de estresses bióticos e/ou abióticos produz uma série de consequências as plantas. A alteração no padrão de expressão de proteínas, desencadeando inibição e/ou a indução da biossíntese de determinados constituintes protéicos (LIMA, 2003).

Os organismos aeróbios apresentam vantagens energéticas bem significativas utilizando o oxigênio molecular como um oxidante terminal na respiração (VAN BREUSEGEM et al., 2001). No entanto a sua presença no meio celular é um alerta oxidativo constante, pela produção de espécies ativas de oxigênio, designadas como espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), os radicais hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são produzidas continuamente pelo metabolismo vegetal (GRENE, 2002; PEIXOTO et al.; 1999), formadas durante funções metabólicas normais nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (ÉAUX, 2007; FOYER; NOCTOR, 2005; SOARES; MACHADO, 2007).

No caso da produção de EROs induzida por flutuações no ambiente aos quais as plantas estão constantemente expostas, o metabolismo primário e secundário induz respostas para ajustar o desequilíbrio (FOYER; NOCTOR, 2005). Como agentes externos que influenciam na concentração de EROs no metabolismo da planta estão a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, metais pesados, altas concentrações de sais, poluição ambiental, entre outros (MALLICK ; RAÍ, 1999).

O nível e o tipo das EROs são fatores determinantes para o tipo de resposta, pois em baixas concentrações induzem a genes de defesa e resposta adaptativa, já em níveis mais altos podem levar a planta a estresses (SOARES; MACHADO, 2007). Elevadas concentrações induzem à expressão de genes cujos produtos exibem atividade antioxidante (LIMA, 2003; MOLDES, 2006), as chamadas enzimas antioxidantes que atuam na destruição das EROs, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), o ascorbato peroxidase (APX) e a glutathione redutase (GR) (DEUNER et. al., 2008; SOARES; MACHADO, 2007). Em muitos casos, o funcionamento deste sistema de defesa induz uma maneira adaptativa, de maneira que as plantas são capazes de tolerar tais estresses, evitando que afete o crescimento normal e o funcionamento fisiológico das rotas de óxido-redução (CARRILO; VALE, SD).

O peróxido de hidrogênio, tóxico para as células, pode ser facilmente difundido através das membranas das organelas celulares (BAKER; GRAHAM, 2002), e precisa ser transformado em constituinte químico que não seja prejudicial à planta, e manter o equilíbrio dos organismos aeróbios. A catalase, localizada principalmente nos peroxissomos, é uma das enzimas envolvidas na remoção das EROs, que converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular (O_2) (FRUGOLI et al., 1996).

Reações bioquímicas e fisiológicas a estressores podem ser monitoradas através de alterações da atividade das enzimas antioxidantes (SOARES; MACHADO, 2007). Ao desenvolver técnicas de cultivo que possibilitem o estudo da atividade das enzimas, há contribuição para a compreensão dos mecanismos de defesa das plantas e o meio o qual estão inseridas (PIZA; LIMA; BRASIL, 2003). Marcadores bioquímicos podem auxiliar na identificação precoce de processos morfogênicos durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas, bem como são indispensáveis em atividades como a germinação, crescimento, fotossíntese e formação de substâncias de reserva (SOUZA; PEIXOTO; TOLEDO, 2004).

3. REFERENCIAS

ABRANTES, M. G. **Tecendo reflexões sobre a pequena produção do semi-árido brasileiro**. Disponível em <<http://www.webartigos.com/articles/58277/1/TECENDO-REFLEXOES-SOBRE-A-PEQUENA-PRODUCAO-DO-SEMI-ARIDOBRASILEIRO>>. Acesso: 09 de mai de 2011.

ALLEN, O. N & ALLEN, E. K. **The Leguminosae: A Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation**. Univ. of Wisconsin Press, 812p, 1981.

ARAUJO FILHO, J. A. **Manipulação da Vegetação lenhosa da Caatinga para fins pastoris**. Embrapa, Circular Técnica 11, p.3, 1990.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v.82, n. 10, p.1227-1238, 2002.

BAKER, A.; GRAHAM, I. A. **Plant peroxisomes: biochemistry, cell biology, and biotechnological applications**. Springer, 2002, 505p.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BLACK, M.; BRADFORD, K. J.; RAMOS, J. V.; **Seed Biology: Advances and applications**. Capi publishing, 1999. 529p.

BOHNERT, H. J.; NELSON, A. E.; JENSENAYB, R. G. Adaptations to Environmental Stresses. **The Plant Cell**, V.7, p.1099-1111, 1995.

BRASILEIRO, R. S. Alternativas de desenvolvimento sustentável no semiárido nordestino: da degradação à conservação. **Scientia Plena**, v.5, n.5, 2009.

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. **El Lado Oscuro del Oxígeno**. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina. p.1-12.

CARVALHO P. E. R.; GAIAD S. Espécies Arbóreas Brasileiras. **Agência de Informação Embrapa**. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras>. Acesso: 08 de mai de 2011.

COSTA, T. C. C. DA., ACCIOLY, L. J. DE. O., OLIVEIRA, M. A. J. DE., OLIVEIRA, L. M. T., GUIMARAES, D. P. Áreas para conservação no bioma Caatinga por meio da análise de fatores biofísicos e antrópicos com a diversidade florística. In: XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. **Anais**. Natal, p. 5159-5167, 2009.

DEUNER, S.; ALVES, J. D.; FRIES, D. D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; HENRIQUE, P. DE. C.; GOULART, P. DE. F. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, n.2, p. 135-140, 2008.

ÉAUX, B; TOLEDANO, M.B. Ros as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.8, p.813-824,2007.

FENNER, M.; THOMPSON, K. **The Ecology of Seeds**. Cambridge, 2005, 261p.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v.17, p.1866-1875, 2005.

FRUGOLLI, J. A.; ZHONG, H. H.; NUCCIO, M. L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; MCCLUNG, C. B. Catalase is Encoded by a Multigene Family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiol**. V.112, n.1, p.327-336, 2006.

GIULIETTI, A. M.; NETA, A. L. DU. B.; CASTRO, A. A. J. F.; ROJAS, C. F. L. G.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P. DE.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. DE. J. N.; BARBOSA, M. R. DE. V.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do Bioma Caatinga**. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18267/1/Biodiversidade_Caatinga_parte2.pdf>. Acesso :12 de mai de 2011.

GRENE, R. **Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants**. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, 2002, p.1-20.

JAIWAL, P.K & SINGH, R. P. **Improvement Strategies of Leguminosae Biotechnology**. Kluwer Academic Publishers, 411p, 2003.

LARCHER, W.; **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, RiMa, 2004, 531p.

LHAMAS, K. A. **Tropical Flowering Plants: A Guide to Identification and Cultivation**. Timber Press. Cambridge, 2003, 423p.

LIMA, J. S. Processos biológicos e biomonitoramento: Aspectos bioquímicos e biológicos. In: **Indicadores Ambientais: Conceitos e Aplicações**. Maia et al., organizadores. Univ. Pontifica de Comillas, 2003, 285p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v.1, 4º ed. 384p, 2002.

