

PAULO HENRIQUE PEREIRA PEIXOTO

PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS EM MEMBRANAS E TECIDOS DE DOIS  
CULTIVARES DE SORGO (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) COM  
TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do Curso de  
Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de  
“*Doctor Scientiae*”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
JANEIRO - 1998

PAULO HENRIQUE PEREIRA PEIXOTO

PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS EM MEMBRANAS E TECIDOS DE DOIS  
CULTIVARES DE SORGO (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) COM  
TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ALUMÍNIO

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do Curso de  
Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de  
“*Doctor Scientiae*”.

Aprovada: 23 de setembro de 1997

---

Marco Antônio Oliva Cano  
(Conselheiro)

---

Maurílio Alves Moreira  
(Conselheiro)

---

Renato Sant’Anna

---

Paulo Roberto Mosquim

---

José Cambraia  
(Orientador)

A Deus, por mais esta oportunidade,  
dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTO**

Às seguintes instituições, pela oportunidade do curso e pelas facilidades no desenvolvimento do trabalho de Tese:

- Universidade Federal de Viçosa - UFV;
- Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; e
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Aos meus professores, pela orientação, pelos ensinamentos, pela colaboração, pelo apoio, pelo incentivo, pela convivência e pela amizade:

- Prof. José Cambraia, meu orientador, com admiração e respeito;
- Prof. Marco Antônio Oliva Cano;
- Prof. Maurílio Alves Moreira;
- Prof. Renato Sant'Anna;
- Prof. Paulo Roberto Mosquim;
- Prof. Moacyr Maestri;
- Prof. Raimundo Santos Barros;
- Prof. Marco Aurélio Pedron e Silva;

- Prof. Rolf Pushmann;
- Prof. Eldo Antônio Monteiro da Silva;
- Prof. Aristéia Alves de Azevedo;
- Prof. Eduardo Euclides Borges;
- Prof. Maria Goreti de Almeida Oliveira; e
- Prof. Elza Fernandez de Araújo.

Pela colaboração, pelo apoio, pelo incentivo, pela convivência e pela amizade:

- Mauro Lúcio Torres Corrêa, Carlos Geraldo Torres e Jorge Luís dos Santos, funcionários do Laboratório de Biofísica da UFV;
- Daniel Sales Pimenta, João Batista Picinini Teixeira, Márcio Caetano Brügger, Fátima Regina Salimena Pires, Selma de Moraes Sarmiento Verardo, Alberto Pavan, Geraldo Luis Soares, colegas do Departamento de Botânica - ICB - UFJF;
- Mara, minha noiva; Paulo e Eunice, meus pais; Judith e Márcia, minhas irmãs; Alice e Igor, meus sobrinhos; Ramon e Vicente, meus cunhados e todos os demais familiares;
- Raion Vasconcelos Braga e José Francisco de Carvalho Gonçalves, meus amigos;
- Marcos Antônio Bacarin, Wellington Leite Medeiros, Ernandis Borges do Amaral Neto, José Algaci Lopes da Silva, Jorge Luis S. Mattos, Ricardo Frederico Euclides, Nátia Elen Auras, José Mauro Balbino, Marco Antônio Galeas Aguilar, Susana Cristine Siebeneichler, Carlos Moacir Bonato, Marcelo Augusto Carnellosi, Jamil de Moraes Pereira, Juraci Alves de Oliveira, Fábio Murilo da Matta, Carlos Alberto Martinez, colegas de república e de curso;

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

## **BIOGRAFIA**

PAULO HENRIQUE PEREIRA PEIXOTO, filho de Paulo Roberto Peixoto e Eunice Pereira Peixoto, nasceu na cidade de Lavras, MG, no dia 07 de janeiro de 1966.

Em dezembro de 1987, graduou-se em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de Lavras - UFLA. No ano de 1988, iniciou na UFLA o curso de Mestrado em Fitotecnia na área de cultura de tecidos vegetais, concluindo-o no mês de dezembro de 1990.

Em janeiro de 1991, foi contratado pelo Departamento de Biologia da Universidade do Amazonas - UA.

No mês de março de 1992, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Em outubro de 1993, foi contratado pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF.

No dia 23 de setembro de 1997, defendeu a Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal na UFV.

## CONTEÚDO

página

|                                                                                     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                                          | viii |
| EXTRATO.....                                                                        | x    |
| ABSTRACT.....                                                                       | xii  |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                  | 1    |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                       | 4    |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                                          | 16   |
| 3.1. Isolamento e purificação da membrana plasmática.....                           | 17   |
| 3.2. Determinação da atividade da H <sup>+</sup> -ATPase.....                       | 18   |
| 3.3. Determinação da composição de ácidos graxos.....                               | 19   |
| 3.3.1. Na fração purificada das membranas plasmáticas.....                          | 19   |
| 3.3.2. Nos tecidos radiculares.....                                                 | 20   |
| 3.4. Determinação da peroxidação dos lipídios.....                                  | 21   |
| 3.4.1. Formação do complexo MDA-TBA.....                                            | 21   |
| 3.4.1.1. Na fração purificada das membranas plasmáticas.....                        | 21   |
| 3.4.1.2. Nos tecidos radiculares e na parte aérea.....                              | 22   |
| 3.4.2. Produção de aldeídos voláteis.....                                           | 22   |
| 3.5. Determinação da atividade enzimática.....                                      | 23   |
| 3.5.1. Peroxidases (POXs, EC 1.11.1.7).....                                         | 23   |
| 3.5.2. Peroxidases do ascorbato (APXs, EC 1.11.1.11).....                           | 24   |
| 3.5.3. Catalases (CATs, EC 1.11.1.6).....                                           | 24   |
| 3.5.4. Dismutases do superóxido (SODs, EC 1.15.1.1).....                            | 25   |
| 3.5.5. Oxidases dos polifenóis (POLs, EC 1.10.3.2, EC 1.10.3.1 e EC 1.14.18.1)..... | 26   |
| 3.5.6. Lipoxigenases (LOXs, EC 1.13.11.12).....                                     | 26   |
| 3.5.7. Amônia liases da fenilalanina (PALs, EC 4.3.1.5).....                        | 27   |
| 3.5.8. Desidrogenases dos álcoois cinâmicos (CADs, EC 1.1.1.195).....               | 27   |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6. Determinação de compostos fenólicos.....                      | 28 |
| 3.6.1. Lignina.....                                                | 28 |
| 3.6.2. Compostos fenólicos solúveis.....                           | 29 |
| 3.7. Delineamento experimental.....                                | 29 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                     | 30 |
| 4.1. Efeito do Al sobre a atividade da H <sup>+</sup> -ATPase..... | 30 |
| 4.2. Efeito do Al sobre a composição de ácidos graxos.....         | 34 |
| 4.2.1. Na fração purificada da membrana plasmática.....            | 34 |
| 4.2.1.1. Nos ápices radiculares.....                               | 34 |
| 4.2.1.2. Nas raízes inteiras.....                                  | 41 |
| 4.2.2. Nos tecidos radiculares.....                                | 44 |
| 4.3. Efeito do Al sobre a peroxidação de lipídios.....             | 48 |
| 4.3.1. Formação do complexo MDA-TBA.....                           | 48 |
| 4.3.1.1. Na fração purificada da membrana plasmática.....          | 48 |
| 4.3.1.2. Nos tecidos radiculares e na parte aérea.....             | 52 |
| 4.3.2. Produção de aldeídos voláteis.....                          | 54 |
| 4.4. Efeito do Al sobre a atividade enzimática.....                | 56 |
| 4.5. Efeito do Al sobre compostos fenólicos.....                   | 66 |
| 4.5.1. Teor de lignina.....                                        | 66 |
| 4.5.2. Teor de compostos fenólicos solúveis.....                   | 68 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES.....                                        | 71 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                    | 75 |
| APÊNDICE.....                                                      | 88 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

16:0 - Ácido palmítico

16:1 - Ácido palmitoléico

18:0 - Ácido esteárico

18:1 - Ácido oléico

18:2 - Ácido linoléico

18:3 - Ácido linolênico

18:2/18:3 - Relação entre o conteúdo de ácido linoléico e ácido linolênico

18:2/16:0 - Relação entre o conteúdo de ácido linoléico e ácido palmítico

AGI/AGS - Relação entre o conteúdo de ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados

Al - Alumínio

APXs - Peroxidases do ascorbato

ATP - Trifosfato de adenosina

BHT - Butil-hidroxitoluol

CADs - Desidrogenases dos álcoois cinamílicos

CATs - Catalases

EDTA - Etileno diamino tetracético

EMAGs - Ésteres metílicos dos ácidos graxos

GTP - Trifosfato de guanosina

H<sup>+</sup>-ATPase - Próton ATPase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

ILD<sub>C18</sub> - Índice de ligações duplas para ácidos graxos com dezoito carbonos

LOXs - Lipoxigenases

MBTH - 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona

MDA - Aldeído malônico

MDA-TBA - Complexo aldeído malônico - ácido tiobarbitúrico

MF - Matéria fresca

NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma oxidada

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reduzida

NBT - Azul de *p*-nitro tetrazólio

O<sub>2</sub> - Oxigênio molecular

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - Oxigênio “singlet”

·OH - Radical hidroxila

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Radical superóxido

PALs - Amônia liases da fenilalanina

Pi - Fosfato inorgânico

POLs - Oxidases dos polifenóis

POXs - Peroxidases

RNAase - Ribonuclease

SDS - Sódio duodecil sulfato

SODs - Dismutases do superóxido

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

W - Watt

## EXTRATO

PEIXOTO, Paulo Henrique Pereira, D.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 1997. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio.** Orientador: José Cambraia. Conselheiros: Marco Antônio Oliva Cano e Maurílio Alves Moreira.

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos do alumínio (Al) em nível tóxico sobre os sistemas metabólicos que controlam a produção e a eliminação de radicais livres e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios em plantas de dois cultivares de sorgo, um sensível (BR007A) e outro tolerante (BR006R) ao Al, cultivadas durante 10 dias em solução nutritiva, pH 4,0, na presença (0,185 mM) e na ausência do Al. Na presença do Al, a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase reduziu no sistema radicular das plantas, mas, principalmente nas membranas plasmáticas provenientes dos ápices das raízes do cultivar tolerante. Dentre as principais modificações verificadas sobre a composição de ácidos graxos das membranas na presença do Al, as mais importantes foram observadas nos ápices das raízes, onde a relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados e, principalmente, o índice de ligações duplas para ácidos graxos com dezoito carbonos foram bastante reduzidos no cultivar sensível. Na presença do Al, a concentração do ácido linolênico reduziu nas membranas provenientes dos ápices das raízes do cultivar sensível, mas, de modo contrário, aumentou muito no tolerante. A

atividade enzimática nos tecidos das plantas foi bastante alterada na presença do Al. A atividade das peroxidases aumentou nas raízes e nas folhas dos dois cultivares, principalmente no sensível. De modo contrário, a atividade das peroxidases do ascorbato e das catalases reduziu nesses tecidos, exceto nas raízes do cultivar sensível, onde o aumento da atividade das peroxidases do ascorbato foi observado. A atividade das dismutases do superóxido e das oxidases dos polifenóis aumentou, respectivamente, apenas nas folhas do cultivar tolerante e nas raízes do sensível. A atividade das lipoxigenases aumentou nas folhas em maior intensidade no cultivar tolerante, mas, de modo contrário, reduziu nas raízes em maior intensidade no cultivar sensível. Nas raízes das plantas, a atividade das amônia liases da fenilalanina reduziu nos dois cultivares, mas em maior intensidade no tolerante. A atividade das desidrogenases dos álcoois cinamílicos aumentou nas raízes do cultivar tolerante, mas reduziu no sensível. Na presença do Al, o teor de lignina aumentou nas raízes de ambos os cultivares, porém em maior intensidade no tolerante. O teor de compostos fenólicos solúveis aumentou na presença do Al nas raízes e nas folhas dos dois cultivares, principalmente no sensível. Todos os resultados sugerem que, na presença do Al, o cultivar tolerante produza menores quantidades de radicais de oxigênio livres ou, então, possua mecanismos enzimáticos de remoção, de imobilização e, ou, de neutralização desses radicais mais eficientes que no cultivar sensível, o que, aparentemente, resultou na menor intensidade de peroxidação dos lipídios nos tecidos das raízes e da parte aérea e, especificamente, nas membranas provenientes dos ápices das raízes das plantas do cultivar tolerante.

## ABSTRACT

PEIXOTO, Paulo Henrique Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January 1997. **Lipids peroxidation in membranes and tissues of two sorghum cultivars (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) with differential tolerance to aluminum.** Adviser: José Cambraia; Committee members: Marco Antônio Oliva Cano and Maurílio Alves Moreira.

In this work, the effects of aluminum (Al) at toxic level upon the metabolic systems that control the formation and scavenging of free radicals and, consequently, the lipid peroxidation in plants were examined. The plants were grown for 10 days in nutrient solution, pH 4.0, in the presence (0.185 mM) and absence of Al. The H<sup>+</sup>-ATPase activity was reduced in the root system of both cultivars, specially in the membranes from the root tips of the tolerant cultivar. Among the main changes observed in the composition of membrane fatty acids in the presence of Al, the more important ones occurred in the root tips. In this case, the ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids, and specially the double bond index for 18 carbon fatty acids were quite reduced in the sensitive cultivar. The concentration of linolenic acid was reduced in root tip membranes of the sensitive cultivar in the presence of Al, while a great increase was obtained in the tolerant one. The enzymatic activity in plant tissues was greatly altered by the presence of Al. Peroxidases activity was increased in roots and leaves of both

cultivars, but mostly in the sensitive one. On the other hand, ascorbate peroxidases and catalases activities were reduced in these tissues, except in the roots of the sensitive cultivar in which an increase in ascorbate peroxidases was observed. Superoxide dismutases and polyphenol oxidases activities were increased only in the leaves of the tolerant cultivar, and in the roots of the sensitive one. Lipoxygenases activities were increased in the leaves, but were reduced in the roots of both cultivars. The increase and reduction of lipoxygenases activities was greater in the leaves of tolerant and in the roots of the sensitive cultivar, respectively. In the roots, the phenylalanine ammonia-lyase activity was reduced in both cultivars, but mostly in the tolerant one. The activity of cinnamyl alcohol dehydrogenases was increased in the roots of the tolerant cultivar, and was reduced in those of the sensitive one. Lignin content raised in the roots of both cultivars in the presence of Al, but the increase was greater in the tolerant one. Aluminum increased the content of soluble phenolic compounds in the root and leaves of both cultivars, but mostly in the sensitive one. All the results suggest that in the presence of Al, the tolerant cultivar produces less oxygen free radicals or that it has more efficient enzymatic mechanisms of removing, neutralizing and/or scavenging them than those of the sensitive cultivar. This apparently led to a lower lipid peroxidation in the tissues of roots and leaves, and specifically, in the root tip membranes from the tolerant cultivar.

## 1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 40% das terras cultivadas do mundo e cerca de 70% das terras aráveis são ácidas (MYASAKA et al., 1989). Na maior parte desses solos, a toxicidade provocada pelo alumínio (Al) é o principal fator limitante ao estabelecimento das culturas (RYAN et al., 1992). Diversos efeitos prejudiciais observados em plantas têm sido atribuídos ao Al, mas, muitos desses, provavelmente, não representam respostas primárias das plantas a sua toxicidade. A ligação do Al aos nucleotídeos de ATP e GTP altera reações envolvidas na dinâmica dos filamentos de actina e miosina e na estabilidade dos microtúbulos, o que resulta num significativo aumento na tensão dos filamentos da rede transvacuolar de actina e do citoesqueleto nas células das raízes, apresentando a inibição da divisão celular como consequência imediata (GRABSKI e SCHINDLER, 1995). Aparentemente, os ápices são as regiões mais sensíveis, uma vez que a aplicação do Al a outras porções das raízes produz pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento (DELHAIZE et al., 1993).

As plantas, de acordo com o local da lesão primária e com o mecanismo de tolerância diferencial ao Al, podem classificar-se em três categorias: aquelas plantas em que a lesão primária é citoplasmática e a tolerância diferencial resulta na sua capacidade em desintoxicar ou tolerar o Al no simplasto; aquelas plantas em que a lesão primária é citoplasmática e a tolerância diferencial resulta na sua capacidade em excluir o Al do simplasto; aquelas plantas em que a lesão primária

é apoplástica e a tolerância diferencial é determinada pela sua capacidade de modificar o apoplasto para proteger a parede celular e, ou, a estrutura e as funções da membrana plasmática (TICE et al., 1992). Trabalhos recentes consideram a exclusão do simplasto o principal mecanismo de tolerância ao Al e, nessas plantas, a exsudação de ácidos orgânicos e de polipeptídeos na rizosfera próxima aos ápices das raízes é o principal mecanismo de desintoxicação (RYAN et al., 1995; BASU et al., 1994 e FUENTE et al., 1997). O citrato e, principalmente, o malato têm a capacidade de formar quelatos com o  $\text{Al}^{3+}$ , reduzindo a sua atividade na rizosfera (SUHAYADA e HAUG, 1986). Além disso, a adição de ácidos orgânicos ao meio pode, efetivamente, proteger as raízes de genótipos sensíveis contra a toxicidade provocada pelo Al em solução nutritiva (PELLET et al., 1996). A exsudação de mucilagens a partir de células da coifa tem importância fundamental no aumento da zona de proteção existente no ápice radicular de plantas tolerantes ao Al, uma vez que essas substâncias aumentam a concentração de ácidos orgânicos nas proximidades das raízes (ARCHAMBAULT et al., 1996).

Em concentrações micromolares, monômeros e complexos do Al ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  e  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ) podem causar distúrbios em diversos processos fisiológicos nas células das plantas (DELHAIZE e RYAN, 1995). A membrana plasmática parece ser o sítio primário das injúrias provocadas pelo Al (CHEN et al., 1991). Segundo KINRAIDE (1988), o Al pode se ligar às cargas negativas dos fosfolípidios, o que resulta em alterações na permeabilidade das membranas em decorrência de modificações na fluidez, na densidade de empacotamento e na frequência de dobras dos lipídios e, conseqüentemente, na mobilidade da bicamada lipídica (ZHAO et al., 1987). A ligação do Al às proteínas e, ou, aos lipídios adjacentes das membranas pode resultar em alterações nas propriedades fisiológicas desses componentes (KINRAIDE, 1988). A inibição da fosfolipase C, enzima localizada na membrana plasmática e envolvida nos mecanismos de sinalização intracelular, foi recentemente relacionada como um possível alvo para a ação primária da toxicidade por Al (JONES e KOCHIAN, 1995).



Evidências indicam que injúrias causadas às membranas por diversos fatores de estresse estão relacionadas ao aumento na produção de radicais superóxidos ( $O_2^{\cdot -}$ ) (SCANDALIOS, 1993). Estes radicais de oxigênio são espécies químicas responsáveis pela peroxidação dos lipídios em membranas e organelas e podem, juntamente com o  $H_2O_2$ , gerar o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), reconhecidamente o mais potente oxidante celular, que rápida e indiscriminadamente degrada todas as macromoléculas, causando sérios danos aos componentes celulares (SCANDALIOS, 1993). Segundo GUTTERIDGE et al. (1985), o Al parece facilitar a ação dos radicais livres e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios das membranas, o que é intensificado na presença de ferro ( $Fe^{2+}$ ). Em plantas superiores, o primeiro produto estável formado pela redução do  $O_2$  e do  $O_2^{\cdot -}$  é o  $H_2O_2$ , uma espécie também tóxica para os componentes celulares (KNÖRZER et al., 1996). Esse processo pode ocorrer naturalmente e, ou, com a participação das dismutases do superóxido (SODs) (SCANDALIOS, 1993). Nos plastídios, o  $H_2O_2$  produzido é eliminado pela via ascorbato-glutationa, enquanto que, nos peroxissomos, glioxissomos e mitocôndrias, pelas catalases (CATs) (ANDERSON et al., 1995). Adicionalmente, peroxidases (POXs) e certas substâncias antioxidantes como o ascorbato e a glutathione podem participar dos mecanismos de defesa das plantas contra estresses oxidativos (KNÖRZER et al., 1996). Embora as atividades das POXs e das SODs tenham aumentado na presença do Al, CAKMAK e HORST (1991) verificaram a peroxidação dos lipídios em tecidos dos ápices de raízes de plantas de soja, o que sugere a participação desse elemento tóxico nos mecanismos de formação de radicais livres e, conseqüentemente, na deterioração das membranas.

O presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos tóxicos do Al sobre os sistemas metabólicos que controlam a produção e a eliminação de radicais livres e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática e dos tecidos do sistema radicular e da parte aérea em plantas de dois cultivares de sorgo com tolerância diferencial ao Al.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Na literatura, poucas informações são disponíveis quanto ao relacionamento direto entre a toxicidade provocada pelo Al, a produção de radicais livres e os danos às membranas das plantas (CAKMAK e HORST, 1991). Evidências indiretas, entretanto, sugerem que o Al, à semelhança de outros fatores estressantes, pode estimular a produção de radicais livres que, por sua vez, promovem a peroxidação dos lipídios das membranas, resultando em modificações na sua estrutura e nas suas funções (GUTTERIDGE et al., 1985).