MACIEL, G. K. F.; SILVA, F. M. DA. Uso Sustentável da Caatinga: Guia prático para um manejo mais sustentável da Caatinga. **Associação Caatinga**, p.1-16.

MAIA, G. N., **Caatinga**: árvores e arbustos e suas utilidades. 1ª ed. São Paulo, Computação Gráfica e Editora, 2004, 413p.

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidant systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to the copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 146-149, 1999.

MALVEZZI, R. **Semi-árido**: Uma visão holística. Brasília. 140p, 2007.

MOLDES, C. **A. resposta de enzimas antioxidantes à aplicação de herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2006, 193p. (Tese- Doutorado em Ecologia Aplicada).

OLIVEIRA, E. C. DE. **Introdução à Biologia Vegetal**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2ª ed. 2003, 272p.

PAREYN, F. G. C. A importância da produção não-madeireira na Caatinga. In: **Uso Sustentável e Conservação dos Recursos Florestais da Caatinga**. Gariglio et al., organizadores. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, p.131-140, 2010.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT’ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999.

PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Rev.Bras.Agrociência**, v.9, n.4, p.361-366, 2003.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. Brasília, AGIPLAN, 1977. 75p.

ROCHA, W. F.; SILVA, A. DE. B.; NOLASCO, M. C.; LOBÃO, J.; BRITTO, D.; CHAVES, J. M.; ROCHA, C. C. Levantamento da cobertura vegetal e do uso do solo do Bioma Caatinga. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. **Anais**. Florianópolis, p. 2629-2636, 2007.

SANTANA, J. A. DA. SILVA.; PIMENTA, A. S.; SOUTO, J. S.; ALMEIDA, F. V. DE.; PACHECO, M. V. Levantamento florístico e associação de espécies na caatinga da estação ecológica do Seridó, Serra Negra do Norte- RN – Brasil. **Revista Verde**, v.4, n.4, p.83-89, 2009.

SANTOS, M. J. DO.; ARAUJO, L. E.; OLIVEIRA, E. M. Seca, precipitação e captação de água de chuva no semi-árido de Sergipe. **Engenharia Ambiental**. Espírito Santo do Pinhal, v.6, n.1, p. 55-73, 2009.

SHEWRY, P.R.; LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Botanical Research Incorporating**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SMLLIE, R. M.; HETHERINGTON, S. E. Stress Tolerance and Stress-induced injury in Crop Plants measured by chlorophyll fluorescence in vivo. **Plant Physiology**, v.72, p.1043-1050, 1983.

SOARES, A. M. DO.S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**. V.1, n. 1, p. 9-19, 2007.

SOUSA, J. V. DE. **Desenvolvimento inicial de Leguminosas arbóreas nativas em várzea sob diferentes condições de drenagem na regeneração de matas ciliares**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008, p.89. (Dissertação- Mestrado em agricultura tropical e subtropical).

SOUZA, J. S. I.; PEIXOTO, A.M.; TOLEDO, F.F. DE. **Encicoplédia Agrícola Brasileira: E-H**. EDUSP, 2004, 511p.

SOUSA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008, p.704.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Artmed Editora, São Paulo. 2009, 819p.

TROVÃO, D. M.DE B. M., SOUZA, B. C. DE., CARVALHO, E. C. D. DE., OLIVEIRA, P.T.B., FERREIRA, L. M.R., Espécies vegetais da Caatinga associadas às Comunidades de abelhas (Hymenoptera:Apoidea:Apiformis). **Revista Caatinga**. v.22, n.3, p.136-143, 2009.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, n. 3, 2001, p.405-414.

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO

Um dos fatores para o desenvolvimento de uma planta é o meio onde ela está inserida. Fatores externos e internos desencadeiam processos que influenciam o desenvolvimento vegetal. Um dos fatores externos que merece destaque é o estresse. Os estudos sobre estresses impostos durante o desenvolvimento das plantas revelam a importância da compreensão dos mecanismos de defesa vegetal.

Dependendo da natureza do agente causador, o estresse pode ser biótico ou abiótico. Um tipo de estresse que desperta interesse dos fisiologistas vegetais é o estresse oxidativo que pode ser abiótico e causado por fatores diversos tais como: alta irradiação, seca, deficiência mineral, baixa ou altas temperaturas; biótico, é causado por infecções fúngicas, bacterianas, virais e xenobióticos, por herbicidas, contaminantes atmosféricos e metais pesados (CARRILLO; VALE, 2005).

A exposição das plantas aos fatores ambientais diversos pode alterar a homeostase celular e com isso aumentar a produção de diversas espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), os radicais hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FOYER; NOCTOR, 2005).

Segundo Deuner et al., (2008) com o estresse oxidativo, a biossíntese de componentes antioxidantes é ativada, ocorrendo aumento da expressão das enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a ascorbato peroxidase (APX). Estas têm papel fundamental na proteção das células vegetais contra os danos oxidativos, como a ação da catalase no metabolismo vegetal, agindo na conversão do H_2O_2 em O_2 e H_2O (MOLDES, 2006).

Uma abordagem que permite a compreensão dos mecanismos relacionados ao estresse é a análise do perfil enzimático. Tal perfil é importante, pois as enzimas são as unidades funcionais do metabolismo celular, que desencadearão reações químicas como forma de sobrevivência para as plantas. Dessa maneira, estudos sobre mecanismos enzimáticos em plantas propiciam entendimento dos mecanismos de resposta ao estresse abiótico e da importância de práticas corretas na agricultura durante todo o desenvolvimento vegetal (SALISBURY; ROSS, 1992).

Devido à ampla diversidade de espécies, versatilidade de uso e seu papel na dinâmica dos ecossistemas atuando como fixadoras de nitrogênio, em associação com bactérias específicas, as plantas leguminosas apresentam enorme potencial na revegetação de matas ciliares, razão pela qual vêm sendo sistematicamente inseridas em projetos técnicos ambientais (SOUSA, 2008).

A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan tem potencial econômico, como o madeireiro e medicinal, além de ser utilizada para arborização (MAIA, 2004). Estudos botânicos e dendrológicos são bastante desenvolvidos com a espécie angico, porém informações sobre a bioquímica e sua fisiologia são escassas. Dessa forma, estudar os mecanismos de defesa frente a estresse abiótico é de grande importância, pois contribui significativamente para o conhecimento acerca da espécie e para auxiliar o processo de seleção de plantas mais resistentes.

Objetivou-se com esse estudo analisar os efeitos do peróxido de hidrogênio na atividade da enzima catalase e identificar os teores de proteínas totais solúveis em tecidos foliares de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a atividade da enzima catalase em plântulas de *A.colubrina* (Vell.) Brenan

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a porcentagem de germinação de *A. colubrina* nos substratos papel germitest (rolo de papel) e entre areia;
- Extrair e quantificar proteínas totais solúveis pelo método de Bradford;
- Realizar SDS-PAGE para obter o perfil eletroforético das proteínas totais extraídas;
- Analisar a atividade da enzima catalase em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan utilizadas nos experimentos são provenientes de lote colhidos em 2005, armazenadas em câmara fria pertencente ao Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, coletadas no município de Catingueira, Paraíba.