Nas plantas, os radicais superóxidos ( $O_2^{\cdot -}$ ) podem ser produzidos em decorrência de diversas perturbações ambientais como, por exemplo, excesso de luz, seca, temperaturas elevadas, herbicidas, infecções causadas por patógenos e ozônio (NEUBAUER e YAMAMOTO, 1992 e SCANDALIOS, 1993). Caso não sejam rapidamente eliminados do metabolismo, os radicais livres podem reagir com ácidos graxos insaturados, causando sua peroxidação na membrana plasmática, nas membranas de organelas e em todo o sistema de endomembranas (SCANDALIOS, 1993).

A peroxidação dos lipídios tem início com a retirada de um átomo de hidrogênio das moléculas de ácidos graxos insaturados (BUEGE e AUST, 1978). O subsequente rearranjo das ligações duplas resulta na formação de dieno conjugado que, após o ataque por oxigênio molecular, produz radicais peroxi-lipídicos e endoperóxidos (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). A formação de endoperóxidos em ácidos graxos insaturados apresentando, pelo menos, três

metilenos interrompidos por ligações duplas pode resultar na formação de aldeído malônico (MDA), um produto da degradação dos lipídios (BUEGE e AUST, 1978). Outros efeitos citotóxicos dos aldeídos também são conhecidos. Além de reagirem com grupos sulfidrilas das enzimas provocando a sua inativação, os aldeídos podem reduzir a taxa de mitose em células e inibir a síntese de tubulinas, principais proteínas dos microtúbulos, necessárias à formação do fuso acromático (WILSON JR. e McDONALD JR., 1986).

A toxicidade provocada pelo Al pode modificar diversas características das membranas celulares. Segundo ZHAO et al. (1987), o Al tem a capacidade de alterar algumas propriedades físico-químicas da membrana plasmática e do tonoplasto, aumentando sua permeabilidade à uréia e aos seus derivados e, de modo contrário, reduzindo sua permeabilidade à água. Tais efeitos podem ser uma consequência direta da ligação do Al às regiões polares dos fosfolipídios (HUNTER e ETHERTON, 1989) ou, ainda, da reação do Al com proteínas da membrana (SUHAYADA e HAUG, 1986).

As células podem responder às alterações nos fatores ambientais por meio de modificações na composição lipídica das membranas, mudanças essas que parecem ser um reflexo de mecanismos específicos utilizados para restaurar e, ou, otimizar as propriedades físico-químicas das mesmas (LINDBERG e GRIFFITHS, 1993). ZHANG et al. (1996, 1997) relataram modificações na composição lipídica de microsomos e, também, de uma fração purificada da membrana plasmática isolada de ápices de raízes de cultivares de trigo com tolerância diferencial ao Al. Nesses trabalhos, algumas alterações nas classes de lipídios ficaram restritas apenas ao cultivar tolerante e, embora o significado das mesmas não tenha sido esclarecido pelos autores, eles concluíram que tais modificações podem ter contribuído de maneira significativa para a manutenção do crescimento radicular das plantas do cultivar tolerante sob condições de estresse por Al.

Diversas proteínas da membrana plasmática são ATPases ou hidrolases de ATP. Algumas dessas, como as H<sup>+</sup>-ATPases, por exemplo, são eletrogênicas,

ou seja, podem controlar a polarização da membrana plasmática através da formação de gradientes eletroquímicos utilizados como força dirigida para o transporte secundário de solutos (RYYPPÖ et al., 1994 e BRISKIN et al., 1995). A  $H^+$ -ATPase da membrana plasmática das plantas superiores é uma ATPase de transporte do “tipo P” e se caracteriza pela formação de intermediários fosforilados covalentes durante o processo de hidrólise do ATP (BRISKIN et al., 1995). Segundo COOKE e BURDEN (1990), a modulação da  $H^+$ -ATPase é resultante de alterações na composição dos lipídios das membranas, o que resulta na alteração da sua fluidez e, conseqüentemente, em mudanças na conformação e na atividade da enzima. Modificações na fluidez das membranas podem provocar alterações na atividade das ATPases em decorrência dos efeitos diretos do Al sobre as moléculas da proteína ou, ainda, sobre as interações entre os lipídios das membranas e as enzimas (SUHAYADA e HAUG, 1986 e LINDBERG e GRIFFITHS, 1993).

A interação do Al com lipídios e proteínas das membranas provoca a deterioração de sua integridade estrutural e o aumento da produção de radicais livres (GUTTERIDGE et al., 1985). Esses radicais podem promover a peroxidação dos lipídios das membranas, principalmente na presença de  $Fe^{2+}$  (CAKMAK e HORST, 1991). Em lipossomos preparados a partir de fosfolipídios de tecidos do sistema nervoso de ratos, GUTTERIDGE et al. (1985) observaram que o Al não estimulava diretamente a peroxidação dos lipídios, mas acelerava intensamente a peroxidação induzida pelo  $Fe^{2+}$ . Eles sugeriram, então, que o aumento na peroxidação dos lipídios provocado por radicais de oxigênio livres seria uma conseqüência dos efeitos primários do Al sobre a estrutura das membranas. O aumento na peroxidação dos lipídios como resultado da deficiência de  $Ca^{2+}$  pode ser interpretado nessa mesma linha de raciocínio, uma vez que o processo parece ser decorrente da liberação do  $Fe^{2+}$  dos sítios de troca, aumentando a produção de radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), o que ocorre por meio de reações do tipo "Harber-Weiss" ( $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} + Fe^{2+} \longrightarrow OH^- + \cdot OH + O_2$ ) (SCANDALIOS, 1993).

Segundo CAKMAK e HORST (1991), a peroxidação dos lipídios na presença do Al se manifesta posteriormente à redução do alongamento radicular e, apesar do estreito relacionamento entre esses dois processos, a peroxidação dos lipídios é, aparentemente, uma consequência dos efeitos primários do Al sobre a estrutura da membrana (HORST et al., 1992). Após tratamentos prolongados com Al, os ápices radiculares tornam-se escuros, o que pode indicar a oxidação de compostos fenólicos por quinonas citotóxicas. A toxicidade das quinonas é, aparentemente, mediada pela sua redução à semiquinona que, por autooxidação, forma  $O_2^{\cdot -}$  e outras espécies tóxicas de oxigênio (CAKMAK e HORST, 1991).

O sistema metabólico de proteção celular contra estresses oxidativos consiste de diversas enzimas e de substâncias antioxidantes (SCANDALIOS, 1993). O aumento da peroxidação dos lipídios em decorrência da toxicidade por Al pode ser acompanhado pelo monitoramento da produção de radicais de oxigênio livres e, ou, pelo estudo da atividade enzimática (CAKMAK e HORST, 1991). Diversas enzimas estão relacionadas aos mecanismos de proteção do protoplasma e da integridade celular (ANDERSON et al., 1995). Esta defesa enzimática inclui enzimas antioxidantes capazes de remover, neutralizar e, ou, mesmo, eliminar os radicais livres e compostos oxi-intermediários (SCANDALIOS, 1993). Dentre as principais enzimas, as peroxidases (POXs), as catalases (CATs), as dismutases dos superóxidos (SODs), as oxidases dos polifenóis (POLs) e as enzimas do sistema ascorbato-glutationa são aquelas que têm recebido maior atenção no que concerne a esses mecanismos de proteção (KUMAR e KNOWLES, 1993).

As POXs compreendem diversas isoenzimas que diferem na especificidade pelo substrato, na composição aminoacídica e na localização nos tecidos das plantas (QUESADA et al., 1990). A atividade das POXs é, freqüentemente, aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das principais funções da enzima (ASADA, 1992 e SIEGEL, 1993). Segundo GASPAR et al.(1985), o aumento na atividade de

POXs básicas não resulta da síntese *de novo*, mas da ativação de enzimas preexistentes nos tecidos. Em contraste, as POXs ácidas rapidamente incorporam aminoácidos marcados, indicando alta taxa de giro. As maiores atividades de POXs ácidas são detectadas nas paredes celulares, sendo que a parede primária representa a matriz na qual ocorre a lignificação. Entretanto, as POXs não estão associadas somente às paredes celulares, mas, também, às membranas, organelas e ao citossol (GASPAR et al., 1985 e SIEGEL, 1993).

As POXs podem ser secretadas no espaço livre aparente, paralelamente ao efluxo de compostos fenólicos, prováveis precursores da lignina (GASPAR et al., 1985). POXs básicas podem atacar doadores de elétrons usando radicais de peróxidos livres como substrato e, dessa forma, atuar como agentes de desintoxicação (GASPAR et al., 1985). As POXs também podem degradar o ácido indolacético (AIA) e o ácido carboxílico aminociclopropano (ACC), precursor do etileno. Os níveis de AIA-livre resultam da atividade do sistema AIA-oxidase que, por sua vez, regula os níveis de ACC pelo controle da conversão do S-adenosil metionina (SAM) em ACC. As ACC-oxidases são POXs associadas às membranas e podem regular diretamente a produção de etileno. O principal papel do etileno parece ser de regulador da atividade das amônia liases da fenilalanina (PALs) e, também, das POXs ácidas que controlam os processos de lignificação (GASPAR et al., 1985).

As reações catalisadas por peroxidases do guaiacol (GPXs) são caracterizadas pela baixa especificidade em relação ao composto doador de elétrons, podendo utilizar guaiacol e, ou, pirogalol para esse fim (ASADA, 1992). Em contraste, as peroxidases do ascorbato (APXs) possuem alto grau de especificidade para o ácido ascórbico como doador de elétrons (NAKANO e ASADA, 1981), embora compostos fenólicos também possam ser utilizados como substratos da enzima (ASADA, 1992 e AMAKO et al., 1994). Ao contrário das GPXs, que participam de processos fisiológicos relacionados à lignificação, degradação do AIA e síntese de etileno, por exemplo, as APXs estão envolvidas em mecanismos de eliminação do  $H_2O_2$  e de hidroperóxidos

orgânicos, principalmente nos plastídios, onde a participação das catalases (CATs) é pouco provável (ASADA, 1992 e AMAKO et al., 1994). O ascorbato oxidado na catálise enzimática é regenerado pela ação das enzimas mono- e di-hidroascorbato redutase e glutathione redutase (ASADA, 1992).

Em termos da localização subcelular, três isoenzimas das APXs foram identificadas: a APX ligada às membranas dos tilacóides, a APX solúvel no estroma e a APX solúvel no citossol (AMAKO et al., 1994). As duas primeiras estão envolvidas na eliminação do  $H_2O_2$  produzido durante a etapa fotoquímica da fotossíntese, mas o papel fisiológico da APX citossólica ainda não foi elucidado (AMAKO et al., 1994). Segundo KOSHIBA (1993), a APX citossólica é abundante em tecidos jovens de milho, tais como, coleóptilos, mesocótilos, folhas e raízes, sendo encontrada, contudo, somente em quantidades reduzidas nas folhas verdes, o que foi comprovado por testes imuno-histoquímicos.

As catalases (CATs), oxidoredutases que ocorrem em formas múltiplas nos tecidos vegetais, são utilizadas em mecanismos enzimáticos primários por organismos aeróbicos para a decomposição do  $H_2O_2$  (SIEGEL, 1993). As CATs são encontradas em glioxissomos durante a germinação das sementes e, principalmente, em peroxissomos, onde elimina o  $H_2O_2$  formado pela oxidação do glicolato na fotorrespiração (HAVIR e McHALE, 1987). A ação combinada das CATs e das dismutases do superóxido (SODs) resulta na conversão dos radicais  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$ , potencialmente perigosos, em água e oxigênio molecular (SCANDALIOS, 1993). Nas células vegetais, o  $H_2O_2$  pode ser metabolizado pelas CATs e, ou, por peroxidases (POXs), mas, em função da localização subcelular muito restrita e da baixa afinidade pelo substrato, a participação das CATs nos mecanismos de eliminação desse radical torna-se limitada (CAKMAK et al., 1993 e SIEGEL, 1993). As CATs são enzimas bastante sensíveis à fotoinativação e à degradação (FOYER et al., 1994). O excesso de  $H_2O_2$  decorrente da ruptura de peroxissomos no meio celular e, ou, ainda, da sua remoção muito lenta do metabolismo pode, rapidamente, promover a inativação oxidativa da enzima (Del LONGO et al., 1993 e ANDERSON et al., 1995).

As CATs podem decompor o  $\text{H}_2\text{O}_2$  diretamente a oxigênio e água e, também, oxidar outros substratos (HAVIR e McHALE, 1987). Na reação peroxidativa não há evolução de oxigênio, mas algum receptor é oxidado (SIEGEL, 1993). A quebra catalítica do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio pela ação das CATs é, meramente, um caso especial de reação peroxidativa em que o peróxido serve tanto como substrato quanto como receptor. A observação das CATs exibindo atividade peroxidativa tem levado à hipótese das POXs serem monômeros ou, então, variações da mesma proteína da molécula tetramérica das CATs (SIEGEL, 1993). Contudo, o produto final da reação catalisada por essas duas enzimas é bastante diferente. A ação das POXs resulta na produção de radicais livres potencialmente tóxicos ao metabolismo celular, enquanto a das CATs resulta na produção de oxigênio, espécie química de baixa reatividade (SIEGEL, 1993).

Na maior parte dos trabalhos, os mecanismos de resposta das plantas aos estresses provocam o aumento da atividade das POXs e a redução da atividade das CATs (CAKMAK e HORST, 1991 e SIEGEL, 1993). Em folhas normais ou destacadas de arroz, KAR e MISHRA (1976) observaram que a atividade das CATs decresce, enquanto as atividades das POXs e das oxidases dos polifenóis (POLs) aumentam durante a senescência. Segundo PICHORNER et al. (1992), as CATs controlam os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células pela sua redução à água, podendo utilizar, também, fenóis como doadores de elétrons. Acredita-se que na presença de compostos fenólicos, tais como, álcool coniferil, álcool sinapil e álcool *p*-cumaril, essa reação promova a síntese de lignina (PICHORNER et al., 1992). Durante o tratamento de plantas com Al, a atividade das POXs geralmente aumenta, enquanto a das CATs diminui. Segundo considerações de CAKMAK e HORST (1991), esse comportamento indica que, em raízes tratadas com Al, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é consumido muito mais em eventos de oxidação como, por exemplo, na peroxidação dos lipídios, do que em processos de desintoxicação.

As dismutases do superóxido (SODs) fazem parte de uma família de metaloenzimas que catalisam a conversão do  $\text{O}_2^{\cdot -}$  a oxigênio molecular e  $\text{H}_2\text{O}_2$



(GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). Nas plantas superiores, coexistem três isoenzimas que são classificadas de acordo com o íon metálico presente no sítio ativo: Cu/ZnSOD, MnSOD e FeSOD (SCANDALIOS, 1993). Essas enzimas estão distribuídas em diferentes compartimentos subcelulares, presumivelmente devido aos riscos dos radicais  $O_2^{\cdot -}$  atravessarem as membranas, em razão da sua elevada reatividade (BOWLER et al., 1994). A Cu/ZnSOD, principal enzima existente em plantas, é inativada por cianeto e por excesso de  $H_2O_2$  (SCANDALIOS, 1993).

O radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) e os seus derivados, radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) e oxigênio "singlet" ( $^1O_2$ ), são, reconhecidamente, os principais causadores de danos peroxidativos aos componentes celulares (SCANDALIOS, 1993). Os radicais  $O_2^{\cdot -}$  transformam-se espontaneamente em  $H_2O_2$ , porém a reação é muito mais efetiva se for catalisada pelas SODs (SCANDALIOS, 1993). A ação conjunta das SODs e das CATs reduz o risco da formação de  $\cdot OH$ , espécie química de elevada reatividade (SCANDALIOS, 1993). Entretanto, o  $H_2O_2$  produzido representa uma outra espécie potencialmente tóxica que deve ser, da mesma forma, rapidamente eliminada do metabolismo (FOYER et al., 1994). A ação combinada das SODs, das CATs e de POXs de diversos tipos na presença de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato, por exemplo, pode efetivamente eliminar, varrer e, ou, imobilizar espécies tóxicas de oxigênio (SCANDALIOS, 1993 e SIEGEL, 1993).

As SODs funcionam, portanto, como primeira linha de defesa celular contra a oxidação dos lipídios das membranas (SCANDALIOS, 1993). Em seguida, as CATs, enzimas que apresentam elevado giro, poderiam destruir o  $H_2O_2$  formado. Contudo, em razão de seu peso molecular elevado (248 kDa), da mobilidade difusional limitada (FOYER et al., 1994) e da baixa afinidade pelo substrato (CAKMAK et al., 1993), sua eficiência na remoção desses peróxidos é menor que a das POXs (32,5 a 42,0 kDa). Como as SODs, as CATs e as POXs são importantes enzimas do sistema de defesa das plantas contra radicais de oxigênio livres, o aumento da atividade dessas enzimas pode ser considerado uma evidência circunstancial da produção desses radicais (CAKMAK e HORST, 1991).

A atividade das oxidases dos polifenóis (POLs) também tem sido utilizada como parâmetro de avaliação da peroxidação de lipídios e da produção de compostos fenólicos (MAYER, 1987). Essas enzimas catalisam a *o*-hidroxilação de monofenóis e a oxidação de *o*-difenois para *o*-diquinonas (VAUGHN e DUKE, 1984). Compostos fenólicos são substâncias que apresentam pelo menos um grupo hidroxila ou um derivado funcional ligado a um sistema de anel aromático (HESS, 1975). Os compostos fenólicos são classificados em quatro grupos: os fenóis simples, que apresentam um anel aromático e uma ou mais hidroxilas; os fenóis de ácidos carboxílicos, grupo ao qual pertence o ácido gálico; os fenóis derivados dos fenilpropanos, que incluem os ácidos cinâmicos, as cumarinas e as ligninas e; os fenóis derivados da flavana, que englobam, dentre outros, os flavanóides e as antocianinas (HESS, 1975). A biossíntese desses compostos pode seguir três rotas básicas: a rota do chiquimato, mais importante para vegetais superiores; a rota do acetato-malonato, utilizada para a síntese de anéis aromáticos e flavana e; a rota do acetato-mevalonato, relacionada à formação de terpenos cíclicos (HESS, 1975).

As POLs, enzimas que apresentam cobre na sua estrutura, ocorrem no estado latente ou em formas múltiplas (SIEGEL, 1993). Essas enzimas são codificadas por genes nucleares e, nas folhas, encontram-se associadas às membranas dos tilacóides (MAYER, 1987 e SIEGEL, 1993). A sua atividade tem sido, em alguns casos, atribuída às POXs, uma vez que ambas podem oxidar os mesmos tipos de substratos (VAUGHN e DUKE, 1984). Embora a ocorrência da atividade de POXs e de POLs não seja comum em uma mesma planta, KAR e MISHRA (1976) verificaram o aumento da atividade dessas enzimas em folhas de plantas de arroz durante a senescência. Em plantas de *Vicia faba*, a ativação da catecol oxidase latente pode ser obtida tanto pela redução do pH quanto pela liberação de ácidos graxos livres (MAYER, 1987). O mesmo ocorre quando a enzima é isolada a partir de tilacóides de folhas de espinafre, onde o ácido linolênico pode promover a reativação completa da atividade da enzima, que é perdida durante os procedimentos de extração (MAYER, 1987).

lipídios das membranas é o das lipoxigenases (LOXs) (KUMAR e KNOWLES, 1993). As LOXs fazem parte de uma classe de dioxigenases que apresentam ferro do tipo não-heme na sua estrutura (GEERTS et al., 1994). Essas enzimas catalisam a dioxigenação de ácidos graxos insaturados contendo grupamentos 1,4-*cis-cis*-pentadieno, produzindo monohidroperóxidos *cis-trans* conjugados (AXELROD et al., 1981 e SANZ et al., 1992). As quebras subseqüentes dos hidroperóxidos geram grupos carbonílicos susceptíveis à isomerização, à polimerização e à produção de radicais livres (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990 e BOWSHER et al., 1992). As LOXs estão amplamente distribuídas na natureza numa grande variedade de plantas superiores (BENEYTOUT et al., 1989). A sua atividade tem sido relacionada aos processos de envelhecimento dos tecidos de animais e de vegetais, à defesa contra ataque de patógenos e pragas e, também, à síntese de moléculas regulatórias como o ácido jasmônico, o metil jasmonato e o ácido abscísico (GEERTS et al., 1994).

A maior parte das LOXs mostra preferência por ácidos graxos livres e apresenta baixa reatividade a formas esterificadas (BARCLAY e McKERSIE, 1994). Os ácidos linoléico e linolênico, substratos preferenciais para as LOXs, são, também, importantes constituintes dos fosfolipídios das membranas plasmáticas dos vegetais. A liberação de ácidos graxos livres catalisada pelas fosfolipases parece ser um pré-requisito obrigatório para a ação das LOXs (KUMAR e KNOWLES, 1993). A localização subcelular das LOXs é duvidosa, mas acredita-se que essas enzimas tenham estreito relacionamento com as membranas (ROUET-MAYER et al., 1992), embora sejam encontradas, também, solúveis no citoplasma (BOWSHER et al., 1992). Segundo CHÉOUR et al. (1992), o aumento da atividade específica das LOXs ocorre paralelamente à elevação na concentração relativa de ácidos graxos insaturados.