3.2 Germinação das sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

Para desinfecção, as sementes foram colocadas por 5 minutos em hipoclorito de sódio a 5% e após esse período lavadas 4 vezes em água destilada.

Para a semeadura, foram utilizados como substratos: (1) substrato rolo de papel Germitest®, sendo três folhas umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco (BRASIL, 2009). Dez sementes foram distribuídas no terço superior de uma das folhas, formando um rolo, sendo envolvidos com sacos plásticos transparentes desinfestados com álcool 70% (v/v) com 8 repetições ; (2) Areia previamente esterilizada, em estufa a 120°C, colocada em recipientes gerbox, umedecida com água destilada a 60 % da capacidade de retenção (BRASIL, 2009). Vinte e cinco sementes foram distribuídas em cinco fileiras em caixas gerbox, estas últimas foram previamente desinfestadas com álcool 70% (v/v) com 8 repetições.

Após a semeadura, as sementes permaneceram em câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura ($30^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (de 12 horas), até desenvolverem o estágio de plântula.

Os cálculos de porcentagem de germinação foram realizados conforme Marguire (1962), seguindo a metodologia proposta por Popiginis (1976) que considera plântula normal aquela que apresenta as características indicativas de sua capacidade de sob condições favoráveis, crescer e transformar-se em planta normal.

A porcentagem de perda de água foi calculada segundo Oliveira et al. (2007), onde: % Perda de água aos n dias = $(\text{Massa inicial} - \text{Massa aos } n \text{ dias}) * 100/\text{Massa}$

da água colocada em cada sistema, onde foi avaliado a porcentagem de perda de água durante o estresse oxidativo no tempo de 48 horas.

No final do período de germinação (de 7 a 9 dias) as plântulas normais de cada repetição foram medidas da raiz até a parte aérea, usando-se uma régua graduada em centímetros, sendo os resultados expressos em cm/plântula.

3.3 Condições experimentais de estresse oxidativo

Foram aplicadas no sistema as seguintes concentrações de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como indutor do estresse oxidativo: 0mM (controle); 2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM e 10mM em 20 plântulas por tratamento com 7 dias de germinação por 48 horas (Figura 1). A coleta do material foliar foi realizada no tempo de 0 h (para o grupo controle), de 24 e 48 horas para todas as concentrações, sendo acondicionadas em freezer a $-20^\circ C$ para posterior extração dos tecidos foliares. Análises visuais e registros fotográficos foram realizados nos tempos discriminados para identificação de eventuais mudanças morfológicas nas plântulas dos tratamentos mencionados.

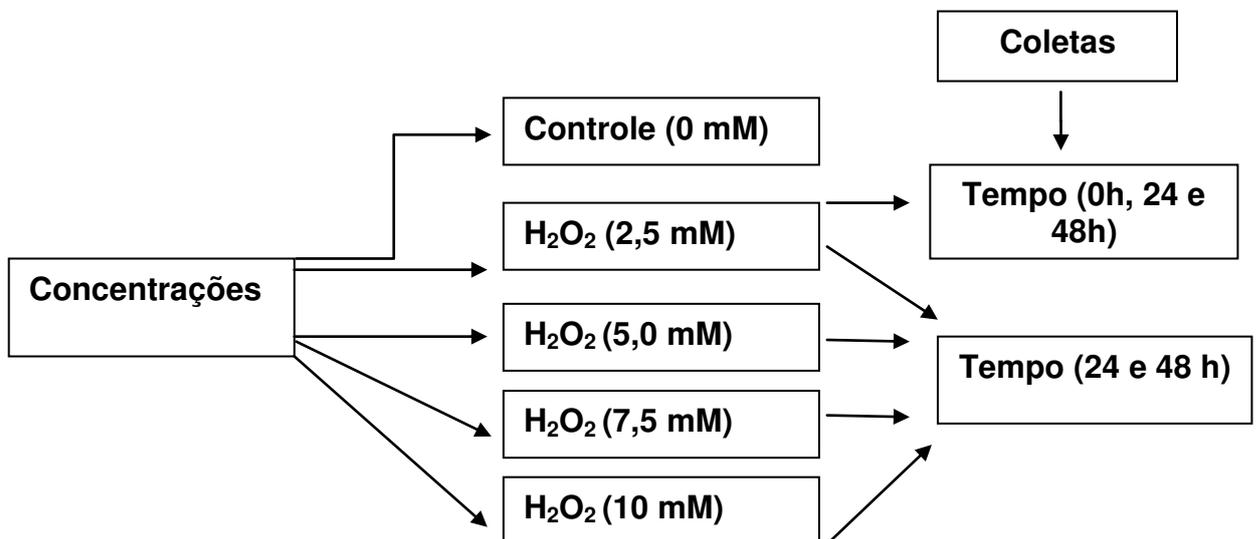


Figura 1. Concentrações utilizadas de peróxido de hidrogênio para a indução do estresse oxidativo: 0mM; 2,5mM; 5,0mM; 7,5mM e 10mM e tempo de coleta do tecido foliar para o controle e 24 e 48h para as demais concentrações.

3.4 Obtenção do extrato foliar

Para obtenção do extrato foliar 250 mg de folhas foram maceradas em nitrogênio líquido em almofariz (Figura 2). Posteriormente foi adicionado 0,750 mL do tampão de extração (fosfato de potássio 100mM (pH 7,0), 0,1 mM de EDTA, 1mM de ácido ascórbico). A mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante contendo proteínas solúveis foi coletado, transferido para microtubos limpos de 2 mL e armazenados em freezer -20°C para a realização das análises. O processo de extração foi adaptado do protocolo de Peixoto et al. (1999).



Figura 2. Folhas maceradas com nitrogênio líquido em almofariz.

3.5 Determinação da Quantificação de proteínas totais

A determinação de proteínas solúveis foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976) com 3 repetições. Para as medidas espectrofotométricas, pipetaram-se, em cubetas de plástico, 50 μ L do extrato protéico diluído apropriadamente em tampão de extração. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976), para posterior leitura a 595 nm.

3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético das proteínas foi realizado de acordo com Laemmli (1970). 50 µL da amostra foram dispersas em 50 µL de tampão contendo Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 20% de glicerol, 20% de SDS, 5% de β-mercaptoetanol e 0,1% de bromofenol, aquecida a 95 °C por 5 min e, após resfriamento, alíquotas de 5 µL de cada amostra foram aplicadas no gel. Utilizou-se o gel de separação a 12% e o gel de empilhamento a 4%. Após a corrida, os géis foram mantidos em solução do corante Brilliant Blue-G a 0,1% em ácido fosfórico por 24 h e, posteriormente, descorados em solução descorante.