As amônia liases da fenilalanina (PALs) catalisam a conversão da L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico na primeira etapa da rota dos fenilpropanóides, a via metabólica que fornece precursores para a biossíntese de flavanóides, lignina, protetores contra raios UV, compostos fenólicos, taninos e fitoalexinas (SNOWDEN et al., 1995 e DOUGLAS, 1996). O metabolismo dos

fenilpropanóides é ativado em resposta a diversos fatores ambientais e, principalmente, sob condições de estresse. A ocorrência de correlação positiva entre a atividade das PALs e a biossíntese de precursores de lignina, flavanóides e outros fenilpropanóides tem levado os pesquisadores a sugerirem que essas enzimas representam o principal ponto de controle da síntese de compostos secundários (JONES, 1984). WHETTEN e SEDEROFF (1995), contudo, relataram que, em plantas transgênicas de fumo, a redução na atividade das PALs não apresenta grande influência sobre o acúmulo de lignina.

Diversas isoenzimas da PAL têm sido identificadas. A expressão dessas isoenzimas é controlada por uma família de genes que são regulados de maneira diferente em cada órgão da planta e, também, em função da intensidade e duração do estresse (JONES, 1984). Segundo DOUGLAS (1996), os genes da via chiquimato-aminoácidos aromáticos e, também, os do metabolismo dos fenilpropanóides são regulados ao nível de transcrição. Em raízes de trigo, um gene induzido por Al codifica uma proteína com alta homologia para as PALs (SNOWDEN e GARDNER, 1993 e SNOWDEN et al., 1995). Contudo, existem evidências de que o cinamato, produto final da reação catalisada pelas PALs, e, também, outros derivados do hidroxicinamato podem alterar o nível de resposta das enzimas (CAMPBELL e ELLIS, 1992). Uma possibilidade levantada por JONES (1984) é de que o cinamato poderia afetar o processamento e, ou, a tradução dos mRNAs das PALs, uma vez que a aplicação exógena de intermediários do ciclo inibe e, ou, reduz a atividade das enzimas. O significado fisiológico da inibição da atividade das PALs pelo produto final depende da concentração local e da compartimentalização. Como o aumento inicial da atividade da enzima resulta, geralmente, no incremento da produção de cinamato, a existência de algum mecanismo de quebra proteolítica deve ser considerada (JONES, 1984). A presença de anéis aromáticos hidrofóbicos, de ligações duplas e de grupos carboxílicos em derivados sintéticos do cinamato parece ser essencial à manutenção da atividade inibitória das PALs (SATO et al., 1982). Resultados de vários estudos indicam que, além da fenilalanina, as enzimas em

monocotiledôneas podem utilizar a tirosina como substrato (RÖSLER et al., 1997). Segundo RÖSLER et al. (1997), diversos fatores podem regular a concentração desses aminoácidos aromáticos no citossol, principalmente a expressão diferencial das enzimas desidratases e desidrogenases do arogenato ou, ainda, a contribuição diferencial das rotas plastídicas e citossólicas do corismato para a fenilalanina e tirosina.

A lignina é uma substância natural formada pela polimerização de diversos monômeros de fenilpropanóides, sistemas aromáticos derivados da fenilalanina aos quais se ligam três átomos de carbono (LEWIS e YAMAMOTO, 1990). Os compostos intermediários da biossíntese de lignina são produzidos pela via do ácido chiquímico que também é utilizada na síntese dos aminoácidos aromáticos (DIXON e PAIVA, 1995). A produção dos monolignóis, álcoois hidroxicinâmicos, precursores imediatos da lignina, envolve duas etapas enzimáticas catalisadas pelas redutases dos ésteres cinâmílicos-CoA (CCRs) e pelas desidrogenases dos álcoois cinâmílicos (CADs). A oxidação dos álcoois hidroxicinâmicos é catalisada por POXs e, ou, por POLs, resultando na produção de radicais fenóxi-mesoméricos que reagem espontaneamente durante a deposição da lignina na parede celular (TAKAHAMA et al., 1996 e SATO et al., 1997). Embora a atividade das CADs seja observada também em tecidos não lignificados, a participação dessas enzimas na última etapa do processo de biossíntese de lignina torna-as marcadoras específicas da lignificação (DOUGLAS, 1996). A atividade das CADs é, geralmente, aumentada sob condições de estresse, o que resulta num maior acúmulo de lignina (MITCHELL et al., 1994). A deposição de lignina ocorre, freqüentemente, como parte da resposta das plantas a vários tipos de estresses. Esse importante componente estrutural da parede serve, também, como mecanismo de proteção das células contra o excesso de radicais de oxigênio livres, que são consumidos em reações de peroxidação na etapa final da polimerização e deposição da lignina na parede celular (SIEGEL, 1993).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos, utilizaram-se dois cultivares híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) procedentes do Centro Nacional de Pesquisas do Milho e do Sorgo (CNPMS/EMBRAPA), localizado em Sete Lagoas, MG, sendo um tolerante (BR006R) e o outro sensível (BR007A) ao Al.

As sementes, após esterilização superficial com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v) durante 15 min, foram lavadas com água desmineralizada e, então, colocadas para germinar em cartuchos de papel do tipo germiteste, pH neutro, imersos em béqueres contendo solução nutritiva de CLARK (1975) a um terço da concentração original, sob aeração constante. Os béqueres, cobertos com sacos plásticos, foram mantidos em sala de crescimento com densidade de fluxo luminoso de  $230 \mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . Após sete dias, as plântulas foram selecionadas e transferidas para vasos de polietileno pintados externamente de preto contendo 1,6 litros de solução nutritiva de CLARK (1975), pH 4,0, na presença ou não do Al. As plântulas foram cultivadas em sala de crescimento, nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Nos tratamentos com Al, as plântulas de ambos os cultivares foram submetidas à concentração de 0,185 mM, na forma de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$ . As correções do pH e do volume das soluções foram efetuadas diariamente. Para o experimento de isolamento das membranas, as plântulas foram previamente

cultivadas por cinco dias em solução nutritiva de CLARK (1975), pH 4,0, antes de serem submetidas aos tratamentos com Al.

Após dez dias de cultivo, as plantas foram coletadas, lavadas em água desmineralizada e subdivididas em parte aérea e sistema radicular. Amostras frescas desses tecidos foram removidas para serem utilizadas nos experimentos.

### **3.1. Isolamento e purificação da membrana plasmática**

Frações purificadas da membrana plasmática foram obtidas a partir de tecidos do sistema radicular de ambos os cultivares, utilizando-se o método proposto por LARRSON et al. (1987), que consiste no isolamento das membranas pela partição da fração microssomal em um sistema aquoso de duas fases de polímeros. Amostras de raízes pesando 5 g para os experimentos com ápices radiculares (menores que 2,5 cm) e 25 g para os experimentos com o sistema radicular completo (do ápice das raízes até o colo da planta) foram trituradas com N<sub>2</sub> líquido em almofariz de porcelana na presença de meio de homogeneização constituído de sacarose 250 mM, EDTA 2 mM e ditiotreitól 1 mM em tampão de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, na proporção de 4 ml por g de matéria fresca. O material obtido foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, posteriormente, centrifugado a 10.000 xg por 10 min, descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 30.000 xg por 1 h, coletando-se, em seguida, o precipitado. O resíduo foi ressuspensão em 1,2 ml de meio de preparação constituído de sacarose 330 mM e KCl 3 mM em tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,8, originando a fração microssomal. Em seguida, 1 ml dessa fração foi adicionado a 7 g de um sistema aquoso de duas fases de polímeros constituído de Dextran T-500 6,2% (p/p), polietileno glicol (PEG-6000) 6,2% (p/p), sacarose 330 mM e KCl 3 mM em tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,8 (WIDELL et al., 1982 e LARSSON et al., 1987). O sistema foi submetido a várias inversões e, em seguida, centrifugado a 1.500 xg por 5 min em rotor do tipo “balde-oscilante”. Cerca de 90% da fase superior (S<sub>1</sub>)

foi cuidadosamente removida com pipeta de Pasteur e, então, adicionada a 4 ml de uma fase inferior preparada segundo a metodologia de WIDELL et al. (1982). O esquema foi repetido por mais duas vezes, obtendo-se as fases superiores S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>. Após a diluição da fase S<sub>3</sub> com 8 ml de solução contendo sacarose 330 mM em tampão de fosfato de potássio 5 mM, pH 7,8, submeteu-se o sistema à ultracentrifugação a 75.000 xg durante 1 h. O resíduo obtido foi ressuspenso em 1,6 ml da mesma solução anterior e constituiu a fração purificada das membranas plasmáticas. Todas as etapas necessárias aos processos de extração e de purificação das membranas foram realizadas a 4°C.

### **3.2. Determinação da atividade da H<sup>+</sup>-ATPase**

A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por BOURGEADE e BOYER (1994), porém com modificações. Vinte µl de fração purificada da membrana plasmática foram adicionados ao meio de reação constituído de sacarose 125 mM, KCl 50 mM, MgSO<sub>4</sub>-ATP 3 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0,1 mM e Triton X-100 0,02% (v/v) em tampão de Tris-Mes 30 mM, pH 6,5, num volume final de 0,5 ml, que foi incubado a 28°C. Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de 3,5 ml de solução contendo sódio duodecil sulfato (SDS) 7,0% (p/v) e (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4,17 mM em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,6 N. Para a determinação da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado, adicionou-se, então, 1,0 ml de uma solução de SnCl<sub>2</sub> 4,44 mM e (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30,8 mM em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,6 N (WINGSTRAND e LINDBERG, 1982). O teor de proteína nas alíquotas da fração purificada da membrana plasmática foi determinado pelo método de MARKWELL et al. (1978). A atividade da H<sup>+</sup>-ATPase foi expressa em µmoles de Pi liberado por hora e por mg de proteína.



### **3.3. Determinação da composição dos ácidos graxos**

#### **3.3.1. Na fração purificada das membranas plasmáticas**

À alíquota de 1 ml da fração purificada das membranas plasmáticas foram adicionados, seqüencialmente, 5 ml de isopropanol fervente, 5 ml de metanol, 20 ml de clorofórmio, 45 µl de butil-hidroxitoluol (BHT) em clorofórmio 0,5 % (p/v) e 0,216 mg de heptadecanoato como padrão interno (PALTA et al., 1993 e RYYPÖ et al., 1994). Os tubos foram, então, fechados sob fluxo de N<sub>2</sub> e agitados a 4°C por 1 h. Em seguida, sob sucção leve, a solução foi filtrada para se retirar os materiais insolúveis. Os contaminantes solúveis em água foram removidos por meio do seguinte procedimento: inicialmente, adicionaram-se 6 ml de solução contendo KCl 0,37% (p/v) em clorofórmio:metanol:água (3:48:47, v/v). A mistura foi vigorosamente agitada e, então, centrifugada a 1.500 xg por 10 min para facilitar a separação das fases. A fase superior foi descartada sob sucção e, em seguida, a interface foi lavada por 3 vezes com a mesma solução de clorofórmio:metanol:água (3:48:47, v/v), exceto pela exclusão do KCl. À fase inferior, contendo os fluidos de lavagem remanescentes, foram adicionados 15 ml de metanol, o que possibilitou a formação de uma fase única após a homogeneização do sistema (FOLCH et al., 1957). A solução obtida contendo os lipídios totais da membrana foi evaporada a vácuo. O material evaporado foi solubilizado com 1,5 ml de clorofórmio. Os ácidos graxos dos lipídios totais da fração purificada da membrana plasmática foram, então, liberados por hidrólise alcalina após a adição de 1 ml de KOH-metanólico 0,5 M e do subsequente aquecimento a 100°C durante 5 min (JHAM et al., 1982). A esterificação dos ácidos graxos foi efetuada pela adição de 400 µl da mistura de HCl concentrado:metanol (4:1, v/v) e do aquecimento a 100°C por mais 15 min. Em seguida, após o resfriamento e adição de 2 ml de água a cada tubo de ensaio contendo os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAGs), efetuou-se a sua extração com 3 ml de éter de petróleo. Os EMAGs, após nova

extração com 3 ml de éter de petróleo, foram submetidos à “secagem” sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -anidro (JHAM et al., 1982). O solvente foi evaporado a vácuo e os EMAGs remanescentes foram, então, solubilizados em 1,0 ml de hexano. Em seguida, os EMAGs foram analisados pelo método do padrão interno em cromatógrafo a gás (Shimadzu, 9-AM) equipado com integrador de área (Shimadzu, C-R6A), detector de ionização de chama e coluna capilar de 30 m x 0,25 mm (d.i.) de Carbowax-20M 10%. A temperatura da coluna foi programada para aumentar de 150 a 200°C, numa taxa de 2°C por min, mantendo-se a 200°C por 15 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 200 e 250°C, respectivamente. O gás de arraste foi o nitrogênio a 50  $\text{cm}^3\text{min}^{-1}$ , sendo os EMAGs individuais identificados pela comparação com padrões autênticos.

Após a obtenção dos resultados, foram calculados o índice de ligações duplas para ácidos graxos com dezoito carbonos ( $\text{ILD}_{\text{C18}} = \% \text{mol} [18:1 + (18:2 \times 2) + (18:3 \times 3)] / 100$ ) e as relações entre os conteúdos de ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados ( $\text{AGI/AGS} = \% \text{mol} [16:1 + 18:1 + (18:2 \times 2) + (18:3 \times 3)] / \% \text{mol} (16:0 + 18:0)$ ), ácido linoléico/ácido palmítico (18:2/16:0) e ácido linoléico/ácido linolênico (18:2/18:3) (PALTA et al., 1993 e RYYPOÖ et al., 1994).

### **3.3.2. Nos tecidos radiculares**

A composição de ácidos graxos dos lipídios totais de tecidos radiculares das plantas foi determinada utilizando-se o procedimento proposto por FOLCH et al. (1957). Amostras de raízes apresentando 2,5 g de tecidos foram homogeneizadas com  $\text{N}_2$  líquido por 10 min em almofariz de porcelana e extraídas com 50 ml de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) adicionado de 0,2 ml de BHT 0,5% (p/v) em clorofórmio e 1,080 mg de heptadecanoato como padrão interno. As amostras foram filtradas sob sucção leve e, então, submetidas aos mesmos procedimentos descritos no item 3.3.1 desta seção, objetivando-se a retirada dos contaminantes solúveis em água (FOLCH et al., 1957). A solução obtida contendo os lipídios totais dos tecidos radiculares foi, então, evaporada a

vácuo. O material evaporado foi solubilizado em 1,5 ml de clorofórmio, sendo os lipídios totais submetidos à hidrólise alcalina e à esterificação para a obtenção dos EMAGs da mesma maneira descrita no item 3.3.1 desta seção (JHAM et al., 1982). Em seguida, os EMAGs foram analisados pelo método do padrão interno em cromatógrafo a gás (Varian, 2100) equipado com integrador de área (Shimadzu, C-R6A), detector de ionização de chama e coluna de 2 m x 2 mm (d.i.) de FFAP 20% em Chromosorb W 60/80. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector foram mantidas em 200, 220 e 230°C, respectivamente. O gás de arraste foi o nitrogênio a 20 cm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>, sendo os EMAGs individuais identificados pela comparação com padrões autênticos.

Após a obtenção dos resultados, também foram calculados o índice de ligações duplas para ácidos graxos com dezoito carbonos ( $ILD_{C18} = \%mol [18:1+(18:2 \times 2)+(18:3 \times 3)]/100$ ) e as relações entre os conteúdos de ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados ( $AGI/AGS = \%mol [16:1+18:1+(18:2 \times 2)+(18:3 \times 3)]/\%mol (16:0+18:0)$ ), ácido linoléico/ácido palmítico (18:2/16:0) e ácido linoléico/ácido linolênico (18:2/18:3) (PALTA et al., 1993 e RYYPOÖ et al., 1994).

### **3.4. Determinação da peroxidação dos lipídios**

#### **3.4.1. Formação do complexo MDA-TBA**

##### **3.4.1.1. Na fração purificada das membranas plasmáticas**

A peroxidação dos lipídios foi medida pela determinação da quantidade formada de malonaldeído (MDA), um produto final da peroxidação dos lipídios, utilizando-se o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) (HEATH e PACKER, 1968). À alíquota de 20 µl da fração purificada da membrana plasmática foram adicionados, sequencialmente, 0,1 ml de BHT 0,22% (p/v) em etanol, 1,5 ml de tampão de glicina-HCl 0,2 M, pH 3,6, 1,5 ml de reagente TBA 0,5% (p/v), contendo SDS 0,3% (p/v) e 0,1 ml de solução de FeCl<sub>3</sub>.6 H<sub>2</sub>O 0,27% (p/v). Os tubos de ensaio foram fechados e, em seguida, aquecidos por 15 min a 95°C.

Após o aquecimento, os tubos foram resfriados em gelo e, então, adicionaram-se 1 ml de ácido acético glacial e 2 ml de clorofórmio (ASAKAWA e MATSUSHITA, 1980). A mistura foi agitada vigorosamente e, em seguida, centrifugada por 5 min a 1.500 xg. A absorvância do sobrenadante a 532 nm foi subtraída do valor obtido a 660 nm, relativo à absorção não específica. Um “branco” foi conduzido paralelamente, no qual a alíquota de 20 µl da fração purificada das membranas plasmáticas não foi adicionada. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (HEATH e PACKER, 1968).

#### **3.4.1.2. Nos tecidos radiculares e na parte aérea**

A peroxidação dos lipídios foi determinada segundo a metodologia de CAKMAK e HORST (1991). Tecidos do sistema radicular e da parte aérea pesando 0,2 g foram homogeneizados com 4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v) em almofariz de porcelana. O material obtido foi filtrado através de quatro camadas de gaze e centrifugado por 15 min a 12.000 xg. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Em seguida, alíquotas de 1 ml dos sobrenadantes foram adicionadas a 3 ml de TBA 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria por 2 h a 95°C, sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 xg por 10 min, sendo a absorvância dos sobrenadantes lida a 532 e 660 nm. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (HEATH e PACKER, 1968).

#### **3.4.2. Produção de aldeídos voláteis**

Aldeídos voláteis foram determinados pela metodologia desenvolvida por HARMAN et al. (1982), porém com modificações (SANTOS et al., 1993). Para a extração dos aldeídos, foram adicionados 0,2 g de tecidos do sistema

radicular e da parte aérea aos tubos de ensaio contendo 5 ml de etanol 2% (v/v). Os tubos foram fechados e agitados durante 2 h a 25°C. Posteriormente, alíquotas de 1 ml foram removidas para tubos de ensaio contendo 1 ml de 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) 0,1% (p/v), adicionando-se, então, 2,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,23% (p/v). Após 5 min de incubação, adicionaram-se 6,0 ml de acetona e, em seguida à agitação dos tubos, as absorvâncias das amostras foram lidas a 635 nm. A quantidade de aldeídos voláteis liberados pelas amostras foi expressa em termos da massa de formaldeído produzido, que foi utilizado como padrão numa curva de calibração (REIS et al., 1989).

### **3.5. Determinação da atividade enzimática**

#### **3.5.1. Peroxidases (POXs, EC 1.11.1.7)**

O extrato enzimático bruto, para a determinação da atividade das POXs, foi obtido pela homogeneização de 0,2 g de tecidos frescos do sistema radicular e da parte aérea com 10 ml de solução de extração constituída de EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, num almofariz de porcelana. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, então, centrifugado por 20 min a 12.000 xg. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C.

A atividade das POXs nos tecidos do sistema radicular e da parte aérea foi determinada pelo método de KAR e MISHRA (1976). Alíquotas de 100 µl do extrato enzimático bruto diluído para 1:25 (v/v) com solução de extração foram adicionadas a 4,9 ml de uma mistura de reação contendo tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM. Após incubação da solução por 1 min a 25°C, a reação foi interrompida pela adição 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (v/v) e a absorvância da solução, então, lida a 420 nm contra um “branco” em que enzima foi previamente inativada pela adição de 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (v/v). A atividade das POXs foi determinada pela medição da quantidade de purpurogalina formada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (CHANCE e MAEHLEY, 1955).

### **3.5.2. Peroxidases do ascorbato (APXs, EC 1.11.1.11)**

Para a obtenção do extrato enzimático bruto do sistema radicular e da parte aérea das plantas, 0,2 g de tecidos frescos foram macerados num almofariz de porcelana com 4 ml de solução de extração constituída de ascorbato 1 mM e EDTA 1 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 (NAKANO e ASADA, 1981). O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, então, centrifugado por 15 min a 12.000 xg. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas necessárias à obtenção do extrato enzimático bruto foram executadas a 4°C.

A atividade das APXs foi determinada de acordo com o método de NAKANO e ASADA (1981), porém modificado por KOSHIBA (1993). Aos 2,9 ml da mistura de reação constituída de ascorbato 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, adicionaram-se 100 µl do extrato enzimático bruto. O experimento, iniciado pela adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à mistura de reação, teve o decréscimo na absorvância das amostras a 290 nm registrado no intervalo de 20 a 40 segundos após a sua incorporação. A atividade da enzima foi determinada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (NAKANO e ASADA, 1981).

### **3.5.3. Catalases (CATs, EC 1.11.1.6)**

O extrato enzimático bruto, para a determinação da atividade das CATs, foi obtido pela homogeneização de 0,2 g de tecidos frescos do sistema radicular e da parte aérea com 10 ml de solução de extração constituída de EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, num almofariz de porcelana. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, então, centrifugado por 20 min a 12.000 xg. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C.