As massas moleculares das proteínas foram estimadas utilizando o padrão Wide Range Marker (K 494): miosina (212 kDa), B-Galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97,4 kDa), Soro albumina bovina (66,2 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (31 kDa), Inibidor de tripsina da soja (21,4/19,7 kDa), Lisozima (14,4 kDa), (Amresco, EUA).

3.7 Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da enzima catalase foi determinada com protocolo adaptado de Havir; Mchale (1987) pela adição de 50µL do extrato enzimático a 2,9 mL de uma solução contendo H₂O₂ 20 mM e tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0), medindo-se a diminuição da absorbância a 260 nm. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar do H₂O₂ de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ a 260 nm e expressa em µmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹ (CARVALHO et al., 2011).

3.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em dois blocos com cinco tratamentos (0mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM) e duas repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias, quando significativas, comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa Sigma Stat 3.0.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação das sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan

A porcentagem de germinação consiste no número de sementes germinadas pelo total de sementes semeadas em um determinado período. Para a porcentagem de germinação de *A. colubrina* (Vell.) Brenan, o substrato entre Papel (RP) obteve maior média de porcentagem de germinação (91,68%) quando comparado ao substrato entre areia (EA), no valor de 76,50% (Tabela 1). Rodrigues et al.; (2007) obtiveram para *A. colubrina* (Vell.) Brenan porcentagem de germinação no substrato entre papel de 90%, similar ao resultado aqui obtido; no entanto, no substrato entre areia seu valor foi de 53% para o trabalho citado anteriormente.

Tabela 1. Valores da porcentagem de germinação seguido do tamanho médio de plântulas nos substratos rolo de papel e entre areia.

Substrato	Germinação (%)	Tamanho plântulas (cm)
Papel (RP)	91,68±4,37 ^{a,*}	30,3±0,69 ^a
Areia (EA)	76,50±14,41 ^b	18,7±1,07 ^b

* Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente segundo o teste pareado de Tukey ($p < 0,05$).

O tamanho médio das plântulas variou de 30,3 cm no papel e 18,7 cm na areia. Como reporta Popiginis (1977) os substratos influenciam diretamente no sucesso da germinação, uma vez que fatores como estrutura, aeração, capacidade de retenção de água e grau de infestação de patógenos podem variar conforme o substrato a ser utilizado. Durante a produção de mudas, o substrato é um dos componentes que mais interferem na germinação e no crescimento, por meio de fatores como estrutura e textura, bem como o manuseio para a contagem de plântulas durante a realização dos testes de germinação.

Germinação de sementes em laboratório consiste no desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis (BRASIL, 2009). Uma vez que a germinação

se inicia, o embrião estará comprometido para o crescimento de uma plântula ou poderá morrer, sendo processos irreversíveis. Externamente, a germinação é figura 3 representa plântulas normais *A. colubrina* (Vell.) Brenan em rolo de papel (RP) e entre areia (EA).



Figura 3. Aspecto visual de plântulas normais de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan nos substratos RP (A) e EA (B).

Quanto a porcentagem de perda de água, observou-se no intervalo de 48 horas (período de estresse oxidativo) que o substrato RP apresentou maior média de desidratação para todas as concentrações (Figura 4) em relação ao substrato EA (Figura 5). Como reporta Cartaxo et. al. (2003) o resultado obtido é esperado, pois no substrato areia ocorre maior absorção de água que o substrato papel, contribuindo assim para o controle da umidade, indispensável para o desenvolvimento normal das plântulas.

Em relação aos tratamentos no substrato papel, pode-se observar uma maior perda de água no 2º dia de estresse para todos os tratamentos, exceto o controle que manteve um equilíbrio entre os dois dias. No geral, uma maior perda foi observada no tratamento 7,5 mM no tempo de 48 horas, no valor de 19,61% de perda de água.

A Figura 5 mostra a perda de água em 24 e 48 horas no substrato areia. O resultado equivale-se ao substrato papel, apresentando uma maior perda de água no 2º dia de estresse. Como reporta Dias (2008) a água é o meio onde se processam várias reações bioquímicas, podendo assim no 2º dia a maior perda de água está relacionada com o maior nível de estresse no qual as plântulas estavam

submetidas. As concentrações 5,0, 7,5 e 10 mM foram as que obtiveram o maior percentual de perda de água no 2º dia de estresse.

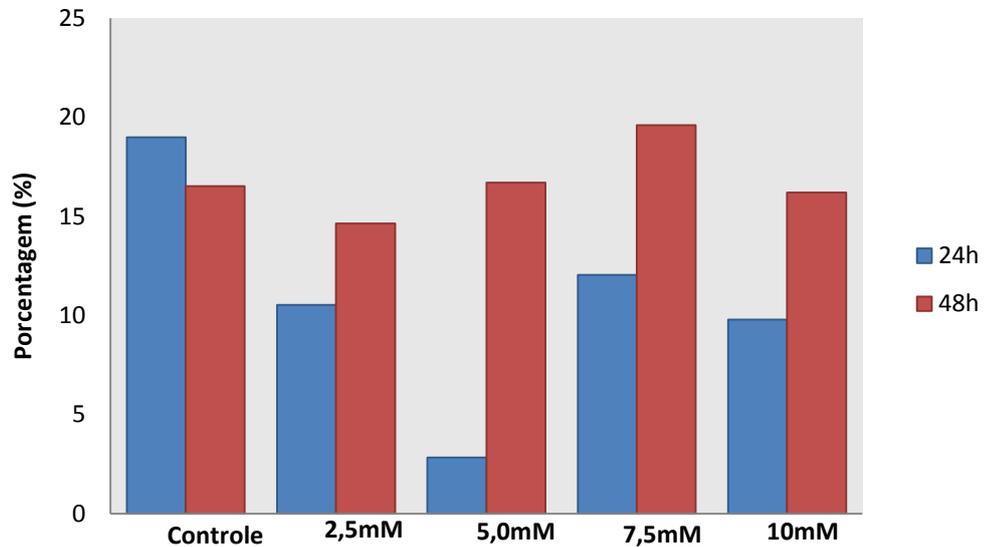


Figura 4. Porcentagem de perda de água pelo sistema no intervalo de 24 e 48 horas durante o estresse oxidativo no substrato papel

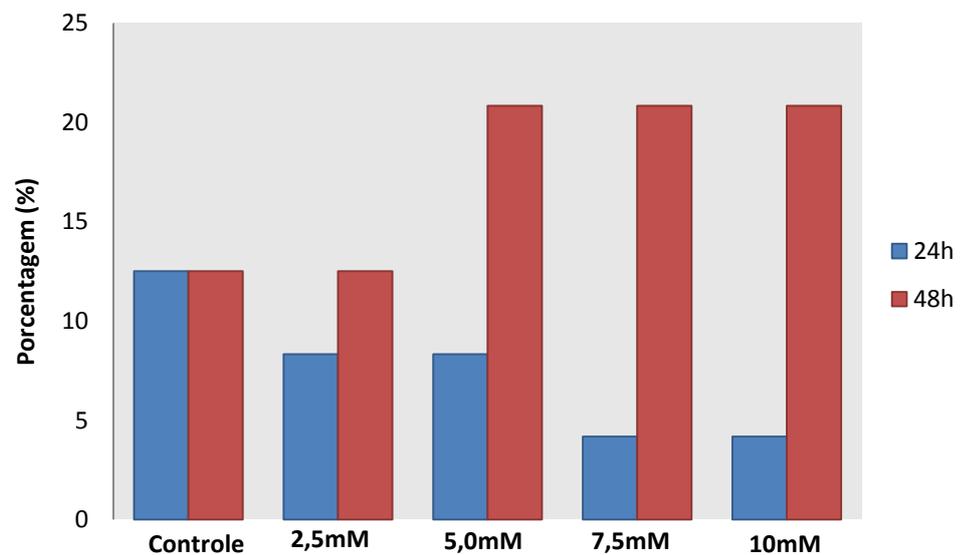


Figura 5. Porcentagem perda de água pelo sistema no intervalo de 24 e 48 horas durante o estresse oxidativo no substrato areia.

4.2 Aspectos Visuais de plântulas submetidas ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

4.2.1 Substrato Papel

Sabe-se que plantas submetidas a estresse mostram sintomas de envelhecimento precoce (LIMA, 2003) como podemos observar na figura 6. Em todas as concentrações utilizadas de peróxido de hidrogênio foram observadas mudanças no padrão normal das plântulas, como a presença de folhas murchas e o escurecimento da raiz, com intensidade variável entre as concentrações onde com plântulas tratadas com 2,5 mM e 5,0 mM de H_2O_2 apresentaram uma maior intensidade de tais lesões. Silva (2010) observou em plântulas de feijão caupi crescidas em papel os mesmos achados para a concentração de 5,0 mM de H_2O_2 .

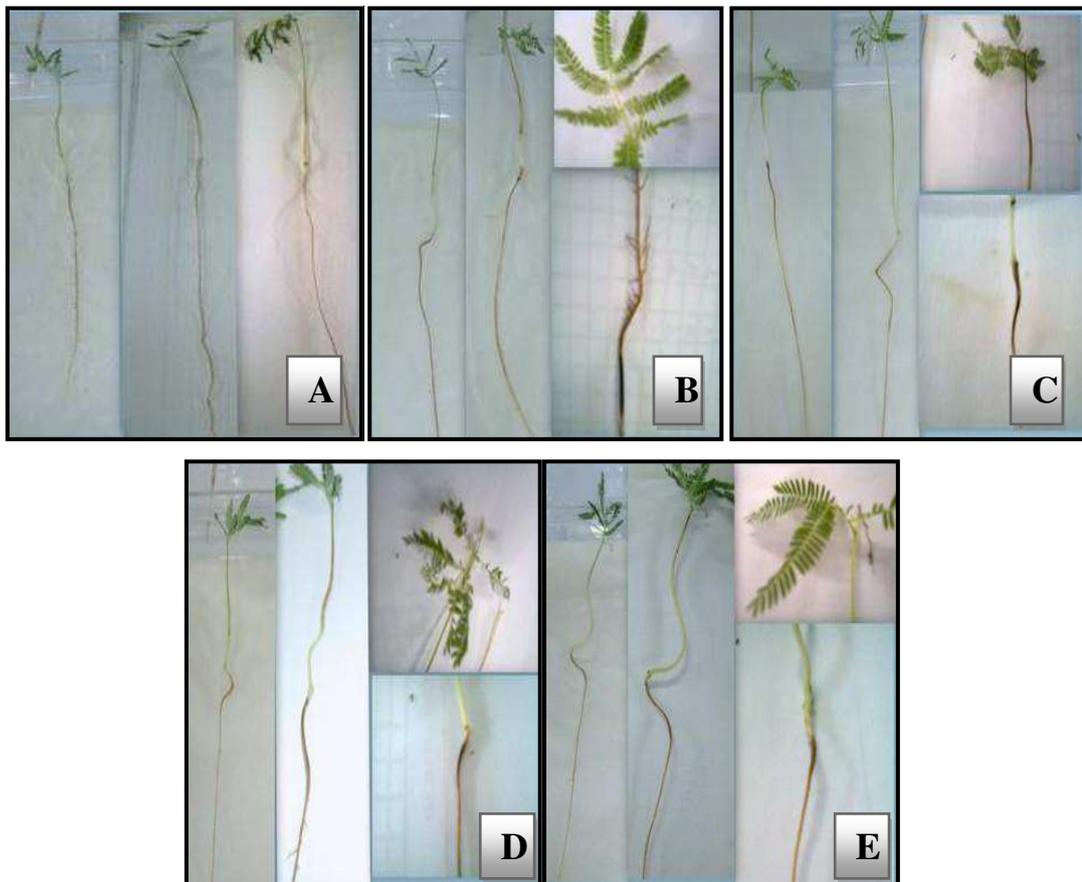


Figura 6. Análise visual das plântulas submetidas aos tratamentos com peróxido de hidrogênio no substrato papel. A: Controle; B: 2,5 mM; C: 5,0 mM; D: 7,5 mM; E: 10 mM no tempo de 0, 24 e 48 horas de estresse respectivamente.

4.2.2 Substrato Areia

As plântulas tratadas com concentrações de peróxido de hidrogênio de 5,0 mM e 7,5 mM no substrato areia apresentaram folhas murchas (Figura 7C). Segundo Neil et al. (2002) e Wan; Liu (2008) o peróxido de hidrogênio em baixas concentrações atua como um mensageiro secundário envolvido na sinalização contra vários estresses abióticos, enquanto que em altas concentrações leva ao estresse oxidativo.

Silva (2010) observou que em plântulas de feijão caupi crescidas em papel no tratamento de 10 mM ocorreu uma expansão foliar semelhante as plântulas de controle, correspondendo com os resultados obtidos em *A. colubrina* (Vell.) Brenan no substrato areia para o tratamento de 10 mM.