A atividade das CATs nos tecidos do sistema radicular e da parte aérea foi determinada após a adição de 100 µl do extrato enzimático bruto a 2,9 ml de

meio de reação constituído de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, a 30°C (HAVIR e McHALE, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (ANDERSON et al., 1995).

#### **3.5.4. Dismutases do superóxido (SODs, EC 1.15.1.1)**

O extrato enzimático bruto, para a determinação da atividade das SODs, foi obtido pela homogeneização de 0,2 g de tecidos frescos do sistema radicular e da parte aérea com 10 ml de solução de extração constituída de EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, num almofariz de porcelana. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, então, centrifugado por 20 min a 12.000 xg. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C.

À mistura de reação constituída de metionina 13 mM, azul de *p*-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 100 nM e riboflavina 2 µM em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8 (Del LONGO et al., 1993) adicionaram-se 50 µl do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25°C numa câmara de reação sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. A reação foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente e, após 5 min, interrompida pelo desligamento da mesma (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). A produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, foi medida pela determinação do incremento na absorvância a 560 nm, que foi subtraído de um “branco” no qual a mistura de reação foi mantida no escuro. Uma unidade das SODs foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP e FRIDOVICH, 1971).

### **3.5.5. Oxidases dos polifenóis (POLs, EC 1.10.3.2, EC 1.10.3.1 e EC 1.14.18.1)**

A atividade das POLs nos tecidos do sistema radicular e da parte aérea foi determinada utilizando-se a mesma metodologia empregada para a medição da atividade das POXs (KAR e MISHRA, 1976). A obtenção do extrato enzimático bruto, as diluições, o tempo de incubação, a forma de interrupção da reação e a concentração dos componentes do meio de reação foram, também, os mesmos utilizados no experimento das POXs, exceto pela exclusão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  do meio de incubação. A atividade das POLs foi determinada a 420 nm pela medição da quantidade de purpurogalina formada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (CHANCE e MAEHLEY, 1955).

### **3.5.6. Lipoxigenases (LOXs, EC 1.13.11.12)**

O extrato enzimático bruto, para a determinação da atividade das LOXs, foi obtido pela homogeneização de 0,2 g de tecidos frescos do sistema radicular e da parte aérea com 10 ml de solução de extração constituída de tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, num almofariz de porcelana. O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, então, centrifugado por 20 min a 12.000 xg. O sobrenadante foi utilizado nos testes enzimáticos. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas a 4°C.

Para a determinação da atividade enzimática utilizou-se uma mistura de 4 µl de linoleato de sódio 10 mM em Tween-20 0,36% (v/v) (AXELROD et al., 1981) e 2,0 ml de tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0. Ao meio de reação foram adicionados 33 µl do extrato enzimático bruto e, então, o aumento na absorvância a 234 nm foi registrado durante 1,5 min a 25°C. A atividade da enzima foi medida utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de  $25.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (AXELROD et al., 1981).



### 3.5.7. Amônia liases da fenilalanina (PALs, EC 4.3.1.5)

Para a obtenção do extrato enzimático bruto do sistema radicular e da parte aérea das PALs, 0,15 g de tecidos frescos foram macerados em almofariz de porcelana com 15 ml de solução de extração constituída de  $\beta$ -mercaptoetanol 20 mM em tampão de borato de sódio 0,1 M, pH 8,8, na presença de 5% (p/p) de polivinilpirrolidona insolúvel (CAHILL e McCOMB, 1992). O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, então, centrifugado por 10 min a 12.000 xg. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas necessárias à obtenção do extrato enzimático bruto foram executadas a 4°C.

A atividade da enzima foi determinada pela adição de 1 ml do extrato enzimático bruto ao meio de reação constituído de 1 ml de tampão de borato de sódio 0,2 M, pH 8,8 e 1 ml de L-fenilalanina 0,1 M (CAHILL e McCOMB, 1992). Após a incubação por 1 h a 30°C, a reação foi interrompida pela adição de 0,1 ml de solução de HCl 6 N (KOUKOL e CONN, 1961). Um “branco”, onde a enzima foi inativada previamente pela adição de 0,1 ml de HCl 6 N, correu paralelamente ao experimento. A atividade da enzima foi determinada a 290 nm pela medição da quantidade de ácido *trans*-cinâmico formado utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de  $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ZUCKER, 1965).

### 3.5.8. Desidrogenases do álcoois cinamílicos (CADs, EC 1.1.1.195)

Para a obtenção do extrato enzimático bruto do sistema radicular e da parte aérea das CADs, 0,2 g de tecidos frescos foram macerados em almofariz de porcelana com 3 ml de solução extratora constituída de  $\beta$ -mercaptoetanol 40 mM em tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,3 (MITCHELL et al., 1994). O homogeneizado foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, então, centrifugado por 10 min a 10.000 xg. O sobrenadante foi utilizado no teste enzimático. Todas as etapas necessárias à obtenção do extrato enzimático bruto foram executadas a 4°C.

A atividade da enzima foi determinada pela adição de 200 µl do extrato enzimático bruto a 2,8 ml de uma mistura de reação composta de álcool sinapil 100 µM, NADP<sup>+</sup> 100 µM e tampão de Tris-HCl 100 µM, pH 9,3, utilizando-se a técnica proposta por WYRAMBIK e GRISEBACH (1975), porém modificada por MITCHELL et al. (1994). A mistura foi incubada durante 1,5 min a 30°C. A atividade da enzima foi medida pelo aumento na absorvância a 340 nm utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (WYRAMBIK e GRISEBACH, 1975).

### **3.6. Determinação de compostos fenólicos**

#### **3.6.1. Lignina**

Amostras de raízes pesando 0,2 g de matéria fresca foram maceradas com 5 ml de etanol 95%. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 5 min a 1.000 xg (MORRISON, 1972, modificado por SASAKI et al., 1996). O sobrenadante foi descartado e o precipitado “lavado” por três vezes em etanol 95% e, por mais duas vezes, em mistura de etanol:hexano (1:2, v/v) sob agitação vigorosa. Os precipitados foram secos ao ar e, em seguida, novamente pesados. Amostras contendo 10 mg de tecidos foram “lavadas” com 1 ml de brometo de acetila 25% (v/v) em ácido acético glacial sob agitação. Após a eliminação da solução por decantação, adicionou-se, novamente, 1 ml da solução de brometo de acetila 25% (v/v) em ácido acético glacial. As amostras foram, então, incubadas nessa solução durante 30 min a 70°C. Os tubos de ensaio foram resfriados à temperatura ambiente. Então, adicionaram-se 0,9 ml de solução de NaOH 2M e 0,25 ml de solução de hidroxilamina-HCl 7,5 M, completando-se o volume para 10 ml com ácido acético glacial. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 1.000 xg (SASAKI et al., 1996). A absorvância dos sobrenadantes foi lida a 280 nm contra um “branco” no qual as amostras de tecidos não foram adicionadas. O teor de lignina foi expresso em unidades de absorvância a 280 nm por mg de matéria fresca (FUKUDA e KOMAMINE, 1982).

### **3.6.2. Compostos fenólicos solúveis**

Amostras pesando 0,5 g de matéria fresca foram maceradas em almofariz de porcelana com 4 ml da mistura de metanol:clorofórmio:água (12:5:3, v/v). O homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 1.000 xg. O precipitado foi submetido a outras duas extrações, sendo os sobrenadantes combinados. Em seguida, completou-se o volume dos sobrenadantes para 10 ml com metanol:clorofórmio:água (12:5:3, v/v). A esta solução adicionaram-se 2,5 ml de clorofórmio e 2,5 ml de água. Os tubos foram agitados e, então, centrifugados por 10 min a 1.000 xg (RENGEL et al., 1993). Na fase aquosa superior, determinou-se o teor de compostos fenólicos solúveis pelo método de JENNINGS (1981). Alíquotas de 1 ml da fase aquosa superior foram adicionadas a 1,0 ml de reagente alcalino de Folin-Ciocalteu 1 N e misturadas vigorosamente. Após incubação à temperatura ambiente por 15 min, adicionaram-se às amostras 5 ml de carbonato de sódio 2% (p/v) em solução de NaOH 0,1 N. Após 45 min, foram determinadas as absorvâncias das amostras a 760 nm, sendo o teor de compostos fenólicos solúveis totais calculado por meio de uma curva de calibração utilizando-se a tirosina como padrão (JENNINGS, 1981).

### **3.7. Delineamento experimental**

Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial (2 x 2) constituído dos seguintes fatores: dois cultivares de sorgo (sensível e tolerante) na presença (0,185 mM) ou na ausência de Al, no delineamento experimental de blocos casualizados. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Efeito do Al sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase**

Na presença do Al, a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de uma fração purificada da membrana plasmática dos ápices das raízes e das raízes inteiras foi reduzida nos dois cultivares e nas duas porções do sistema radicular das plantas (Quadro 1). Nas membranas provenientes dos ápices radiculares, os percentuais de redução para os cultivares sensível e tolerante foram, respectivamente, 12,5 e 24,4%. Nas raízes inteiras, a redução na atividade da enzima foi bastante próxima nos dois cultivares, com 26 e 28,3%, respectivamente, para o sensível e o tolerante. Os cultivares diferiram entre si nas duas porções do sistema radicular na presença ou na ausência do Al. Na presença do Al, a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase no cultivar sensível foi maior que no tolerante tanto na fração purificada da membrana plasmática obtida a partir dos ápices das raízes (10,5%), quanto naquela proveniente das raízes inteiras (37%). Na ausência do Al, os cultivares apresentaram comportamentos distintos. Nas membranas provenientes das raízes inteiras, o cultivar sensível mostrou uma atividade enzimática 32,7% maior que o tolerante, enquanto que, naquelas membranas obtidas a partir dos ápices das raízes, as maiores atividades da H<sup>+</sup>-ATPase foram observadas no cultivar tolerante (4,8%).

Quadro 1 - Efeito do Al sobre a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de uma fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes e de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Concentração<br>de Al (mM) | Atividade da H <sup>+</sup> -ATPase (μmoles de Pi liberado h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína) |           |                 |           |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------|-----------|
|                            | Ápices de Raízes                                                                                      |           | Raízes Inteiras |           |
|                            | Sensível                                                                                              | Tolerante | Sensível        | Tolerante |
| 0                          | 1,68 aB <sup>1</sup>                                                                                  | 1,76 aA   | 1,50 aA         | 1,13 aB   |
| 0,185                      | 1,47 bA                                                                                               | 1,33 bB   | 1,11 bA         | 0,81 bB   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada porção do sistema radicular, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Alterações na composição lipídica da membrana plasmática decorrentes dos efeitos tóxicos do Al foram relatadas por LINDBERG e GRIFFITHS (1993) em raízes de beterraba e por ZHANG et al. (1996, 1997) em raízes de trigo. O Al pode se ligar aos fosfolipídios pelas cargas negativas dos grupamentos fosfato (HUNTER e ETHERTON, 1989) e, desse modo, alterar propriedades físico-químicas das membranas, provocando reduções na fluidez e na frequência de dobras e, por outro lado, ocasionando aumentos na densidade de empacotamento e no enrijecimento das cadeias dos lipídios (CHEN et al., 1991). As alterações provocadas pelo Al na estrutura das membranas facilitam a ocorrência de danos peroxidativos (CAKMAK e HORST, 1991) que, por sua vez, podem resultar na liberação de ácidos graxos livres (ZHANG et al., 1996, 1997). Segundo COOKE e BURDEN (1990), ácidos graxos livres podem estimular a atividade de ATPases de membranas previamente solubilizadas e livres dos lipídios constituintes, sendo o comprimento da cadeia e o grau de insaturação dos ácidos graxos fatores importantes para a regulação da atividade das enzimas. Neste experimento, a menor percentagem de redução na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase de uma fração purificada das membranas de ápices de raízes do cultivar sensível na presença do Al pode ser, portanto, resultante do maior conteúdo de ácidos graxos livres,

como consequência da ação tóxica desse elemento sobre a porção lipídica das membranas do cultivar.

Embora os mecanismos da toxicidade provocada pelo Al ainda não sejam totalmente compreendidos, relatos da literatura evidenciam a participação desse elemento na inibição da atividade da  $H^+$ -ATPase *in vitro* e *in vivo* (CAMBRAIA e CALBO, 1980 e SASAKI et al., 1995). Trabalhando com raízes de plantas de milho, FAÇANHA e deMEIS (1995) verificaram que a aplicação do Al diretamente ao meio de reação resultou em inibição da atividade da  $H^+$ -ATPase. Resultados similares foram encontrados por CAMBRAIA e CALBO (1980) em raízes de sorgo e, também, por LINDBERG e GRIFFTHS (1993) em raízes de beterraba. Segundo considerações de LINDBERG e GRIFFTHS (1993), a inibição da atividade enzimática é, aparentemente, decorrente da ligação do Al ao complexo enzima-substrato pelos resíduos SH do sítio ativo e, também, aos fosfolipídios das membranas, o que provoca alterações no microambiente da enzima e, conseqüentemente, modificações na conformação e na atividade da  $H^+$ -ATPase.

Utilizando uma fração enriquecida da membrana plasmática de raízes de plantas de cevada cultivadas na presença do Al, MATSUMOTO et al. (1992) verificaram que a atividade da  $H^+$ -ATPase foi reduzida à metade após cinco dias do início do experimento. Essa resposta na atividade da enzima foi atribuída aos efeitos primários da toxicidade provocada pelo Al em decorrência da sua ligação aos fosfolipídios e, também, da competição exercida com o  $Ca^{2+}$  pelos sítios de troca localizados nas membranas. Segundo considerações desses autores, as funções físico-químicas da membrana plasmática começam a ser afetadas quando um quarto do fósforo dos fosfolipídios reage com o Al, o que pode resultar na desnaturação dos fosfolipídios. Efeitos similares aos verificados por MATSUMOTO et al. (1992) foram observados neste experimento, embora os percentuais de redução na atividade da  $H^+$ -ATPase nos dois cultivares de sorgo e nas duas porções do sistema radicular tenham sido menores. Essas diferenças observadas na atividade da  $H^+$ -ATPase podem ter sido decorrentes de variações

específicas na atividade da enzima e, também, das concentrações de Al utilizadas, uma vez que elas foram distintas nos dois experimentos.

SAMUELS et al. (1997) verificaram que a atividade da  $H^+$ -ATPase foi aumentada quando as raízes de plantas de trigo submetidas ao tratamento com Al foram lavadas em solução de citrato. Este procedimento resultou na restauração do potencial elétrico e do gradiente de pH nas células das raízes. Segundo MYASAKA et al. (1989), a hiperpolarização e o aumento do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática nas células das raízes pela ação do Al podem ser utilizados como força motriz para a sua absorção, o que sugere a participação da  $H^+$ -ATPase no acúmulo desse elemento tóxico. Por sua vez, GRANDMOUGIN-FERJANI et al. (1997) verificaram que a atividade da  $H^+$ -ATPase isolada da membrana plasmática de raízes de plantas de milho pode ser ativada pela presença de esteróis livres. Embora a concentração de esteróis livres não tenha sido determinada no presente trabalho, ZHANG et al. (1997) verificaram que o conteúdo dessa classe de ácidos graxos isolados da fração purificada da membrana plasmática de plantas de trigo cultivadas na presença do Al foi reduzido somente nas raízes do cultivar tolerante. Além disso, KINRAIDE (1988) relatou no seu trabalho que plantas de trigo exibindo sintomas severos de toxicidade por Al apresentavam intensa capacidade de extrusão de  $H^+$  e, conseqüentemente, uma elevada atividade da  $H^+$ -ATPase. Portanto, a maior redução na atividade da  $H^+$ -ATPase observada neste experimento nas raízes do cultivar tolerante pode ser uma estratégia utilizada pelas plantas desse cultivar no sentido de reduzir o conteúdo de Al acumulado no simplasto, o que resultaria, também, numa menor peroxidação dos lipídios (CAKMAK e HORST, 1991). GONÇALVES et al. (1996), entretanto, trabalhando com os mesmos genótipos utilizados neste experimento, verificaram um maior acúmulo de Al nas raízes do cultivar tolerante. Caso o gradiente de potencial eletroquímico criado pela atividade da  $H^+$ -ATPase realmente tenha participação nos mecanismos de influxo de Al no simplasto (MIYASAKA et al., 1989), a possibilidade levantada por GONÇALVES et al. (1996) de que o Al acumulado nas raízes das plantas do

cultivar tolerante permaneça, em parte, restrito ao apoplasto, adsorvido às cargas negativas da parede celular e, ou, ainda, imobilizado na forma de complexos orgânicos, seria reforçada.

## **4.2. Efeito do Al sobre a composição de ácidos graxos**

### **4.2.1. Na fração purificada da membrana plasmática**

#### **4.2.1.1. Nos ápices radiculares**

A concentração dos principais ácidos graxos de uma fração purificada da membrana plasmática das plantas diferiu estatisticamente entre os cultivares na presença e na ausência do Al, exceto a concentração do ácido palmítico (16:0) na presença do Al e a do ácido palmitoléico (16:1) tanto na presença quanto na ausência do Al (Quadro 2). Os resultados encontrados neste experimento diferiram dos obtidos por LINDBERG e GRIFFITHS (1993), que não observaram a influência do Al sobre a composição dos ácidos graxos isolados de uma fração purificada da membrana plasmática de raízes de plantas de beterraba. Os valores elevados dos pHs das soluções nutritivas, 5,3, 5,4 e 6,1, e a utilização de raízes inteiras no trabalho de LINDBERG e GRIFFITHS (1993) podem ter sido os principais fatores determinantes de um pequeno ou nulo efeito do Al sobre a composição de ácidos graxos nas membranas das plantas (ZHANG et al., 1996). Na ausência do Al, a concentração do ácido graxo 16:0 no cultivar sensível foi 32,3% maior que no tolerante, o que não se verificou na presença do Al, onde os cultivares não diferiram entre si. No cultivar sensível, observou-se, na presença do Al, uma redução de 4,7% na concentração desse ácido graxo, enquanto que, no cultivar tolerante, registrou-se um aumento de 25,2%. Isso também se verificou, porém, de modo mais intenso, para o ácido linolênico (18:3), onde sua concentração na presença do Al foi reduzida no cultivar sensível (39,4%) e aumentada no tolerante (107,7%). Na ausência do Al, o cultivar sensível apresentou uma concentração do ácido graxo 18:3 bastante superior (166,7%) à do tolerante. Na presença do Al, contudo, a concentração desse ácido graxo no



Quadro 2 - Efeito do Al sobre a composição de ácidos graxos dos lipídios totais de uma fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes de dois cultivares de sorgo

| Cultivar  | Concentração de Al (mM) | Composição de Ácidos Graxos (% mol) |         |         |         |         |         |
|-----------|-------------------------|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|           |                         | 16:0 <sup>2</sup>                   | 16:1    | 18:0    | 18:1    | 18:2    | 18:3    |
| Sensível  | 0                       | 44,6 aA <sup>1</sup>                | 6,6 bA  | 4,8 bB  | 7,4 aB  | 26,3 aB | 10,4 aA |
|           | 0,185                   | 42,5 bA                             | 12,4 aA | 8,2 aA  | 3,3 bB  | 27,3 aA | 6,3 bB  |
| Tolerante | 0                       | 33,7 bB                             | 7,2 bA  | 10,5 aA | 13,5 aA | 31,2 aA | 3,9 bB  |
|           | 0,185                   | 42,2 aA                             | 12,3 aA | 5,0 bB  | 6,9 bA  | 25,6 bB | 8,1 aA  |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas no cultivar (ausência e presença de Al) e maiúsculas entre cultivares (para cada concentração de Al) em cada tipo de ácido graxo, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> 16:0 - ácido palmítico, 16:1 - ácido palmitoléico, 18:0 - ácido esteárico, 18:1 - ácido oléico, 18:2 - ácido linoléico, 18:3 - ácido linolênico.

cultivar tolerante foi 28,6% maior do que no sensível. No caso do ácido graxo 16:1, observou-se, na presença do Al, aumentos de 87,9 e 70,8% na sua concentração nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Na ausência do Al, a concentração do ácido graxo 16:1 no cultivar sensível foi 8,3% menor que no tolerante, embora, na presença do Al, os cultivares não tenham diferido entre si. As concentrações dos ácidos esteárico (18:0), oléico (18:1) e linoléico (18:2) no cultivar tolerante foram reduzidas, na presença do Al, em 52,4, 48,9 e 17,9%, respectivamente. No cultivar sensível, observou-se, na presença do Al, a redução da concentração do ácido graxo 18:1 (55,4%) e o aumento do 18:0 (70,8%), não tendo sido verificada modificação da concentração do 18:2. Na ausência do Al, as concentrações dos ácidos graxos 18:0, 18:1 e 18:2 no cultivar tolerante foram, respectivamente, 188,8, 82,4 e 18,6% maiores que no sensível. Por sua vez, na presença do Al, as concentrações dos ácidos graxos 18:0 e 18:2 no cultivar sensível e a concentração do 18:1 no tolerante foram, respectivamente, 64 e 6,6 e 109,1% maiores que no outro cultivar (Quadro 2).