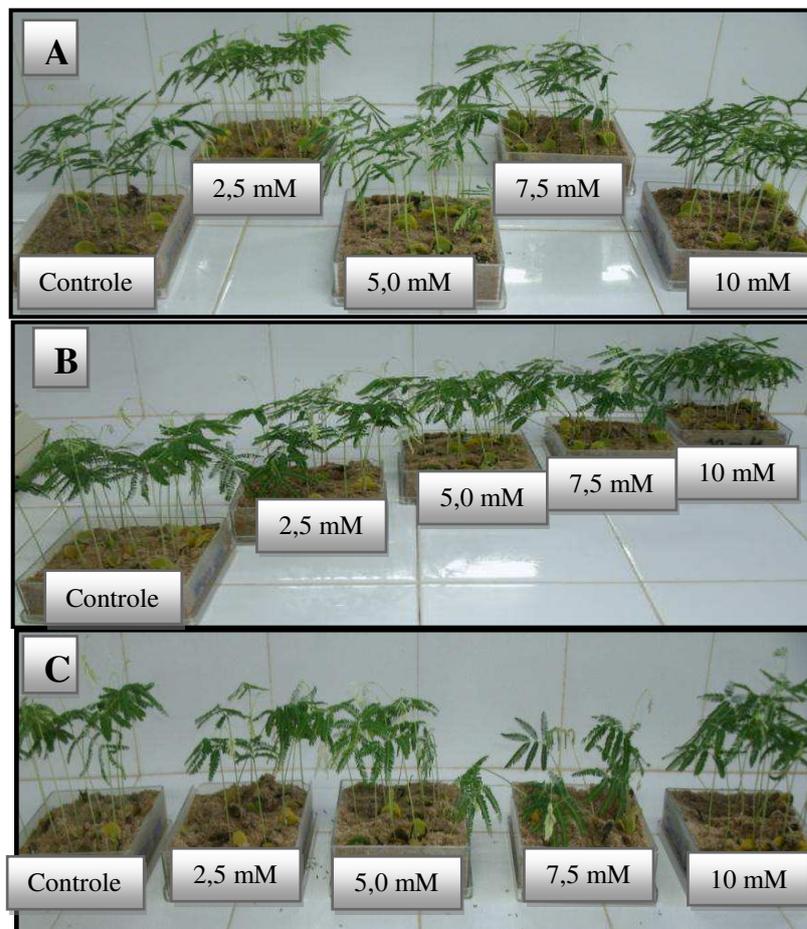


Figura 7. Análise visual das plântulas submetidas aos tratamentos com peróxido de hidrogênio no substrato areia. A: Tratamentos no tempo inicial (0 hora); B: Tratamentos após 24 horas; C: Tratamentos após 48 horas.

4.3 Quantificação de Proteínas totais

Na tabela 2 podemos observar o quantificação de proteínas solúveis totais no substrato papel. Os valores obtidos após 24 e 48 horas foram similares ao controle quando comparados com os demais tratamentos. Na concentração 5,0 mM ocorreu um decréscimo de 6,51 $\mu\text{g/mL}$ (24 horas) para 4,53 $\mu\text{g/mL}$ (48 horas); por outro lado, para a concentração de 2,5 mM ocorreu uma elevação de 6,20 (24 horas) para 9,00 $\mu\text{g/mL}$ (48 horas). Existe relato na literatura que estresses bióticos ou abióticos levam a alteração no padrão de expressão de proteínas das plantas, podendo ocorrer tanto a inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes protéicos (SOARES; MACHADO, 2007).

Tabela 2. Quantificação de proteínas (em $\mu\text{g/mL}$) pelo método de Bradford extraídas de plântulas crescidas no substrato papel.

Tempo	Concentração de H_2O_2				
	Controle	2,5 mM	5,0 mM	7,5 mM	10 mM
0 hora	9,15 \pm 0,49*	-	-	-	-
24 horas	8,30 \pm 0,65	6,20 \pm 1,35	6,51 \pm 0,34	5,58 \pm 2,23	3,75 \pm 1,27
48 horas	7,50 \pm 0,42	9,00 \pm 0,20	4,53 \pm 0,63	8,04 \pm 1,17	5,25 \pm 2,24

*Os valores são expressos como médias \pm desvio-padrão.

O conteúdo de proteínas solúveis totais no substrato areia não apresentou diferenças significativas entre as plântulas, independente do nível de H_2O_2 testado (tabela 3). O tratamento de 2,5 mM mostrou dentre todos os outros maior quantidade de proteínas, inclusive quando comparado ao controle, variando de 5,03 a 4,65 $\mu\text{g/mL}$ nos tempos 24 e 48 horas respectivamente. Segundo Zaia et al. (1998) o método de Bradford apresenta algumas desvantagens, tais como a variação da absorvidade específica em diferentes proteínas devido ao baixo peso molecular, o que pode ter ocorrido no substrato EA, onde a presença de tais proteínas não foram detectadas.

Tabela 3. Quantificação de proteínas (em $\mu\text{g/mL}$) pelo método de Bradford extraídas de plântulas crescidas no substrato areia.

Concentração de H_2O_2					
Tempo	Controle	2,5 mM	5,0 mM	7,5 mM	10 mM
0 hora	3,52 \pm 0,41*	-	-	-	-
24 horas	4,12 \pm 0,05	5,03 \pm 0,52	4,26 \pm 0,15	4,55 \pm 0,11	4,00 \pm 0,05
48 horas	3,77 \pm 0,15	4,65 \pm 0,25	4,34 \pm 0,50	4,09 \pm 0,30	4,07 \pm 0,30

*Os valores são expressos como médias \pm desvio-padrão.

4.4 Perfil eletroforético de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os perfis eletroforéticos das proteínas estão representados nas figuras 8 e 9 para o substrato papel e areia, respectivamente. Uma banda de proteínas com peso molecular de 212 kDa aproximadamente foi observada em todas as concentrações. Outra banda com peso molecular de 66,2 kDa apresentou diferenças nos tratamentos em relação a controle, dando ênfase a diferença presente em 2,5 mM no tempo de 24 horas.

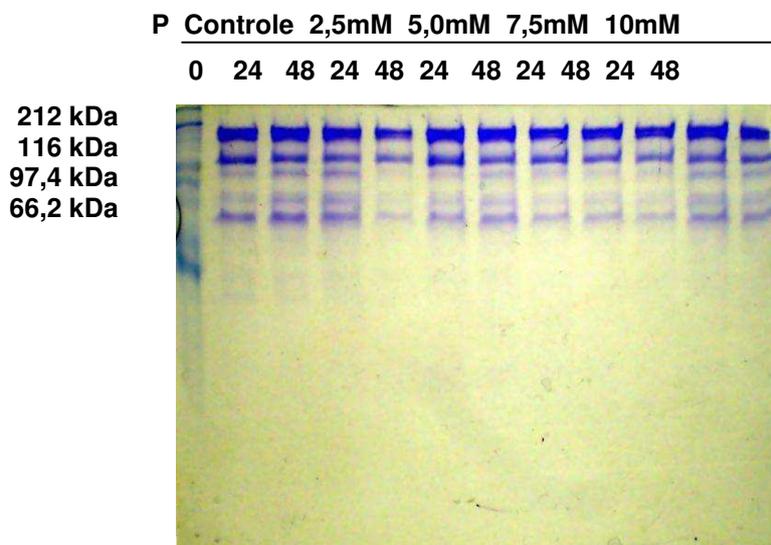


Figura 8. Perfil protéico obtido da extração enzimática de *A. colubrina*, em gel poliacrilamida em diferentes concentrações de estresse oxidativo com o H_2O_2 , germinadas no substrato papel. Coluna P: padrão Wide Range Marker; controle (0, 24 e 48 horas respectivamente); 2,5mM (24 e 48 horas); 5,0 mM (24 e 48 horas); 7,5 mM (24 e 48 horas); 10 mM (24 e 48 horas).

As proteínas de peso molecular 66,2 kDa e 45 kDa foram expressas em condições de estresse oxidativo (Figura 9) no substrato EA, sendo assim verificadas nas concentrações de 2,5 e 5,0 mM e ausentes nos demais tratamentos. Tal fato pode ser indicativo da maior expressão de proteínas relacionadas ao sistema antioxidante, apresentando a banda de 45 kDa exclusiva. Coelho et al. (2010) observaram a presença de proteínas com massas moleculares 110 e 30 kDa em estudos de estresse hídrico em plântulas de feijão.

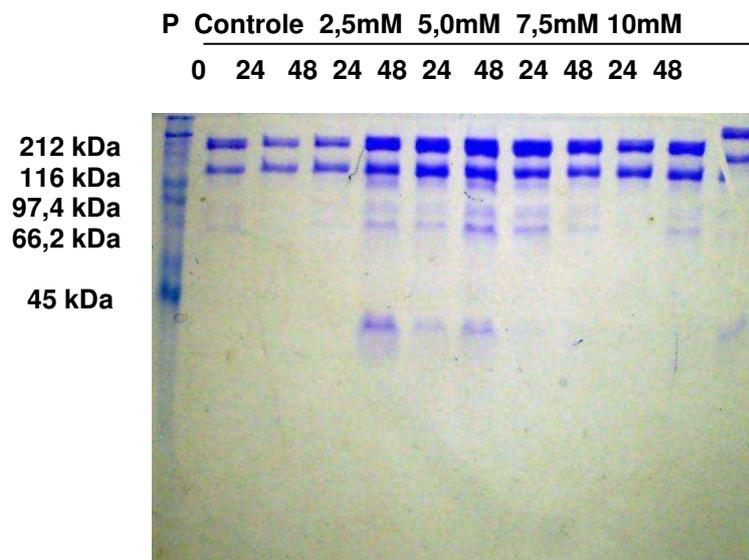


Figura 9. Perfil protéico obtido da extração enzimática de *A. colubrina*, em gel poliacrilamida em diferentes concentrações de estresse oxidativo com o H_2O_2 , germinadas no substrato areia. Coluna P: padrão Wide Range Marker; controle (0, 24 e 48 horas respectivamente); 2,5mM (24 e 48 horas); 5,0 mM (24 e 48 horas); 7,5 mM (24 e 48 horas); 10 mM (24 e 48 horas).

4.5 Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Alterações na atividade enzimática dependem da concentração do agente causador de estresse e das condições ambientais locais (LIMA, 2003). A atividade enzimática da catalase para o substrato papel foi observada no tempo de 48 horas para todos os tratamentos, no entanto, decorridas 24 horas somente os tratamentos 2,5, 5,0 e 10 mM apresentaram tal atividade (Figura 10). Carvalho et al, (2011) puderam registrar em plântulas de arroz que a atividade de catalase não foi estimulada quando o tratamento foi feito com 10 mM de H_2O_2 , indicando assim que o H_2O_2 exógeno nessa concentração não foi eficiente para ocasionar uma sinalização celular para provocar a expressão de genes de catalase. Na

concentração 10 mM houve um menor nível quando comparado com os demais tratamentos, inclusive o controle.

No substrato areia a atividade da catalase aumentou significativamente no 2º dia de estresse para todas as concentrações, com o maior nível no tratamento 5,0 mM (Figura 11). Quando comparado ao perfil eletroforético de proteínas, pode-se observar que a presença de proteínas exclusivas no substrato EA é comprovada pela atividade da catalase em todas as concentrações de forma mais expressiva que o substrato RP.

O aumento na produção de enzimas de reparo é necessário para tentar remediar os danos causados durante o estresse oxidativo, e a diferença nos níveis de concentração dessas proteínas pode ocorrer pela síntese de novas proteínas ou pela degradação de proteínas já existentes (OLIVEIRA, 2009). Lee et al, (2001) verificaram maior atividade da enzima catalase mediante ao estresse oxidativo em plantas de arroz submetidas a salinidade. O aumento da catalase também foi observado por Moskova et al. (2009) em plantas de ervilha tratada com peróxido de hidrogênio.

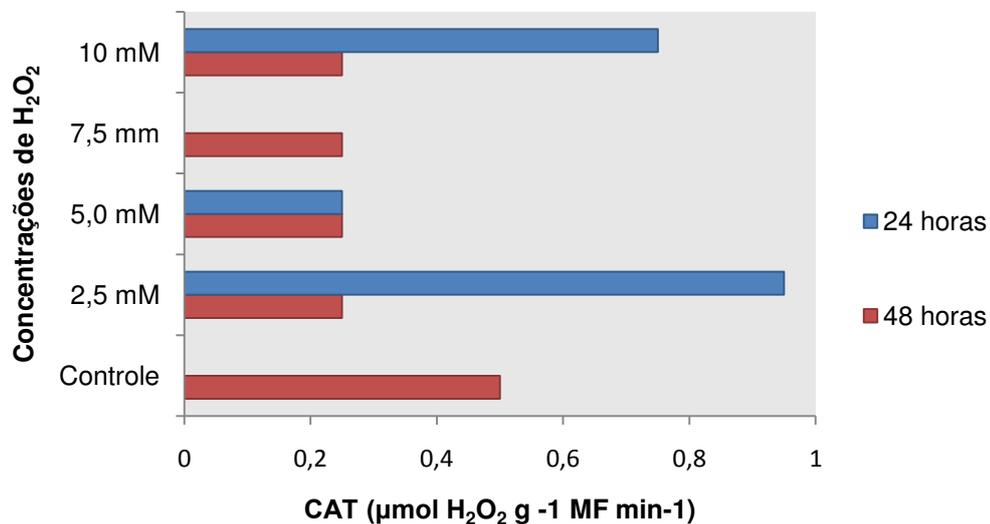


Figura 10. Atividade de Catalase em tecidos foliares de plântulas de *A. colubrina* no substrato RP em diferentes concentrações de H₂O₂.

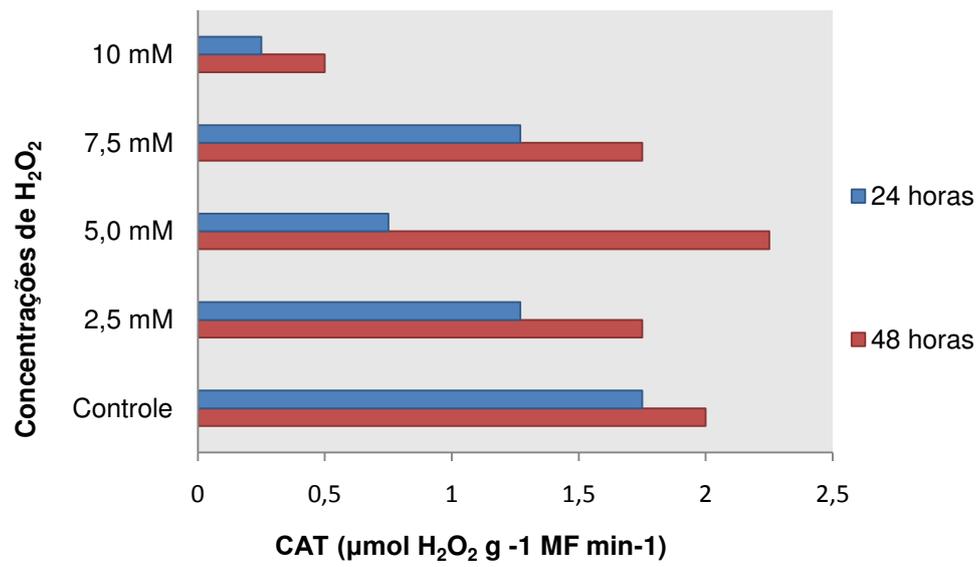


Figura 11. Atividade de Catalase em tecidos foliares de plântulas de *A. colubrina* no substrato EA em diferentes concentrações de H_2O_2 .