A composição de ácidos graxos de uma fração purificada das membranas plasmáticas obtida a partir dos ápices das raízes das plantas utilizadas neste

experimento, mesmo na ausência do Al, foi diferente daquela verificada por GRONEWALD et al. (1982), que trabalharam com o mesmo tipo de material isolado de raízes de plantas de milho. Entretanto, foi muito similar à composição observada por ROCHESTER et al. (1987) em membrana plasmática isolada das raízes de plantas de cevada. Essas diferenças, principalmente nas concentrações dos ácidos graxos 16:0 e 18:2, são consideradas perfeitamente normais, uma vez que se tratam de espécies diferentes.

O aumento da concentração do ácido graxo 16:1 observado, na presença do Al no cultivar sensível pode ser resultante de alguma estratégia das plantas desse cultivar visando, talvez, compensar as reduções verificadas na biossíntese do ácido graxo 18:1 e, principalmente, do 18:3, o que poderia, em parte, minimizar possíveis alterações nas propriedades físico-químicas das suas membranas (ROCHESTER et al., 1987 e NAVARI-IZZO et al., 1989). Ácidos graxos polinsaturados, principais componentes dos fosfolipídios, além de determinantes essenciais da fluidez da membrana, podem ser substratos de certas enzimas como as lipoxigenases e as fosfolipases, por exemplo (NAVARI-IZZO et al., 1990, 1991, 1993; KUMAR e KNOWLES, 1993 e SAKAKI et al., 1994). Além disso, os ácidos graxos polinsaturados são muito susceptíveis à degradação peroxidativa, que ocorre pela ação dos radicais livres produzidos em maiores quantidades, sob condições de estresses ambientais (NAVARI-IZZO et al., 1991 e KUMAR e KNOWLES, 1993). Dentre os principais ácidos graxos polinsaturados encontrados nas membranas plasmáticas das plantas superiores, o 18:3 parece ser o mais sensível aos ataques por radicais livres e, conseqüentemente, à peroxidação (WHITAKER et al., 1990 e SAKAKI et al., 1994). Neste experimento, o ácido graxo 18:3 sofreu significativa redução nas membranas do cultivar sensível, um indicativo da ocorrência de dano peroxidativo e, ou, do seu consumo como substrato de alguma reação enzimática (WHITAKER et al., 1990 e KUMAR e KNOWLES, 1993). O aumento na concentração do ácido graxo 18:0 e a ligeira queda na concentração do 16:0 observados nas membranas do cultivar sensível podem, adicionalmente, estar contribuindo para a redução na proporção de ácidos graxos insaturados e,

conseqüentemente, para a diminuição da fluidez e, ou, espessura das membranas (ROCHESTER et al., 1987 e MANSOUR et al., 1994), uma vez que, dentre os seus principais ácidos graxos, o 18:0 e o 16:0 são os que apresentam temperaturas de fusão mais elevadas (LEHNINGER et al., 1993).

No cultivar tolerante, o aumento da concentração do ácido graxo 16:1 foi também observado na presença do Al, mas numa proporção menor que no sensível. Na presença do Al, as reduções verificadas nas concentrações dos ácidos graxos 18:0, 18:1 e 18:2 no cultivar tolerante parecem ser decorrentes de variações na proporção relativa dos ácidos graxos saturados e insaturados componentes das suas membranas. Essas variações, possivelmente, são necessárias ao reajustamento das propriedades físico-químicas das membranas, uma vez que a concentração do 18:3, nessa condição, foi bastante aumentada. O aumento da concentração do ácido graxo 18:3 na presença do Al sugere que, pelo menos no cultivar tolerante, a redução observada na concentração dos ácidos graxos insaturados não foi decorrente de danos peroxidativos, uma vez que esses ácidos graxos são o principal alvo do ataque por radicais livres (WHITAKER et al., 1990 e SAKAKI et al., 1994). Os resultados permitem sugerir, ainda, que, no cultivar tolerante, a ação dos mecanismos de eliminação de radicais livres é mais eficiente do que no sensível e, por esse motivo, a peroxidação dos lipídios se verifica em níveis mais baixos nas suas raízes na presença do Al.

Apesar da ocorrência de alterações específicas na concentração dos ácidos graxos das membranas plasmáticas das plantas na presença ou não do Al, algumas similaridades foram observadas como no caso dos ácidos graxos 16:0 e 16:1, onde os cultivares não diferiram estatisticamente entre si. A concentração do 18:1, contudo, sempre se manteve maior no cultivar tolerante, independente da presença do Al, enquanto a concentração do ácido graxo 18:0 foi influenciada de modo específico nos dois cultivares. Na ausência do Al, a concentração do 18:0 foi menor no cultivar sensível do que no tolerante. Porém, ao se adicionar Al, a situação se inverteu. Devido ao número reduzido de trabalhos relacionando modificações específicas na composição lipídica das membranas aos efeitos tóxicos do Al, o significado das alterações na proporção relativa dos ácidos

graxos é pouco compreendido, mas, certamente, elas são parte do sistema de reajustamento do metabolismo celular e das propriedades físico-químicas das membranas, que é ativado sob condições de estresse (LINDBERG e GRIFFITHS, 1993). Segundo ZHANG et al. (1997), as modificações na composição lipídica das membranas estão intimamente relacionadas aos mecanismos de tolerância das plantas ao Al.

Na presença do Al, o índice de ligações duplas para ácidos graxos com dezoito carbonos ( $ILD_{C18}$ ) reduziu em 22% no cultivar sensível e em 6,8% no tolerante (Quadro 3). Semelhante comportamento foi observado também para a relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados (AGI/AGS) na presença do Al, com percentuais de redução de 11,1% para o cultivar sensível e de 7% para o tolerante. Para as relações ácido linoléico/ácido palmítico (18:2/16:0) e ácido linoléico/ácido linolênico (18:2/18:3), foi verificado um comportamento bastante distinto entre os cultivares. Na presença do Al, o cultivar sensível não apresentou modificação significativa na relação 18:2/16:0, mas, de modo contrário, aumentou em 71,4% a relação 18:2/18:3, enquanto o tolerante mostrou reduções de 34,4 e 60,5%, respectivamente, nos valores dessas relações.

Quadro 3 - Efeito do Al sobre o  $ILD_{C18}$  e sobre as relações AGI/AGS, 18:2/16:0 e 18:2/18:3 de ácidos graxos dos lipídios totais de uma fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes de dois cultivares de sorgo

| Cultivar  | Concentração de Al (mM) | $ILD_{C18}$ <sup>2</sup> | AGI/AGS | 18:2/16:0 | 18:2/18:3 |
|-----------|-------------------------|--------------------------|---------|-----------|-----------|
| Sensível  | 0                       | 0,91 aA <sup>1</sup>     | 1,98 aB | 0,59 aB   | 2,55 bB   |
|           | 0,185                   | 0,71 bB                  | 1,76 bB | 0,64 aA   | 4,37 aA   |
| Tolerante | 0                       | 0,88 aB                  | 2,15 aA | 0,93 aA   | 8,07 aA   |
|           | 0,185                   | 0,82 bA                  | 2,00 bA | 0,61 bA   | 3,19 bB   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, minúsculas para cada cultivar (ausência e presença de Al) e, maiúsculas entre os cultivares (em cada concentração de Al), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>  $ILD_{C18}$  - índice de ligações duplas para ácidos graxos com 18 carbonos, AGI/AGS - relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados, 18:2/16:0 - relação ácido linoléico/ácido palmítico, 18:2/18:3 - relação ácido linoléico/ácido linolênico.

O maior percentual de redução do  $ILD_{C18}$  no cultivar sensível na presença do Al é reflexo das maiores reduções observadas nas concentrações dos principais ácidos graxos insaturados presentes nas membranas desse cultivar. Alterações como essas provocadas pelo Al resultam em modificações na fluidez, na espessura e em outras propriedades funcionais e estruturais das membranas e podem explicar as diferenças entre os cultivares quanto à tolerância diferencial ao Al (ROCHESTER et al., 1987; NAVARI-IZZO et al., 1989 e PALTA et al., 1993). ZEL et al. (1993 a, b) reportaram reduções e, também, aumentos na fluidez da membrana plasmática de duas diferentes espécies de fungos, respectivamente, sensível e tolerante ao Al. Os efeitos do Al sobre a fluidez da membrana podem ser decorrentes de sua ligação às porções polares dos fosfolipídios na superfície das membranas (HUNTER e ETHERTON, 1989), de sua participação em processos de peroxidação dos lipídios (GUTTERIDGE et al., 1985 e ÇAKMAK e HORST, 1991) ou, ainda, de sua interferência direta na biossíntese de ácidos graxos (KUIPER, 1985). Segundo ZHANG et al. (1997), caso o decréscimo na fluidez dos lipídios das membranas seja decorrente de lesões tóxicas induzidas pelo Al, as mudanças observadas na composição lipídica das membranas poderiam contribuir para a restauração das suas propriedades físico-químicas, como resposta ao estresse provocado pelo Al. Essas mudanças, contudo, segundo considerações daqueles autores, parecem ser um reflexo de adaptações a longo-prazo ao estresse crônico e não a resposta imediata das plantas ao estresse agudo por Al, uma vez que as alterações na composição lipídica das membranas são verificadas somente após respostas de curto-prazo terem sido expressas como, por exemplo, a redução no alongamento celular.

Embora os cultivares tenham apresentado modificações similares no comportamento da relação AGI/AGS, as reduções observadas nos seus valores foram decorrentes de diferentes fenômenos. No cultivar sensível, as alterações foram provocadas, principalmente, pelo aumento na concentração do ácido graxo 18:0 e pela redução nas concentrações dos ácidos graxos 18:1 e 18:3. No cultivar tolerante, embora as concentrações dos ácidos graxos 18:1 e 18:2 tenham

reduzido, a concentração do 18:3 aumentou bastante, enquanto a do 18:0 reduziu. Certos relatos da literatura consideram que as modificações na relação AGI/AGS apresentam pouca contribuição para o esclarecimento das respostas das plantas aos estresses ambientais, uma vez que elas são, geralmente, comuns entre cultivares apresentando tolerância diferencial ao fator estressante (NAVARI-IZZO et al., 1989, 1991, 1993 e PALTA et al., 1993). Na opinião desses autores, as variações observadas nos valores da relação AGI/AGS representam, na verdade, somente ajustes nas proporções relativas dos ácidos graxos saturados e insaturados componentes das membranas (NAVARI-IZZO et al., 1993 e PALTA et al., 1993). As mesmas considerações podem ser estabelecidas quanto ao comportamento da relação 18:2/16:0.

As diferenças observadas entre os cultivares no que se refere à relação 18:2/18:3 na presença do Al foram decorrentes de variações específicas na concentração de cada um desses ácidos graxos. No cultivar sensível, a principal causa para o aumento dessa relação foi a redução da concentração do ácido graxo 18:3, enquanto, no tolerante, ao contrário, a relação foi reduzida devido ao aumento na concentração do 18:3 e da redução na concentração do 18:2. Neste experimento, as variações observadas no comportamento dos cultivares sugerem que, no sensível, o Al pode ter contribuído para a ocorrência de danos peroxidativos aos lipídios das membranas, possivelmente pela formação de hidroperóxidos dos ácidos graxos, cuja reação é desencadeada pela ação dos radicais livres. No cultivar tolerante, isso parece não ter ocorrido, uma vez que a concentração do 18:3, um ácido graxo bastante insaturado e, portanto, muito sensível à peroxidação (WHITAKER et al., 1990), foi aumentada mesmo na presença do Al. Os resultados indicam, também, que, nesse cultivar, a redução verificada na concentração do ácido graxo 18:2 na presença do Al pode ter sido resultante do seu consumo como substrato enzimático e, ou, ainda, da diminuição na sua taxa de biossíntese, não se devendo, portanto, ao ataque por radicais livres (WHITAKER et al., 1990).

A determinação da composição das diferentes classes de lipídios através do seu isolamento a partir de uma fração purificada da membrana plasmática das raízes das plantas sob condições de estresse por Al deverá ser estudada em trabalhos futuros, uma vez que alterações específicas em cada uma dessas classes poderão fornecer subsídios mais concretos quanto à importância das mesmas nos mecanismos de tolerância diferencial das plantas ao Al, conforme sugerem ZHANG et al. (1996, 1997).

#### 4.2.1.2. Nas raízes inteiras

A composição dos principais ácidos graxos dos lipídios totais da membrana plasmática de raízes inteiras (Quadro 4) diferiu bastante daquela observada quando foram utilizados apenas os ápices radiculares no isolamento dos lipídios (Quadro 2). Essas diferenças ocorreram, possivelmente, em função da diluição dos efeitos tóxicos do Al ao longo de todo o sistema radicular (HORST et al., 1992 e ZHANG et al., 1996, 1997), uma vez que os ápices das raízes e, mais precisamente, os meristemas apicais são as regiões mais sensíveis ao Al (DELHAIZE et al., 1993 e RYAN et al., 1993).

Quadro 4 - Efeito do Al sobre a composição de ácidos graxos dos lipídios totais de uma fração purificada da membrana plasmática de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Cultivar  | Concentração de Al (mM) | Composição de Ácidos Graxos (% mol) |        |        |        |         |         |
|-----------|-------------------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
|           |                         | 16:0 <sup>2</sup>                   | 16:1   | 18:0   | 18:1   | 18:2    | 18:3    |
| Sensível  | 0                       | 38,5 aB <sup>1</sup>                | 4,5 aA | 3,5 aB | 6,7 aA | 35,5 aA | 11,2 bA |
|           | 0,185                   | 32,7 bB                             | 2,1 bB | 2,4 bB | 4,3 bB | 34,9 aB | 23,6 aA |
| Tolerante | 0                       | 40,5 aA                             | 3,9 aB | 5,5 aA | 5,9 aA | 34,0 bB | 10,2 aA |
|           | 0,185                   | 41,4 aA                             | 3,5 aA | 3,7 bA | 5,0 aA | 36,5 aA | 9,9 aB  |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas no cultivar (ausência e presença de Al) e maiúsculas entre cultivares (para cada concentração de Al) em cada tipo de ácido graxo, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> 16:0 - ácido palmítico, 16:1 - ácido palmitoléico, 18:0 - ácido esteárico, 18:1 - ácido oléico, 18:2 - ácido linoléico, 18:3 - ácido linolênico.

A concentração dos ácidos graxos das membranas foi estatisticamente diferente entre os cultivares na presença ou ausência do Al, exceto para os ácidos graxos 18:1 e 18:3, que não diferiram entre si na ausência do Al (Quadro 4). No cultivar sensível, as concentrações dos ácidos graxos 16:0, 16:1, 18:0 e 18:1 foram reduzidas na presença do Al em 15,1, 53,3, 31,4 e 35,8%, respectivamente. No tolerante, reduções ocorreram somente para o 18:0 (32,7%). Aumentos na concentração dos ácidos graxos provocados pelo Al foram observados apenas para o 18:3 (110,7%) no cultivar sensível e para o 18:2 (7,4%) no tolerante. As concentrações dos ácidos graxos 16:0, 16:1, 18:1 e 18:3 no cultivar tolerante e do 18:2 no sensível não foram significativamente modificadas pelo tratamento com Al. Na presença do Al, as concentrações dos ácidos graxos 16:0, 16:1, 18:0, 18:1 e 18:2 foram, respectivamente, 26,6, 66,7, 54,2, 16,3 e 4,6% maiores no cultivar tolerante, comportamento que não se verificou para o 18:3, onde o cultivar sensível apresentou uma concentração 138,4% maior que no tolerante. Na ausência do Al, as concentrações dos ácidos graxos 16:0 e 18:0 no cultivar tolerante e dos ácidos graxos 16:1, 18:1 e 18:2 no sensível foram, respectivamente, 5,2 e 57,1% e 15,4, 13,6 e 4,4% maiores que no outro cultivar.

As diferentes respostas observadas na composição dos ácidos graxos isolados das membranas de raízes inteiras na presença ou não do Al (Quadro 4), se comparadas às obtidas quando apenas tecidos dos ápices radiculares foram utilizados (Quadro 2), confirmam as observações de ZHANG et al. (1996), que ressaltam a possibilidade da ocorrência de resultados contrastantes quando materiais provenientes de fontes diferentes são confrontados e, ainda, a importância de se trabalhar com porções apicais das raízes, evitando-se, desse modo, a diluição dos efeitos tóxicos do Al. Em concordância às observações desses autores, algumas considerações tornam-se possíveis a partir dos dados obtidos, principalmente no que se refere à susceptibilidade dos ácidos graxos das membranas à peroxidação e aos possíveis ajustes nas suas proporções relativas que, em última análise, teriam a função de restaurar suas propriedades físico-químicas ótimas. Pelo Quadro 4, é possível observar que, na presença do Al, a



concentração do ácido graxo 18:0 nos dois cultivares decresceu na mesma intensidade e, também, que reduções nas proporções relativas dos principais ácidos graxos polinsaturados, 18:2 e 18:3, não foram verificadas em nenhum dos dois cultivares. Esses resultados poderiam sugerir, então, que o grau de fluidez e de empacotamento dos lipídios nas membranas, que a peroxidação dos lipídios e, ou, ainda, que quaisquer outras alterações nas suas propriedades físico-químicas em decorrência da ação tóxica do Al estariam sofrendo modificações similares nos dois cultivares, o que, na realidade, parece não ocorrer. Portanto, ao se trabalhar com membranas isoladas de raízes inteiras e não apenas com materiais provenientes de tecidos dos ápices radiculares, é bastante provável o risco de se lançar conclusões equivocadas como, por exemplo, que a tolerância diferencial entre os cultivares não poderia ser explicada, pelo menos parcialmente, como resultante de alterações específicas na composição dos ácidos graxos das suas membranas e, ou, pela diferença entre o grau de peroxidação dos seus lipídios. Os resultados encontrados neste experimento parecem ser, na realidade, apenas um reflexo da diluição dos efeitos tóxicos do Al sobre todo o sistema radicular, uma vez que eles se manifestam, principalmente, nos ápices das raízes (ZHANG et al., 1996).

Na presença do Al o  $ILD_{C18}$  e as relações AGI/AGS e 18:2/16:0 aumentaram significativamente somente nas raízes do cultivar sensível em proporções de 30,6, 52,2 e 15,1%, respectivamente (Quadro 5). Nesse cultivar, a relação 18:2/18:3 foi significativamente reduzida na presença do Al (53,3%). No cultivar tolerante, o Al não apresentou efeito significativo sobre esses parâmetros. Os resultados mostraram que a composição dos ácidos graxos nas membranas das raízes inteiras do cultivar tolerante foi pouco influenciada pelo Al, o que sugere, pelo menos em parte, que, nesse cultivar, as propriedades físico-químicas das membranas podem não ter sido alteradas durante o experimento, resultando numa maior tolerância das plantas a esse elemento tóxico. Contudo, a possibilidade da diluição dos efeitos tóxicos do Al ao se trabalhar com todo o sistema radicular também não pode ser descartada e, então, as variações observadas nessas relações

teriam aplicação bastante restrita no esclarecimento dos mecanismos da tolerância diferencial das plantas ao Al (ZHANG et al., 1996).

Quadro 5 - Efeito do Al sobre o  $ILD_{C18}$  e sobre as relações AGI/AGS, 18:2/16:0 e 18:2/18:3 de ácidos graxos dos lipídios totais de uma fração purificada da membrana plasmática de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Cultivar  | Concentração de Al (mM) | $ILD_{C18}$ <sup>2</sup> | AGI/AGS | 18:2/16:0 | 18:2/18:3 |
|-----------|-------------------------|--------------------------|---------|-----------|-----------|
| Sensível  | 0                       | 1,11 bA <sup>1</sup>     | 2,76 bA | 0,93 bA   | 3,17 aA   |
|           | 0,185                   | 1,45 aA                  | 4,20 aA | 1,07 aA   | 1,48 bB   |
| Tolerante | 0                       | 1,05 aB                  | 2,36 aB | 0,84 aB   | 3,32 aA   |
|           | 0,185                   | 1,08 aB                  | 2,47 aB | 0,88 aB   | 3,69 aA   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, minúsculas para cada cultivar (ausência e presença de Al) e, maiúsculas entre os cultivares (em cada concentração de Al), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>  $ILD_{C18}$  - índice de ligações duplas de ácidos graxos com 18 carbonos, AGI/AGS - relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados, 18:2/16:0 - relação ácido linoléico/ácido palmítico, 18:2/18:3 - relação ácido linoléico/ácido linolênico.

#### 4.2.2. Nos tecidos radiculares

A composição dos ácidos graxos dos lipídios totais isolados de tecidos radiculares das plantas sob toxicidade pelo Al (Quadro 6) foi bastante similar à de uma fração purificada da membrana plasmática de tecidos radiculares de plantas de milho obtida por GRONEWALD et al. (1982).

A composição dos ácidos graxos foi significativamente diferente entre os cultivares, exceto nos casos do 18:3 na presença ou não do Al e do 18:0 na sua ausência, não tendo os cultivares diferido entre si (Quadro 6). Na presença do Al, as concentrações dos ácidos graxos 16:0 e 18:0 no cultivar tolerante foram, respectivamente, 16,5 e 103,8% maiores que no sensível. Em contraste, as concentrações dos ácidos graxos 18:1 e 18:2 no cultivar sensível mostraram valores significativamente maiores que no tolerante, em proporções de 38,8 e 7,1%, respectivamente. Na ausência do Al, as concentrações dos ácidos graxos 16:0 e 18:1 no cultivar sensível foram 11,3 e 74,6% maiores que no tolerante. Por sua vez, a concentração do 18:2 foi 7,7% maior no cultivar tolerante quando comparado com o sensível. Na presença do Al, as concentrações dos ácidos

Quadro 6 - Efeito do Al sobre a composição de ácidos graxos dos lipídios totais de tecidos do sistema radicular de dois cultivares de sorgo

| Cultivar  | Concentração de Al (mM) | Composição de Ácidos Graxos (% mol) |        |        |         |         |         |
|-----------|-------------------------|-------------------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
|           |                         | 16:0 <sup>2</sup>                   | 16:1   | 18:0   | 18:1    | 18:2    | 18:3    |
| Sensível  | 0                       | 27,6 aA <sup>1</sup>                | traços | 2,5 aA | 10,3 bA | 43,9 bB | 17,3 aA |
|           | 0,185                   | 24,2 bB                             | traços | 2,6 aB | 13,6 aA | 48,4 aA | 15,2 bA |
| Tolerante | 0                       | 24,8 bB                             | traços | 2,4 bA | 5,9 bB  | 47,3 aA | 19,4 aA |
|           | 0,185                   | 28,2 aA                             | traços | 5,3 aA | 9,8 aB  | 45,2 aB | 14,9 bA |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas no cultivar (ausência e presença de Al) e maiúsculas entre cultivares (para cada concentração de Al) em cada tipo de ácido graxo, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> 16:0 - ácido palmítico, 16:1 - ácido palmitoléico, 18:0 - ácido esteárico, 18:1 - ácido oléico, 18:2 - ácido linoléico, 18:3 - ácido linolênico.

graxos 18:1 e 18:2 no cultivar sensível e dos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 18:1 no tolerante foram aumentadas em 32 e 10,3% e em 13,7, 120,8 e 66,1%, respectivamente. De modo contrário, a presença do Al reduziu as concentrações do ácido graxo 16:0 no cultivar sensível (12,3%) e do 18:3 nos cultivares sensível (12,1%) e tolerante (23,2%). As concentrações dos ácidos graxos 18:0 no cultivar sensível e do 18:2 no tolerante não foram significativamente influenciadas pela presença do Al na solução nutritiva (Quadro 6).

Neste experimento, os lipídios foram extraídos dos tecidos radiculares sem quaisquer restrições quanto a sua posição nas raízes. Portanto, as mesmas argumentações lançadas anteriormente quanto aos possíveis efeitos de diluição da toxicidade pelo Al são, também, aplicáveis ao se trabalhar com materiais provenientes de todo o sistema radicular e não apenas com aqueles localizados nos ápices das raízes (ZHANG et al., 1996). Nesse caso, o aumento observado na concentração do ácido graxo 18:0 no cultivar tolerante pode ter um significado bastante restrito, sendo, talvez, apenas um reflexo dos processos de reajustamento celular e, ou, ainda, da variação na composição lipídica total dos tecidos das raízes, uma vez que as concentrações dos ácidos graxos 18:1 e 18:3 na presença do Al variaram em intensidade similar nos dois cultivares (Quadro 6).

Na presença do Al, o  $ILD_{C18}$  e as relações AGI/AGS e 18:2/16:0 foram reduzidos significativamente em 8,8, 25,9 e 16,1% no cultivar tolerante, enquanto a relação 18:2/18:3 nesse mesmo cultivar foi aumentada (26,6%) (Quadro 7). Por outro lado, no cultivar sensível, o Al não alterou significativamente o  $ILD_{C18}$ , enquanto seu efeito sobre as demais relações foi o oposto ao observado para o cultivar tolerante. As relações AGI/AGS, 18:2/16:0 e 18:2/18:3 foram significativamente aumentadas em 16,8, 25,6 e 26,7%, respectivamente, na presença do Al.

Quadro 7 - Efeito do Al sobre o  $ILD_{C18}$  e sobre as relações AGI/AGS, 18:2/16:0 e 18:2/18:3 de ácidos graxos dos lipídios totais de tecidos do sistema radicular de dois cultivares de sorgo

| Cultivar  | Concentração de Al (mM) | $ILD_{C18}$ <sup>2</sup> | AGI/AGS | 18:2/16:0 | 18:2/18:3 |
|-----------|-------------------------|--------------------------|---------|-----------|-----------|
| Sensível  | 0                       | 1,50 aB <sup>1</sup>     | 5,00 bB | 1,60 bB   | 2,55 bA   |
|           | 0,185                   | 1,55 aA                  | 5,84 aA | 2,01 aA   | 3,23 aA   |
| Tolerante | 0                       | 1,59 aA                  | 5,84 aA | 1,92 aA   | 2,44 bA   |
|           | 0,185                   | 1,45 bB                  | 4,33 bB | 1,61 bB   | 3,09 aA   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, minúsculas para cada cultivar (ausência e presença de Al) e, maiúsculas entre os cultivares (em cada concentração de Al), não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>  $ILD_{C18}$  - índice de ligações duplas de ácidos graxos com 18 carbonos, AGI/AGS - relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados, 18:2/16:0 - relação ácido linoléico/ácido palmítico, 18:2/18:3 - relação ácido linoléico/ácido linolênico.

As reduções observadas no  $ILD_{C18}$  e nas relações AGI/AGS e 18:2/16:0 no cultivar tolerante sugerem a diminuição da fluidez das membranas celulares e, ou, ainda, o consumo de ácidos graxos polinsaturados em reações peroxidativas. Esses resultados, entretanto, podem apresentar reduzida contribuição para o esclarecimento dos mecanismos celulares de reajustamento das propriedades físico-químicas das membranas e, ou, dos processos de produção e eliminação de radicais livres sob condições de estresse por Al, uma vez que os ácidos graxos

isolados neste experimento foram provenientes de todo o conjunto de membranas dos tecidos radiculares. A utilização desse tipo de material, aparentemente, mascara e, ou, dilui os efeitos tóxicos do Al, expressos em maior intensidade nos ápices das raízes (ZHANG et al., 1996, 1997). Além disso, é possível observar que, na presença do Al, as modificações na relação 18:2/18:3, resultantes de variações nas concentrações relativas desses dois ácidos graxos, principais responsáveis pela manutenção da fluidez das membranas celulares, foram bastante similares nos dois cultivares (NAVARI-IZZO et al., 1993 e PALTA et al., 1993).

Um dos principais efeitos observados no metabolismo dos lipídios em plantas submetidas a estresses ambientais é o aumento da produção de ácidos graxos livres (SAKAKI et al. 1994 e ZHANG et al. 1996). Segundo ZHANG et al. (1996), os ácidos graxos livres são derivados do retículo endoplasmático, principal sítio de biossíntese dos triacilgliceróis. Em seu trabalho, ZHANG et al. (1996) verificaram aumentos nas concentrações de ácidos graxos livres, triacilgliceróis e esteril-ésteres em microsomas isolados do sistema radicular de plantas de trigo sensíveis ao Al. A conversão de ácidos graxos livres a hidroperóxidos pela ação das lipoxigenases (LOXs) pode resultar na produção de diversas substâncias tóxicas (SAKAKI et al., 1994). Contudo, essas reações nem sempre são catalisadas por enzimas e a peroxidação dos ácidos graxos insaturados ocorre, também, quando a taxa de produção de radicais livres excede a capacidade celular dos sistemas de desintoxicação (NAVARI-IZZO et al., 1993). Além disso, até o momento, não foi possível esclarecer se as modificações observadas na composição dos ácidos graxos representam uma resposta das plantas às lesões provocadas pelos efeitos fitotóxicos do Al ou se as mesmas são resultantes de mecanismos celulares específicos, que são utilizados para restaurar as propriedades físico-químicas ótimas das membranas (ZHANG et al., 1996). Embora a produção de ácidos graxos livres não tenha sido determinada no presente trabalho, a sua contribuição para a obtenção dos resultados encontrados neste experimento não pode ser descartada.

### 4.3. Efeito do Al sobre a peroxidação de lipídios

#### 4.3.1. Formação do complexo MDA-TBA

##### 4.3.1.1. Na fração purificada da membrana plasmática

O Al aumentou significativamente a formação do complexo MDA-TBA e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios somente nas membranas provenientes dos ápices das raízes do cultivar sensível (43,1%), o que não foi observado no tolerante (Quadro 8). Na presença do Al, a concentração do complexo MDA-TBA no cultivar sensível foi 36,5% maior que no tolerante, mas, na ausência do Al, os cultivares não diferiram entre si. Nas raízes inteiras, a concentração do complexo MDA-TBA na presença ou na ausência do Al foi sempre menor que nos ápices radiculares, e o Al não modificou significativamente a peroxidação dos lipídios em nenhum dos dois cultivares. As concentrações de MDA-TBA nas raízes inteiras do cultivar sensível foram 21,9 e 47,2% maiores que no tolerante, respectivamente, na presença e na ausência do Al.

Quadro 8 - Efeito do Al sobre a peroxidação dos lipídios numa fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes e de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Concentração<br>de Al (mM) | Peroxidação dos Lipídios (nmoles de MDA-TBA mg <sup>-1</sup> de proteína) |           |                 |           |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------|-----------|
|                            | Ápices de Raízes                                                          |           | Raízes Inteiras |           |
|                            | Sensível                                                                  | Tolerante | Sensível        | Tolerante |
| 0                          | 20,9 bA <sup>1</sup>                                                      | 25,5 aA   | 15,9 aA         | 10,8 aB   |
| 0,185                      | 29,9 aA                                                                   | 21,9 aB   | 15,6 aA         | 12,8 aB   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada porção do sistema radicular, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A peroxidação dos lipídios é um dos principais sintomas da ocorrência de danos oxidativos nas células (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). Esse fenômeno consiste de reações de iniciação, propagação e terminação envolvendo espécies tóxicas de oxigênio, íons metálicos e hidroperóxidos dos lipídios (BUEGE e AUST, 1978).

Os primeiros relatos da literatura associando os efeitos tóxicos do Al aos danos peroxidativos nos lipídios das membranas foram obtidos por GUTTERIDGE et al. (1985), trabalhando com tecidos do sistema nervoso de ratos. Eles verificaram que o Al estimulava levemente a peroxidação dos lipídios, mas, na presença de ferro (Fe), o processo se tornava bastante intenso e acelerado. Íons metálicos como o Fe, por exemplo, podem influenciar a peroxidação dos lipídios pelo aumento da produção de radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) em reações do tipo "Haber-Weiss" ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{O}_2$ ) ou, ainda, por reações com os hidroperóxidos dos lipídios, o que resulta na formação de radicais alcoxila e peroxila e, conseqüentemente, na produção de radicais hidroxila (SCANDALIOS, 1993 e ZHANG e KIRKHAM, 1996). Como o Al apresenta o número de oxidação fixado em 3, a sua participação direta nas reações redox que levam à formação dos radicais livres é improvável (GUTTERIDGE et al., 1985). A participação do Al no processo de peroxidação parece ser decorrente do seu efeito direto sobre a organização dos lipídios nas membranas, o que facilitaria e, ou, potencializaria a ação peroxidativa do Fe (GUTTERIDGE et al., 1985 e BUEGE e AUST, 1978). Em ambientes ácidos, Al e Fe apresentam maior solubilidade e, portanto, a ocorrência de peroxidação de lipídios, nessa condição, é um processo esperado (ONO et al., 1995).

Os resultados obtidos neste experimento evidenciaram a participação do Al nos processos de peroxidação dos lipídios de uma fração purificada da membrana plasmática isolada de tecidos dos ápices das raízes do cultivar sensível, o que não foi observado para o tolerante em nenhuma das porções utilizadas do sistema radicular. Resultados similares são encontrados na literatura (CAKMAK e HORST, 1991 e ONO et al., 1995). Segundo HORST et al. (1992), a peroxidação dos lipídios é induzida pelo Al somente após tratamentos

prolongados, ao passo que a inibição do crescimento radicular é rapidamente observada. Esses pesquisadores sugeriram, então, que os efeitos iniciais do Al são provocados pela sua interferência em processos fisiológicos localizados no apoplasto e não na membrana plasmática e, ou, no simplasto. Contudo, ONO et al. (1995) sugerem que os efeitos do Al podem ser separados em duas classes de eventos. Inicialmente, os danos primários ocorreriam no apoplasto e teriam como resultado a inibição do alongamento celular. Em seguida, os efeitos seriam estendidos também ao simplasto, o que resultaria em disfunções das membranas e, até mesmo, na morte das células.

A peroxidação dos lipídios na fração purificada das membranas plasmáticas isoladas de raízes inteiras não foi detectada em nenhum dos cultivares. Resultados similares foram relatados por HORST et al. (1992). Segundo observações desses autores, a utilização de homogeneizados de todo o sistema radicular pode mascarar os efeitos do Al, que são restritos aos ápices das raízes e, mais precisamente, às células da periferia do córtex. Os possíveis efeitos da diluição da toxicidade causada pelo Al na composição lipídica da membrana plasmática, ao se trabalhar com materiais provenientes de regiões distanciadas dos ápices das raízes, são relatados na literatura (ZHANG et al., 1996, 1997).

A comparação dos resultados encontrados para a formação do complexo MDA-TBA (Quadro 8) com a concentração dos ácidos graxos insaturados de uma fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes dos cultivares de sorgo utilizados nos experimentos (Quadro 2) sugere que, no cultivar sensível, a redução na concentração do ácido graxo 18:3 pode ter sido resultante da sua degradação em reações peroxidativas, o que parece não ter acontecido nas membranas do cultivar tolerante, no qual aumentos significativos na concentração desse ácido graxo foram registrados. A redução na concentração de ácidos graxos polinsaturados, especialmente do 18:3, parece ter sido a principal causa do aumento da concentração do complexo MDA-TBA e, conseqüentemente, da ocorrência de danos peroxidativos nos ápices das raízes das plantas do cultivar sensível. Além desse comportamento diferenciado no que se refere à composição dos ácidos graxos da fração purificada das membranas, a



ação de enzimas do sistema de eliminação dos radicais livres e de outros compostos tóxicos parece operar de maneira distinta entre os dois cultivares. A produção de  $O_2^{\cdot -}$  e de  $H_2O_2$  por oxido-redutases associadas às membranas é documentada (VIANELLO e MACRI, 1991). Essas reações e os seus produtos estão envolvidos em processos metabólicos naturais como a biossíntese de lignina, senescência, respostas das plantas ao ataque de patógenos e desbalanços nutricionais, por exemplo (SCANDALIOS, 1993).

Segundo CAKMAK e MARSCHNER (1988), a elevação dos níveis de radicais de oxigênio tóxicos pode ser responsável por mudanças nas quantidades e na composição dos fosfolipídios das membranas de células das raízes em plantas deficientes em zinco (Zn) (PINTON et al., 1994). Embora GONÇALVES et al. (1996) não tenham observado a reversão dos efeitos tóxicos do Al em decorrência da aplicação de dosagens crescentes de Zn sobre a atividade da RNase e sobre a concentração de RNA em plantas dos mesmos cultivares de sorgo utilizados neste experimento, os efeitos da deficiência desse micronutriente sobre a produção e eliminação dos radicais livres em plantas estressadas pelo Al não podem ser descartados, uma vez que aqueles autores mostraram a redução da concentração do Zn nos tecidos das raízes dos dois cultivares, mas, principalmente nas raízes do cultivar sensível. Segundo MARSCHNER (1995), a deficiência de Zn pode resultar em aumento na produção de  $O_2^{\cdot -}$  e na redução da eficiência dos mecanismos de desintoxicação dos radicais livres, o que ocorre, provavelmente, em função do Zn fazer parte da estrutura de diversas enzimas do sistema de proteção celular contra danos oxidativos e, também, em decorrência da sua participação efetiva nos mecanismos de estabilização das membranas (PINTON et al., 1994). LUKASZEWSKI e BLEVINS (1996) relataram a existência de correlação entre a nutrição de boro (B), toxicidade por Al e concentração de ascorbato em tecidos de raízes de plantas de abóbora. Os autores verificaram que a adição de B e, ou, de ascorbato à solução nutritiva pode reverter a inibição do alongamento celular observado nas raízes das plantas na presença do Al. O B está diretamente envolvido na biossíntese de lignina, no

metabolismo de compostos fenólicos e, conseqüentemente, na produção de radicais livres e de quinonas (MARSCHNER, 1995).

A desorganização das membranas em decorrência da toxicidade provocada pelo Al pode promover a desesterificação de fosfolipídios e o acúmulo de ácidos graxos livres, o que resulta em alterações nas suas propriedades físico-químicas (VIANELLO e MACRI, 1991). As peroxidases (POXs) associadas às membranas celulares têm a capacidade de gerar  $H_2O_2$  através de uma reação em cadeia envolvendo o  $O_2^-$  (EZAKI et al., 1996). Os ácidos graxos liberados pela ação desses radicais livres provocam a ativação das lipoxigenases (LOXs) e, conseqüentemente, o aumento da peroxidação dos lipídios (VIANELLO e MACRI, 1991). As LOXs são as primeiras enzimas envolvidas nesse processo (OLSSON, 1995 e SAKAKI et al., 1994), embora a participação de outras enzimas como as fosfolipases e as fosfatases do ácido fosfatídico também tenha sido relatada (ROUET-MAYER et al., 1992 e KUMAR e KNOWLES, 1993). Os resultados apresentados nos Quadros 2 e 8 reforçam a possibilidade de que as alterações observadas na composição dos ácidos graxos das membranas do cultivar sensível ao Al podem ter sido uma conseqüência da ação de radicais livres sobre os lipídios, aparentemente, devido às modificações na sua estrutura molecular como decorrência da ação direta do Al. No cultivar tolerante, isso parece não ter ocorrido, provavelmente, pela maior eficiência de seu sistema metabólico de proteção celular contra reações oxidativas.

#### **4.3.1.2. Nos tecidos radiculares e na parte aérea**

Na presença do Al, observou-se um significativo aumento na peroxidação dos lipídios do sistema radicular das plantas, com maior intensidade no cultivar sensível (200,5%) do que no tolerante (125,9%) (Quadro 9). O cultivar sensível mostrou, na presença do Al, valores de peroxidação dos lipídios 70,6% maiores que no tolerante, embora, na sua ausência, os cultivares não tenham diferido estatisticamente. Na parte aérea, o Al não alterou significativamente a peroxidação dos lipídios em nenhum dos cultivares, sendo

que os mesmos não diferiram entre si quanto à concentração de MDA-TBA, independente da presença do Al.

Quadro 9 - Efeito do Al sobre a peroxidação dos lipídios em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Concentração<br>de Al (mM) | Peroxidação dos lipídios (nmoles de MDA-TBA g <sup>-1</sup> MF) |           |             |           |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-----------|
|                            | Sistema Radicular                                               |           | Parte Aérea |           |
|                            | Sensível                                                        | Tolerante | Sensível    | Tolerante |
| 0                          | 21,8 bA <sup>1</sup>                                            | 17,0 bA   | 32,1 aA     | 42,1 aA   |
| 0,185                      | 65,5 aA                                                         | 38,4 aB   | 44,3 aA     | 53,6 aA   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada parte da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados neste experimento foram similares aos obtidos por CAKMAK e HORST (1991) que também detectaram a peroxidação de lipídios em raízes inteiras de plantas de soja, após tratamentos prolongados com Al. Segundo HORST et al. (1992), o Al, isoladamente, não é capaz de promover a peroxidação dos lipídios quando aplicado durante curtos períodos de exposição e em concentrações mais reduzidas. Tanto as concentrações de Al quanto o tempo de exposição utilizados neste experimento foram superiores aos empregados por HORST et al. (1992). ONO et al. (1995) sugerem que, embora os efeitos primários da toxicidade por Al possam estar relacionados ao apoplasto (HORST et al., 1992), as alterações posteriores observadas nas membranas podem ser decorrentes da ação conjunta do Al e do Fe, uma vez que ambos encontram-se solubilizados em ambientes ácidos. Segundo CAKMAK e HORST (1991), o Al potencializa e, ou, facilita a peroxidação dos lipídios pela sua interação com os fosfolipídios, provocando a desorganização das membranas. Embora alguns autores considerem a peroxidação dos lipídios mais consequência do que causa primária dos efeitos tóxicos do Al (CAKMAK e HORST, 1991 e HORST et al., 1992), a participação desse elemento em eventos que resultam na produção de

radicais livres é relatada (ONO et al., 1995). O Al também pode promover a oxidação de compostos fenólicos a quinonas que, por redução, resultam na formação de radicais do tipo semiquinona. Estes, por autooxidação, podem gerar  $O_2^-$  e outras espécies tóxicas de oxigênio (CAKMAK e HORST, 1991).

Neste experimento, o Al promoveu a peroxidação dos lipídios no sistema radicular dos dois cultivares. Contudo, a concentração de MDA-TBA encontrada no cultivar sensível na presença do Al foi bastante superior à verificada no tolerante. O comportamento diferenciado dos dois cultivares pode ser decorrente da ação específica de enzimas do sistema antioxidativo sobre os mecanismos de eliminação dos radicais livres e, ou, ainda, de enzimas oxidativas, cuja ação resulta na formação de hidroperóxidos e na produção desses radicais (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990 e SCANDALIOS, 1993). Como os efeitos tóxicos observados nas células de plantas submetidas a condições estressantes são decorrentes, em última análise, da sua capacidade e, ou, dos seus mecanismos de eliminação de radicais livres e de outras substâncias tóxicas (FOYER et al., 1994 e SCANDALIOS, 1993), os resultados apresentados no Quadro 9 sugerem que, no cultivar tolerante, a eficiência desses processos seja maior do que no sensível, resultando em uma menor intensidade de peroxidação dos lipídios em seus tecidos. Na parte aérea, nenhum dos cultivares apresentou alterações significativas na intensidade de peroxidação dos lipídios, o que vem reforçar as considerações efetuadas quanto à maior sensibilidade do sistema radicular aos efeitos tóxicos do Al (HORST et al., 1992).