5. CONCLUSÕES

Soluções de peróxido de hidrogênio provocaram expressão diferenciada de proteínas o que foi confirmado pela quantidade de proteínas extraídas dos tratamentos analisados.

A concentração de 5,0 mM no substrato areia foi a que mais induziu a atividade da catalase, sendo comprovada pela presença de bandas exclusivas de massa molecular (66,2 e 45 kDa).

A germinação de *Anadenanthera colubrina* no sistema areia é mais eficaz para estudos de defesa vegetal, o que foi comprovado pela medição do perfil eletroforético e da atividade da catalase.

A análise do perfil enzimático da catalase foi mais expressivo no substrato entre areia que no substrato rolo de papel.

REFERÊNCIAS

- 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**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009, 365 p.
- CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El Lado Oscuro del Oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, v.2, n.2, p.1-12, 2005.
- CARTAXO, W. V.; QUEIROGA, V. DE. P.; SILVA FILHO, J. L. DA.; QUEIROGA, D. A. N. Germinação de sementes de mamona com e sem casca. In: **III Congresso Brasileiro de Mamona: Energia e Bioquímica**, p.1-5, 2003.
- CARVALHO, F. E. L.; LOBO, A. K. M.; BONIFACIO, A.; MARTINS, M. O.; LIMA NETO, M. C.; SILVEIRA, J. A. G. Acclimação ao estresse salino em plantas de arroz induzida pelo pré- tratamento com H₂O₂. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.15, n.4, p.416–423, 2011.
- COELHO, D. L. M.; AGOSTINI, E. A. T. DE.; GUABERTO, L. M.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTODIO, C. C. Estresse hídrico com diferentes osmóticos em sementes de feijão e expressão diferencial de proteínas durante a germinação. **Acta Scientiarum. Agronomy** v. 32, n. 3, p. 491-499, 2010.
- DEUNER, S.; ALVES, J. D.; FRIES, D. D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; HENRIQUE, P. DE. C.; GOULART, P. DE. F. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revista Ceres**, v. 55, n.2, p. 135-140, 2008.
- DIAS, L. B. **Água nas plantas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2008, 50p. (Monografia – Lato sensu em Botânica de Plantas Ornamentais).
- FENNER, M.; THOMPSON, K. **The Ecology of Seeds**. Cambridge, 2005, 261p.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v.17, p.1866-1875, 2005.

GIULIETTI, A. M.; NETA, A. L. DU. B.; CASTRO, A. A. J. F.; ROJAS, C. F. L. G.; SAMPAIO, E. V. S. B.; VIRGÍNIO, J. F.; QUEIROZ, L. P. DE.; FIGUEIREDO, M. A.; RODAL, M. DE. J. N.; BARBOSA, M. R. DE. V.; HARLEY, R. M. **Diagnóstico da vegetação nativa do Bioma Caatinga**. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18267/1/Biodiversidade_Caatinga_parte2.pdf>. Acesso :12 de mai de 2011.

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

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

LEE, D.H.; KIM, Y.S. & LEE, C.B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n.6, p.737-745, 2001.

LIMA, J. S. Processos biológicos e biomonitoramento: Aspectos bioquímicos e biológicos. In: **Indicadores Ambientais: Conceitos e Aplicações**. Maia et al., organizadores. Univ. Pontifca de Comillas, 2003, 285p.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MAIA, G. N., **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª ed. São Paulo, Computação Gráfica e Editora, 2004, 413p.

MELO, R. R. DE.; FERREIRA, A. G.; RODOLFO JUNIOR, F. Efeitos de diferentes substratos na germinação de sementes de angico *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan em condições de laboratório. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n.5, 2005.

MOLDES, C. A. **resposta de enzimas antioxidantes à aplicação de herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2006, 193p. (Tese- Doutorado em Ecologia Aplicada).

MOSKOVA, I.; TODOROVA, D.; ALEXIEVA, V.; IVANOV, S.; SERGIEV, I. Effect of exogenous hydrogen peroxide on enzymatic and nonenzymatic antioxidants in leaves of young pea plants treated with paraquat. **Plant Growth Regulation**, v. 57, n. 2, p.193-202, 2009.

NEIL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1237-1247, 2002.

OLIVEIRA, A. H. S. DE. **Análise das mudanças do perfil protéico durante o estresse oxidativo *in vivo* e atuação da muty-glicosilase em respostas celulares.** Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009, p.56. (Dissertação – Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

OLIVEIRA, C. M. G.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; TOMAZ, C. DE. A. Manutenção da umidade do substrato durante o teste de germinação de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de sementes**, v. 29, n.3, p.52-60, 2007.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente.** Brasília, AGIPLAN, 1977. 75p.

RODRIGUES, A. C. DA. CUNHA.; OSUNA, J. T. A.; QUERIOZ, S. R. DE. O. D.; RIOS, A. P. S. Efeito do substrato e da luminosidade na germinação de *Anadenanthera colubrina* (Fabaceae, Mimosoideae). **Revista Árvore**, v.31, n.2, p.187-193, 2007.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology.** Wadsworth Pub., 1992. 682p.

SILVA, I. B. DA. **Efeitos do peróxido de hidrogênio e do amitrol na atividade enzimática da catalase e da ascorbato peroxidase em tecidos foliares de plântulas de feijão caupi.** Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010, p.63. (Monografia – Bacharelado em Ciências Biológicas).

SOARES, A. M. DO.S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropicana – Ciências Agrárias e Biológicas.** V.1, n. 1, p. 9-19, 2007.

SOUSA, J. V. DE. **Desenvolvimento inicial de Leguminosas arbóreas nativas em várzea sob diferentes condições de drenagem na regeneração de matas ciliares.** Campinas: Instituto Agrônomo, 2008, p.89. (Dissertação- Mestrado em agricultura tropical e subtropical).

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v.21, n.6, 1998.

WAN, X. Y.; LIU, J. Y. Comparative Proteomics Analysis Reveals an Intimate Protein Network Provoked by Hydrogen Peroxide Stress in Rice Seedling Leaves. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.7, n.8, p.1469-1488, 2008.