#### **4.3.2. Produção de aldeídos voláteis**

Na presença do Al, a produção de aldeídos voláteis no sistema radicular das plantas aumentou 5 e 1,4 vezes, respectivamente, nos cultivares sensível e tolerante (Quadro 10). Nessa condição, a quantidade liberada de aldeídos voláteis foi 28,5% maior no cultivar sensível do que no tolerante. Na ausência do Al, ao contrário, o cultivar tolerante apresentou uma liberação de aldeídos voláteis 93,1% maior que no sensível.

Quadro 10 - Efeito do Al sobre a produção de aldeídos voláteis em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Concentração<br>de Al (mM) | Aldeídos Voláteis ( $\mu\text{g}$ de formaldeído $\text{g}^{-1}$ MF) |           |             |           |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-----------|
|                            | Sistema Radicular                                                    |           | Parte Aérea |           |
|                            | Sensível                                                             | Tolerante | Sensível    | Tolerante |
| 0                          | 17,3 bB <sup>1</sup>                                                 | 33,4 bA   | 53,6 aB     | 79,1 aA   |
| 0,185                      | 103,2 aA                                                             | 80,3 aB   | 59,0 aB     | 86,3 aA   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada parte da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na parte aérea, o Al não mostrou efeito significativo sobre a produção de aldeídos voláteis em nenhum dos cultivares, embora os mesmos tenham diferido entre si. A concentração de aldeídos voláteis nessa parte das plantas do cultivar tolerante foi superior à observada no sensível na presença (46,3%) e na ausência (47,6%) do Al.

Neste experimento, a concentração de aldeídos voláteis no sistema radicular aumentou na presença do Al nos dois cultivares, mas em maior intensidade no cultivar sensível. Os efeitos citotóxicos dos aldeídos são bastante conhecidos. Além de reagirem com grupos sulfidrilas das enzimas provocando a sua inativação, os aldeídos podem também reduzir a taxa de mitose em células e inibir a síntese de tubulinas, principais proteínas dos microtúbulos, necessárias à formação do fuso acromático (WILSON JR. e McDONALD JR., 1986). Os resultados obtidos pelo método do MBTH mostraram-se bastante similares aos observados pelo teste do TBA, discutido anteriormente. Esse comportamento reforça as considerações de que as substâncias produzidas ou, pelo menos, os efeitos decorrentes da presença do Al na solução nutritiva provocam danos muito mais intensos no cultivar sensível do que no tolerante. Isso ocorre, possivelmente, devido à menor eficiência dos mecanismos de eliminação de substâncias tóxicas e de radicais livres do metabolismo celular do cultivar sensível.

#### 4.4. Efeito do Al sobre a atividade enzimática

O Quadro 11 apresenta os resultados encontrados para o efeito do Al sobre a atividade de enzimas antioxidativas envolvidas nos mecanismos de proteção celular contra a peroxidação dos lipídios e, também, de enzimas oxidativas que atuam no sentido de promover e, ou, ativar reações que favorecem a ação dos radicais livres em tecidos do sistema radicular e da parte aérea das plantas dos dois cultivares de sorgo utilizados nos experimentos.

A atividade das peroxidases (POXs) no sistema radicular das plantas aumentou na presença do Al em 28,1 e 22,4% nos cultivares sensível e tolerante, respectivamente. Na parte aérea, o aumento na atividade das POXs causado pelo Al foi de 12,7% no cultivar sensível e de 7,1% no tolerante, sendo que os mesmos não diferiram entre si, independente da presença do Al (Quadro 11).

O aumento da atividade das POXs na presença do Al foi observado também por CAKMAK e HORST (1991) em raízes de soja, principalmente após a exposição prolongada das plantas ao estresse e sob concentrações elevadas. O Al, aparentemente, ativa POXs latentes nos tecidos e, ou, induz o surgimento de isoformas (SIEGEL, 1993). A maior parte das POXs está localizada nas paredes celulares associadas à parede primária, local onde se inicia a lignificação (GASPAR et al., 1985). Na presença do Al, o maior aumento na atividade das POXs observado nas raízes do cultivar sensível sugere que a produção de  $H_2O_2$ , de compostos fenólicos e, ou, de hidroperóxidos, principais substratos dessas enzimas (SIEGEL, 1993), foi mais intensa, o que pode ter contribuído para a maior intensidade de peroxidação dos lipídios nas membranas e nos tecidos desse cultivar (Quadros 8, 9 e 10). Segundo EZAKI et al. (1996), as isoenzimas das POXs participam ativamente da eliminação do  $H_2O_2$  gerado na presença do Al. Conforme suposições desses autores, existe a possibilidade de que a maior parte dos hidroperóxidos gerados pela ação do Al seja enzimaticamente liberada no citossol a partir dos lipídios das membranas e, então, desintoxicada por POXs existentes nessa fração.

Quadro 11 - Efeito do Al sobre a atividade enzimática em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Enzima <sup>2</sup> | Concentração de Al (mM) | Atividade Enzimática |           |             |           |
|---------------------|-------------------------|----------------------|-----------|-------------|-----------|
|                     |                         | Sistema Radicular    |           | Parte Aérea |           |
|                     |                         | Sensível             | Tolerante | Sensível    | Tolerante |
| POXs                | 0                       | 0,96 bA <sup>1</sup> | 0,67 bB   | 0,55 bA     | 0,56 bA   |
|                     | 0,185                   | 1,23 aA              | 0,82 aB   | 0,62 aA     | 0,60 aA   |
| APXs                | 0                       | 20,2 bB              | 27,9 aA   | 22,3 aA     | 13,6 aB   |
|                     | 0,185                   | 27,0 aA              | 13,3 bB   | 15,4 bA     | 7,4 bB    |
| CATs                | 0                       | 0,30 aA              | 0,31 aA   | 0,52 aB     | 0,66 aA   |
|                     | 0,185                   | 0,19 bA              | 0,18 bA   | 0,16 bB     | 0,21 bA   |
| SODs                | 0                       | 308,1 aA             | 242,7 bB  | 489,5 aA    | 492,0 aA  |
|                     | 0,185                   | 310,2 aB             | 348,2 aA  | 517,7 aA    | 501,5 aA  |
| POLs                | 0                       | 0,45 bA              | 0,47 aA   | 0,47 aA     | 0,48 aA   |
|                     | 0,185                   | 0,59 aA              | 0,48 aB   | 0,47 aA     | 0,47 aA   |
| LOXs                | 0                       | 5,2 aA               | 2,6 aB    | 0,5 bA      | 0,2 bB    |
|                     | 0,185                   | 0,8 bA               | 0,6 bA    | 1,1 aA      | 0,5 aB    |
| PALs                | 0                       | 5,0 aB               | 8,9 aA    | 1,2 aB      | 1,8 aA    |
|                     | 0,185                   | 4,0 bB               | 6,2 bA    | 1,1 aB      | 1,9 aA    |
| CADs                | 0                       | 86,8 aA              | 78,4 bA   | 60,9 aA     | 60,9 aA   |
|                     | 0,185                   | 72,3 bB              | 107,9 aA  | 51,2 aA     | 64,5 aA   |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada parte da planta e para cada enzima, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> POXs - Peroxidases (mmoles de purpurogalina min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF)

APXs - Peroxidases do ascorbato (µmoles de ácido ascórbico min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF)

CATs - Catalases (mmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF)

SODs - Dismutases do superóxido (unidades de SOD min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF)

POLs - Oxidases dos polifenóis (mmoles de purpurogalina min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF)

LOXs - Lipoxigenases (µmoles de hidroperóxidos do ácido linoléico min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF)

PALs - Amônia liases da fenilalanina (nmoles de ácido *trans*-cinâmico h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF)

CADs - Desidrogenases dos álcoois cinâmílicos (nmoles de NADPH min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF).

A atividade das POXs na parte aérea das plantas na presença do Al foi aumentada em menor intensidade do que no sistema radicular (Quadro 11). Segundo SIEGEL (1993), o papel das POXs no metabolismo das plantas depende da espécie em questão, do órgão envolvido e do estágio de desenvolvimento. Aparentemente, os efeitos mais drásticos do Al se manifestam no sistema radicular, embora a sua ação tóxica sobre outros processos fisiológicos como a fotossíntese, por exemplo, também tenha sido relatada (CAMBRAIA et al., 1983 e MOUSTAKAS et al., 1995).

Na presença do Al, as peroxidases do ascorbato (APXs) apresentaram comportamento distinto do observado para as POXs, uma vez que a atividade das enzimas aumentou no sistema radicular do cultivar sensível (33,7%), mas, em contrapartida, reduziu no do tolerante (52,3%) (Quadro 11). A atividade das APXs no sistema radicular do cultivar sensível na ausência do Al foi menor que no tolerante, mas, na sua presença, foi 103% maior. Na parte aérea, a atividade das APXs na presença do Al reduziu nos dois cultivares, com percentuais de redução de 30,9% para o cultivar sensível e de 45,6% para o tolerante. Esses resultados sugerem que, no sistema radicular do cultivar sensível, a formação e, ou, o acúmulo de  $H_2O_2$  foram aumentados pela ação do Al, o que pode ter concorrido para a maior intensidade de peroxidação dos lipídios, conforme verificado nas membranas e nos tecidos desse cultivar (Quadros 8, 9 e 10). Segundo ASADA (1992), as APXs estão envolvidas em mecanismos de eliminação do  $H_2O_2$  e de hidroperóxidos orgânicos formados nos plastídios, local onde a participação das catalases (CATs) é pouco provável. A maior intensidade de aumento na atividade das POXs observada na presença do Al no sistema radicular do cultivar sensível pode, também, ter contribuído para um maior acúmulo de  $H_2O_2$  nos tecidos desse cultivar e, conseqüentemente, para o aumento da atividade das APXs. Como o conteúdo de  $H_2O_2$  não foi medido neste trabalho, a possibilidade de que o aumento da atividade das APXs nas raízes do cultivar sensível tenha sido decorrente da oxidação do ascorbato por compostos fenólicos e, ou, ainda, do seu consumo como substrato de alguma outra enzima também



não pode ser descartada, uma vez que o extrato enzimático utilizado no experimento não foi submetido à purificação.

A atividade das catalases (CATs), por sua vez, foi significativamente reduzida no sistema radicular de ambos os cultivares na presença do Al (Quadro 11). Os percentuais de redução foram de 36,7% para o cultivar sensível e de 41,9% para o tolerante. Nessa parte das plantas, a atividade das CATs não diferiu entre os cultivares na presença ou não do Al. Na parte aérea, a redução na atividade das enzimas causada pelo Al nos dois cultivares foi maior que no sistema radicular. No cultivar sensível, a redução foi de 69,2% e no tolerante de 68,2%. Os cultivares diferiram entre si, sendo a atividade das enzimas maior no tolerante do que no sensível.

Segundo CAKMAK e HORST (1991), o aumento da atividade das POXs e a redução da atividade das CATs indicam que, na presença do Al, o  $H_2O_2$  é mais consumido em processos oxidativos como, por exemplo, durante a peroxidação dos lipídios, do que desintoxicado do metabolismo. A maior intensidade de redução na atividade das CATs na parte aérea dos dois cultivares, aparentemente, não está relacionada ao acúmulo de Al nesses tecidos, uma vez que esse elemento tóxico é encontrado em maiores quantidades no sistema radicular (GONÇALVES et al., 1996). A redução da atividade das CATs no sistema radicular e, também, na parte aérea das plantas dos dois cultivares sugere uma participação limitada dessas enzimas nos mecanismos de eliminação do  $H_2O_2$  produzido como resposta à toxicidade pelo Al. Nesse caso, o  $H_2O_2$  formado naturalmente e, ou, pela ação das dismutases do superóxido (SODs) deve ser eliminado do metabolismo celular por algum outro mecanismo e, ou, ainda, com a participação de outra enzima. Como a atividade das APXs foi também reduzida no sistema radicular do cultivar tolerante e na parte aérea dos dois cultivares (Quadro 11), é possível deduzir que, pelo menos nesses tecidos, o acúmulo do  $H_2O_2$  eventualmente formado pela ação tóxica do Al não tenha sido muito intenso, embora a menor redução da atividade das CATs no sistema radicular do cultivar sensível possa sugerir o contrário. O aumento observado na atividade das

POXs no sistema radicular e na parte aérea das plantas (Quadro 11) parece ter sido o principal mecanismo enzimático de quebra do  $H_2O_2$  formado nos tecidos de ambos os cultivares na presença do Al.

A atividade das dismutases do superóxido (SODs) nos tecidos dos cultivares mostrou um comportamento distinto das demais enzimas. Na presença do Al, a atividade das SODs foi aumentada somente no sistema radicular do cultivar tolerante (Quadro 11). É interessante observar que, na ausência do Al, a atividade das enzimas no cultivar sensível foi 26,9% maior que no tolerante, mas, na sua presença, foi 10,9% menor. Na parte aérea, a atividade das SODs não foi alterada pelo Al em nenhum dos cultivares, sendo que os mesmos não diferiram estatisticamente.

Na presença do Al, o aumento da atividade das SODs nas raízes do cultivar tolerante, certamente, contribuiu para a redução dos níveis de  $O_2^{\cdot -}$  e, conseqüentemente, para a redução da peroxidação dos lipídios (ZHANG e KIRKHAM, 1996). CAKMAK e HORST (1991) também observaram o aumento da atividade das SODs em ápices de raízes de soja na presença do Al. Segundo SCANDALIOS (1993), como o  $O_2^{\cdot -}$  e os seus derivados são altamente tóxicos ao metabolismo, a ocorrência de uma atividade basal das SODs torna-se necessária à manutenção adequada dos mecanismos de proteção celular contra a peroxidação dos lipídios. Uma conseqüência da maior atividade das SODs no sistema radicular do cultivar tolerante na presença do Al pode ter sido o aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , embora se saiba que o excesso desse radical tóxico exerça ação inibitória sobre essas enzimas (KRÖNINGER et al., 1992). A eliminação do  $H_2O_2$  eventualmente produzido em decorrência da ação das SODs pode ser realizada por POXs associadas às membranas (EZAKI et al., 1996). Essas enzimas utilizam o  $H_2O_2$  em reações de oxidação dos monolignóis, produzindo radicais fenoxi-mesoméricos que se condensam espontaneamente durante a etapa final de deposição da lignina na parede celular (WHETTEN e SEDEROFF, 1995 e EZAKI et al., 1996). Como a atividade das SODs no sistema radicular do cultivar sensível não foi significativamente alterada pela presença do Al na solução nutritiva, o aumento observado na atividade das APXs nessa parte das

plantas (Quadro 11) reforça a possibilidade da oxidação do ascorbato por compostos fenólicos presentes no extrato enzimático não purificado. O aumento de 31,1% na atividade das oxidases dos polifenóis (POLs) verificado na presença do Al somente no sistema radicular do cultivar sensível fortalece essa idéia (Quadro 11). Na presença do Al, a atividade das POLs diferiu estatisticamente entre os cultivares, sendo 20,4% maior no cultivar sensível. Na parte aérea, o Al não alterou significativamente a atividade das enzimas.

A atividade das POLs é aumentada em resposta a diversos tipos de estresses, o que se verifica, também, sob condições de deficiências nutricionais (MAYER, 1987). Segundo LUKASZEWSKI e BLEVINS (1996), o Al inibe o crescimento das raízes pela indução de deficiência de boro (B), resultando num desvio do ciclo das pentoses-fosfato para a biossíntese de compostos fenólicos, o que pode ser acompanhado, também, pelo aumento da atividade das POLs (MARSCHNER, 1995). O acúmulo de compostos fenólicos e o aumento na atividade das POLs resultam na produção de intermediários altamente reativos como quinonas derivadas do ácido caféico que, juntamente com outros compostos fenólicos, são efetivas na produção de  $O_2^-$  (MARSCHNER, 1995). Na presença do Al, o aumento observado na atividade das POLs somente nos tecidos do sistema radicular do cultivar sensível pode ser considerado um indicativo seguro da produção de radicais livres. Além disso, as deficiências de B (LUKASZEWSKI e BLEVINS, 1996) e de Zn (GONÇALVES et al., 1996) verificadas na presença do Al no sistema radicular das plantas também podem resultar na produção e, ou, no acúmulo de compostos fenólicos, de quinonas e de radicais livres que, em última análise, promovem a peroxidação dos lipídios, conforme foi observado, principalmente, nas membranas e nos tecidos das raízes do cultivar sensível, em seções anteriores deste trabalho (Quadros 8, 9 e 10).

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas oxidativas responsáveis pela formação de hidroperóxidos a partir de ácidos graxos polinsaturados. A atividade das LOXs no sistema radicular das plantas foi reduzida na presença do Al em percentuais de 84,6 e 76,9%, respectivamente, nos cultivares sensível e tolerante

(Quadro 11). Na parte aérea e na ausência do Al, a atividade das LOXs foi menor que no sistema radicular. Na presença do Al, entretanto, a atividade das enzimas aumentou nos dois cultivares com maior intensidade no tolerante (150%) do que no sensível (120%).

Embora a maior parte dos trabalhos da literatura apresentem relatos de aumentos na atividade das LOXs sob condições de estresses diversos, neste experimento, ao contrário do esperado, a atividade enzimática na presença do Al foi reduzida no sistema radicular dos dois cultivares, principalmente no sensível (KUMAR e KNOWLES, 1993). Como a peroxidação dos lipídios foi aumentada nas raízes de ambos os cultivares na presença do Al, o incremento da atividade das LOXs era esperado, uma vez que os catabólitos formados pela ação dessas enzimas sobre ácidos graxos polinsaturados estão sujeitos à decomposição a aldeído malônico e a outros aldeídos, produtos da peroxidação dos lipídios (OLSSON, 1995). Deve-se ressaltar que a determinação da atividade das LOXs foi realizada apenas no décimo dia de cultivo e, portanto, a redução da atividade enzimática pode ter sido um fenômeno momentâneo. Embora não tenha sido realizado o monitoramento ao longo do tempo, acredita-se que, pelo menos no início do estresse por Al, a atividade das LOXs tenha aumentado, uma vez que o processo de peroxidação dos lipídios torna-se auto-propagativo após a liberação dos hidroperóxidos pela ação dessas enzimas. ZHANG e KIRKHAM (1996) observaram reduções na peroxidação dos lipídios e na atividade das LOXs em tecidos foliares de plantas de sorgo na presença de *n*-propil galato, um composto fenólico anti-oxidante que apresenta efeitos diretos sobre a eliminação do  $O_2^-$  e que atua, também, como inibidor da atividade das LOXs (TODD et al., 1990). O acúmulo de compostos fenólicos em plantas tratadas com Al também foi relatado por CAKMAK e HORST (1991) em raízes de soja. No presente trabalho, o aumento observado na atividade das POLs na presença do Al somente no sistema radicular do cultivar sensível (Quadro 11) pode ser considerado um indicativo seguro da maior produção e, ou, do acúmulo de compostos fenólicos em seus tecidos. A inibição da atividade das LOXs ao longo do tempo pode ser, portanto,

um mecanismo metabólico eficiente para a redução dos danos provocados pela peroxidação dos lipídios na presença do Al. Na parte aérea, por outro lado, o aumento observado na atividade das LOXs pode ser um reflexo do menor acúmulo de compostos fenólicos nessa parte das plantas, o que possibilitaria a manutenção da atividade enzimática em níveis mais elevados, uma vez que os mecanismos de eliminação de radicais livres parecem ser menos alterados pelo Al, que se acumula em menor quantidade nas folhas (GONÇALVES et al., 1996). Infelizmente, não foram encontrados trabalhos na literatura associando a atividade das LOXs à toxicidade provocada pelo Al.

Na presença do Al, a atividade das amônia liases da fenilalanina (PALs), enzimas-chave do metabolismo secundário, foi reduzida em 20% no sistema radicular do cultivar sensível e em 30,3% no do tolerante (Quadro 11). Os cultivares diferiram entre si, sendo a atividade das PALs no cultivar tolerante maior que no sensível na presença ou não do Al. Na parte aérea, a atividade das enzimas não foi alterada pelo Al, embora os cultivares tenham diferido estatisticamente.

A redução observada na atividade das PALs na presença do Al no sistema radicular dos dois cultivares pode ter sido decorrente da inibição das enzimas por compostos fenólicos, uma vez que este experimento foi avaliado somente no décimo dia de tratamento, quando os sintomas de toxicidade pelo Al e o escurecimento das raízes eram intensos. SATO et al. (1982) verificaram a redução da atividade das PALs em tecidos de batata-doce e de ervilha na presença de compostos fenólicos. CAHILL e McCOMB (1992) relataram variações no tempo e no espaço da atividade das PALs em raízes de plantas de eucalipto, como resultado do acúmulo de compostos fenólicos e de lignina. Segundo observações de CAMPBELL e SEDEROFF (1996), um aumento inicial na atividade das PALs parece ser necessário apenas para redirecionar o fluxo da fenilalanina para a biossíntese dos fenilpropanóides. A redução observada na atividade das PALs na presença do Al no sistema radicular das plantas também pode ter sido decorrente da ação de mecanismos de controle da transcrição

(CAMPBELL e ELLIS, 1992) e, ou, até mesmo da inativação da enzima (RITENOUR e SALTVEIT, 1996). Esses mecanismos são desencadeados no sentido de reduzir o conteúdo de compostos fenólicos, a formação de radicais superóxidos e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios. Portanto, o maior percentual de redução na atividade das PALs observado no sistema radicular das plantas do cultivar tolerante na presença do Al pode ter contribuído para a menor intensidade de peroxidação dos lipídios, conforme verificado nas membranas e nos tecidos desse cultivar (Quadros 8, 9 e 10). Embora tenha reduzido em intensidade superior ao cultivar sensível, a maior atividade das PALs observada na presença do Al no sistema radicular do cultivar tolerante pode ser considerada um indicativo de que o funcionamento do metabolismo secundário nas plantas desse cultivar foi mantido em nível satisfatório, mesmo após a manifestação dos efeitos tóxicos do Al.

A atividade das desidrogenases dos álcoois cinamílicos (CADs), enzimas marcadoras da lignificação, apresentou redução de 16,7% no sistema radicular das plantas do cultivar sensível na presença do Al (Quadro 11). No cultivar tolerante, ao contrário, a atividade das CADs aumentou em 37,6% na presença do Al. Na parte aérea, a atividade dessas enzimas não foi significativamente alterada pela presença do Al na solução nutritiva e os cultivares não diferiram estatisticamente.

A redução observada na atividade das CADs no sistema radicular do cultivar sensível na presença do Al também pode não representar o comportamento das enzimas ao longo do tempo, uma vez que a atividade foi determinada apenas no décimo dia de tratamento, quando os sintomas de toxicidade eram pronunciados. Segundo DIXON e PAIVA (1995), a atividade das CADs pode ser estabilizada e, ou, até mesmo reduzida após estresses prolongados, uma vez que diversos compostos fenólicos podem atuar como inibidores dessas enzimas. Além disso, SARNI et al. (1984) verificaram que a atividade das CADs pode ser reduzida sob condições de deficiência de Zn, sugerindo que este micronutriente seja parte do centro ativo e, ou, um ativador

metálico dessas enzimas. Resultados obtidos por GONÇALVES et al. (1996), trabalhando com os mesmos cultivares de sorgo utilizados neste experimento, que evidenciaram uma redução na concentração de Zn no sistema radicular e na parte aérea das plantas, mas, principalmente nos tecidos do cultivar sensível, reforçam as considerações de SARNI et al. (1984).

Na presença do Al, o aumento observado na atividade das CADs no sistema radicular das plantas do cultivar tolerante sugere uma maior lignificação dos tecidos, sendo uma estratégia provável utilizada pelas plantas desse cultivar no sentido de reduzir o acúmulo de compostos fenólicos e, ou, de  $H_2O_2$ , substâncias potencialmente tóxicas ao metabolismo celular (SIEGEL, 1993, CAKMAK e HORST, 1991). O monitoramento da atividade das CADs ao longo do tempo poderia esclarecer melhor a participação dessas enzimas nos processos de lignificação dos tecidos das plantas na presença do Al.

A comparação dos resultados encontrados para os efeitos do Al sobre a atividade enzimática (Quadro 11) com aqueles obtidos para a peroxidação dos lipídios (Quadros 8, 9 e 10) sugere que, no cultivar tolerante, os mecanismos enzimáticos de proteção celular contra estresses oxidativos operam com maior eficiência do que no sensível. Os resultados mostraram, também, que os efeitos tóxicos do Al são muito mais intensos no sistema radicular das plantas, possivelmente em decorrência do maior acúmulo de Al nesses tecidos. Dentre as principais modificações observadas na atividade enzimática, aquelas que podem ter contribuído, efetivamente, para a menor intensidade de peroxidação dos lipídios no sistema radicular do cultivar tolerante na presença do Al foram o aumento na atividade das SODs e das CADs e, ainda, a maior redução na atividade das PALs. Essas alterações, aparentemente, resultaram num menor acúmulo de  $O_2^-$  e de compostos fenólicos tóxicos nos tecidos do sistema radicular do cultivar tolerante. A maior intensidade de aumento na atividade das POXs e o aumento na atividade das POLs observados no sistema radicular do cultivar sensível na presença do Al sugerem que o conteúdo de  $H_2O_2$  e de compostos fenólicos nesse cultivar foi mais intenso, o que pode ter contribuído

para a maior ocorrência de danos oxidativos nas suas membranas e em seus tecidos. O maior acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos radiculares do cultivar sensível parece ter concorrido para a maior intensidade de redução na atividade das LOXs e, também, na atividade das CADs nas plantas desse cultivar, uma vez que tais substâncias são inibidoras dessas enzimas. As reduções observadas nas atividades das CATs e das APXs no sistema radicular das plantas de ambos os cultivares na presença do Al sugerem uma contribuição reduzida dessas enzimas nos mecanismos de quebra do  $H_2O_2$ , o que reforça a possibilidade de que esse radical seja mais consumido em reações peroxidativas do que desintoxicado do metabolismo celular das plantas sob condições de estresse por Al.

#### 4.5. Efeito do Al sobre compostos fenólicos

##### 4.5.1. Teor de lignina

O Al aumentou o teor de lignina no sistema radicular das plantas dos cultivares sensível e tolerante em 32,3 e 42,3%, respectivamente (Quadro 12). O teor de lignina no sistema radicular diferiu estatisticamente entre os cultivares, sendo que o sensível apresentou valores mais elevados tanto na presença (10,8%) quanto na ausência do Al (19,2%). Na parte aérea, o teor de lignina nos tecidos não foi influenciado pelo Al, embora os cultivares tenham diferido entre si. Nessa porção, o cultivar tolerante mostrou maior teor de lignina que o sensível na presença ou não do Al.

Quadro 12 - Efeito do Al sobre o teor de lignina em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Concentração<br>de Al (mM) | Lignina (Absorvância Líquida $_{280\text{ nm}}$ $\text{mg}^{-1}$ MF) |           |             |           |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-----------|
|                            | Sistema Radicular                                                    |           | Parte Aérea |           |
|                            | Sensível                                                             | Tolerante | Sensível    | Tolerante |
| 0                          | 0,031 bA <sup>1</sup>                                                | 0,026 bB  | 0,017 aB    | 0,019 aA  |
| 0,185                      | 0,041 aA                                                             | 0,037 aB  | 0,017 aB    | 0,019 aA  |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada parte da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Embora SNOWDEN e GARDNER (1993) tenham identificado um gene induzido pelo Al em raízes de plantas de trigo apresentando homologia de sequência para as PALs, o papel regulatório dessas enzimas na biossíntese de lignina é questionável (LEWIS e YAMAMOTO, 1990), uma vez que a modulação da sua atividade afetaria todos os produtos do metabolismo dos fenilpropanóides, uma via metabólica responsável pela produção de diversos compostos fenólicos como os flavanóides e os taninos, por exemplo. O aumento da atividade das CADs, enzimas responsáveis pela produção dos monômeros *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil na etapa anterior à polimerização da lignina, é considerado uma forte evidência da biossíntese e do acúmulo dessa substância (MITCHELL et al., 1994). Segundo SIEGEL (1993), a polimerização da lignina com a participação das POXs e das POLs é um mecanismo eficiente para a remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e para a imobilização de compostos fenólicos tóxicos (WHETTEN e SEDEROFF, 1995).

Neste experimento, na presença do Al, a deposição de lignina foi aumentada nos dois cultivares, mas em maior intensidade no tolerante. Embora, na presença do Al, a atividade das PALs tenha reduzido nas raízes dos dois cultivares e a das CADs aumentado somente no sistema radicular das plantas do cultivar tolerante (Quadro 11), a participação dessas enzimas no acúmulo de lignina nos tecidos dos dois cultivares não pode ser descartada. Após tratamentos prolongados com o Al, a possibilidade de inativação ou, pelo menos, de inibição momentânea da atividade das PALs e das CADs como um resultado do acúmulo de produtos finais das reações catalisadas por essas enzimas e, principalmente, de compostos fenólicos tóxicos, também deve ser considerada (CAKMAK e HORST, 1991 e CAMPBELL e ELLIS, 1992). O acompanhamento da atividade enzimática ao longo do tempo poderia esclarecer melhor a importância das PALs e das CADs nos processos de acúmulo de lignina nas raízes das plantas submetidas ao estresse por Al.

O maior acúmulo de lignina nas raízes do cultivar tolerante na presença do Al parece ser resultante da ativação de mecanismos celulares de remoção de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de imobilização de compostos fenólicos tóxicos nos tecidos desse cultivar, uma vez que a atividade das SODs nas suas raízes foi aumentada sem que se tenha observado um incremento proporcional nas atividades das CATs, das APXs e das POXs (Quadro 11), enzimas que poderiam reduzir o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos (SIEGEL, 1993). Embora SASAKI et al. (1996) não considerem o fenômeno de deposição de lignina em raízes um fator primário dos efeitos tóxicos do Al, mas apenas uma resposta secundária das plantas à injúria, esse mecanismo pode ter sido importante para a redução da peroxidação dos lipídios nas membranas e nos tecidos das raízes das plantas do cultivar tolerante na presença do Al, conforme observado neste trabalho.

#### **4.5.2. Teor de compostos fenólicos solúveis**

Na presença do Al, o teor de compostos fenólicos solúveis aumentou no sistema radicular dos dois cultivares (Quadro 13). No cultivar sensível, o aumento foi mais intenso (6,1 vezes) do que no tolerante (2,2 vezes). O cultivar tolerante apresentou teores de compostos fenólicos solúveis maiores que no sensível na presença (34,3%) e na ausência (198,6%) do Al. Na parte aérea, o Al também provocou um aumento do teor de compostos fenólicos, mas em menor intensidade do que no sistema radicular. No cultivar sensível, o aumento foi de 57% e no tolerante de 47,1%. Os cultivares diferiram entre si, sendo o acúmulo de compostos fenólicos solúveis no cultivar sensível maior que no tolerante na presença (38,7%) e na ausência (30%) do Al.

O acúmulo de compostos fenólicos é uma característica típica de plantas deficientes em boro (B), o que parece estar relacionado com a função desse elemento na formação de complexos *cis*-diol com açúcares e fenóis (MARSCHNER, 1995). A redução do crescimento em raízes de plantas estressadas com Al tem sido revertida pela adição de B à solução nutritiva (LeNOBLE et al., 1996 e LUKASZEWSKI e BLEVINS, 1996). Essa reversão dos efeitos tóxicos do Al pode ser decorrente, dentre outros fatores, da redução

do teor de compostos fenólicos, uma vez que o Al parece reduzir a concentração de B nas raízes. Segundo MARSCHNER (1995), sob deficiência de B ocorre o

Quadro 13 - Efeito do Al sobre o teor de compostos fenólicos solúveis em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Concentração<br>de Al (mM) | Compostos Fenólicos Solúveis ( $\mu\text{g}$ de tirosina $\text{g}^{-1}$ MF) |           |             |           |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-----------|
|                            | Sistema Radicular                                                            |           | Parte Aérea |           |
|                            | Sensível                                                                     | Tolerante | Sensível    | Tolerante |
| 0                          | 58,0 bB <sup>1</sup>                                                         | 173,2 bA  | 214,9 bA    | 165,3 bB  |
| 0,185                      | 410,0 aB                                                                     | 550,8 aA  | 337,3 aA    | 243,1 aB  |

<sup>1</sup> As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas na linha, para cada parte da planta, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

acúmulo de compostos fenólicos acompanhado pelo aumento da atividade das POLs nos tecidos. Esse processo pode resultar na produção de quinonas altamente reativas, que estão envolvidas na peroxidação dos lipídios das membranas (MARSCHNER, 1995). Segundo CAKMAK e HORST (1991), após tratamentos prolongados com Al, as raízes das plantas tornam-se escuras, o que pode indicar a ocorrência de oxidação de compostos fenólicos por quinonas citotóxicas. Aparentemente, o processo de toxicidade provocado pelas quinonas é decorrente da sua redução inicial à semiquinona. Este radical, por sua vez, forma radicais superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ) em reações de autooxidação, além de outras espécies tóxicas de oxigênio (CAKMAK e HORST, 1991).

Neste experimento, o teor de compostos fenólicos solúveis foi aumentado nos dois cultivares e nas duas partes da planta na presença do Al. Contudo, nas raízes do cultivar sensível, o incremento foi muito mais intenso, coincidindo com o aumento observado nas atividades das POXs, das APXs e das POLs, principalmente nas raízes desse cultivar (Quadro 11). O aumento na atividade dessas enzimas parece ter sido provocado pelo elevado teor de compostos fenólicos presentes nos seus tecidos, uma vez que, dentre outras substâncias mais específicas, esses compostos podem, também, ser utilizados como substratos (GASPAR et al., 1985; MAYER, 1987 e AMAKO et al., 1994). O aumento do

teor de compostos fenólicos observado na presença do Al parece ter sido o responsável pela redução das atividades das LOXs e das PALs no sistema radicular de ambos os cultivares, bem como pela redução na atividade das CADs nas raízes do cultivar sensível (Quadro 11), conforme sugerem resultados da literatura (CAMPBELL e ELLIS, 1992 e WHETTEN e SEDEROFF, 1995).

Neste trabalho, a atividade das LOXs na presença do Al reduziu em intensidade muito maior nas raízes do cultivar sensível, o que coincidiu com o maior acúmulo de compostos fenólicos solúveis nos tecidos desse cultivar (Quadro 11). Portanto, a possibilidade de que a atividade das LOXs tenha aumentado no início do tratamento com Al é reforçada, o que poderia ser esclarecido pelo monitoramento da atividade dessas enzimas ao longo do tempo. No caso das PALs, a atividade das enzimas foi reduzida em maior intensidade nas raízes do cultivar tolerante (Quadro 11). Esse comportamento, aparentemente, pode estar relacionado aos mecanismos de proteção celular das raízes contra o excesso de intermediários tóxicos, o que parece ter resultado num menor acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos do cultivar tolerante. Portanto, a redução na atividade dessas enzimas, após tratamentos prolongados com Al, pode ser decorrente da inibição da sua biossíntese por compostos intermediários e, ou, pelos produtos finais das reações. O comportamento específico observado em cada cultivar parece contribuir diretamente para a tolerância diferencial dos mesmos ao Al. O acúmulo de compostos fenólicos solúveis na parte aérea das plantas dos dois cultivares foi menos intenso que no sistema radicular. Isso, aparentemente, está relacionado com o sítio primário da toxicidade provocada pelo Al, que se verifica, principalmente, nas raízes das plantas.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos do alumínio (Al) em nível tóxico sobre os sistemas metabólicos que controlam a produção e a eliminação de radicais livres e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios em plantas de dois cultivares de sorgo, um sensível (BR007A) e outro tolerante (BR006R) ao Al, cultivadas durante 10 dias em solução nutritiva, pH 4,0, na presença (0,185 mM) e na ausência do Al.

Na presença do Al, a atividade da  $H^+$ -ATPase reduziu no sistema radicular dos dois cultivares, principalmente nas membranas plasmáticas provenientes dos ápices das raízes do cultivar tolerante, o que, aparentemente, diminui o acúmulo de Al nas células das raízes desse cultivar e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios.

Dentre as principais modificações verificadas sobre a composição de ácidos graxos da membrana plasmática na presença do Al, as mais importantes foram observadas nos ápices das raízes, onde a relação ácidos graxos insaturados/ácidos graxos saturados e, principalmente, o índice de ligações duplas para ácidos graxos com dezoito carbonos foram bastante reduzidos no cultivar sensível. Alterações como essas, provocadas pelo Al, podem resultar em modificações na fluidez, na espessura e em outras propriedades funcionais e estruturais das membranas. Aparentemente, as alterações na composição dos

ácidos graxos na presença do Al fazem parte dos mecanismos de reajustamento das propriedades físico-químicas das membranas, que são alteradas em decorrência do estresse.

Na presença do Al, a concentração do ácido linolênico reduziu nas membranas provenientes dos ápices das raízes do cultivar sensível, mas, de modo contrário, aumentou muito no tolerante. As variações observadas no comportamento dos dois cultivares permitem sugerir que, no sensível, a redução no conteúdo desse ácido graxo na presença do Al tenha sido decorrente do seu consumo em reações peroxidativas. Essa possibilidade foi evidenciada pelos resultados encontrados para a peroxidação dos lipídios, onde o cultivar sensível apresentou, na presença do Al, valores mais elevados que o tolerante, principalmente nas membranas provenientes dos ápices das raízes e, também, nos tecidos radiculares. No cultivar sensível, o Al parece exercer efeito direto sobre a estrutura da membrana plasmática, tornando-a mais sensível à ação dos radicais livres e, conseqüentemente, à peroxidação.

A atividade enzimática nos tecidos das plantas foi bastante alterada na presença do Al. A atividade das peroxidases (POXs) aumentou nas raízes e nas folhas dos dois cultivares, principalmente no sensível, o que sugere uma maior produção de  $H_2O_2$ , de compostos fenólicos e, ou, de hidroperóxidos, principais substratos dessas enzimas, no cultivar sensível, sendo uma das possíveis causas da maior intensidade de peroxidação dos lipídios nas membranas e nos tecidos desse cultivar.

De modo contrário, na presença do Al, a atividade das peroxidases do ascorbato (APXs) e das catalases (CATs) reduziu nos tecidos das plantas, exceto nas raízes do cultivar sensível, onde o aumento da atividade das APXs foi verificado. As reduções observadas na atividade dessas enzimas sugerem que, na presença do Al, o  $H_2O_2$  não é eficientemente desintoxicado do metabolismo, devendo ser consumido, principalmente, em processos peroxidativos e, ou, de lignificação.

Na presença do Al, a atividade das dismutases do superóxido (SODs) foi aumentada somente nas raízes do cultivar tolerante, levando a crer que, nesse cultivar, os mecanismos de eliminação de  $O_2^-$  apresentam maior eficiência que no sensível. O aumento na atividade dessas enzimas pode ter sido a principal causa da menor intensidade de peroxidação dos lipídios nas raízes do cultivar tolerante.

A atividade das oxidases dos polifenóis (POLs) na presença do Al aumentou apenas nas raízes do cultivar sensível, o que sugere um maior acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos desse cultivar. O acúmulo dessas substâncias pode resultar na produção de intermediários altamente reativos como, por exemplo, as quinonas, que são efetivas na produção de  $O_2^-$  e, conseqüentemente, na peroxidação de lipídios.

Na presença do Al, a atividade das lipoxigenases (LOXs) aumentou na parte aérea das plantas em maior intensidade no cultivar tolerante, mas, de modo contrário, reduziu no sistema radicular em maior intensidade no sensível. A maior intensidade de redução na atividade das LOXs nas raízes do cultivar sensível na presença do Al foi, aparentemente, decorrente do maior acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos desse cultivar, embora acredita-se que, no início do tratamento com Al, a atividade das enzimas tenha aumentado, resultando na liberação de hidroperóxidos e, conseqüentemente, na peroxidação dos lipídios.

Nas raízes das plantas, a atividade das amônia liases da fenilalanina (PALs) reduziu na presença do Al em ambos os cultivares, embora, nesse caso, em maior intensidade no tolerante. A maior redução na atividade enzimática no sistema radicular do cultivar tolerante parece ser uma estratégia utilizada pelas plantas desse cultivar, visando proteger os seus tecidos contra o excesso de compostos fenólicos tóxicos, embora também acredita-se que, no início do estresse, a atividade das enzimas tenha aumentado.

O aumento na atividade das desidrogenases dos álcoois cinâmílicos (CADs) verificado somente no sistema radicular do cultivar tolerante na presença do Al coincidiu com o maior acúmulo de lignina observado nas raízes desse

cultivar. A lignificação pode ter sido um mecanismo eficiente de proteção celular contra o excesso de  $H_2O_2$  e de compostos fenólicos tóxicos.

Na presença do Al, o teor de compostos fenólicos solúveis aumentou nas raízes e, também, nas folhas dos dois cultivares, principalmente no sensível, o que pode, pelo menos em parte, explicar os aumentos observados nas atividades das POXs, das APXs e das POLs e, ainda, as reduções nas atividades das LOXs e das CADs, principalmente no sistema radicular do cultivar sensível.

Todos os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, na presença do Al, o cultivar tolerante produza menores quantidades de radicais de oxigênio livres ou, então, possua mecanismos enzimáticos de remoção, de imobilização e, ou, de neutralização desses radicais mais eficientes que no cultivar sensível, o que, aparentemente, resultou na menor intensidade de peroxidação dos lipídios nos tecidos das raízes e da parte aérea e, especificamente, nas membranas provenientes dos ápices das raízes das plantas do cultivar tolerante.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAKO, K. CHEN, G-X., ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastidic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiol.** Kyoto, v. 33, n. 3, p. 497-504, 1994.
- ANDERSON, M.D., PRASAD, T.K., STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiol.** Rockville, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, 1995.
- ARCHAMBAULT, D.J., ZHANG, G., TAYLOR, G.J. Accumulation of Al in root mucilage of on Al-resistant and an Al-sensitive cultivar of wheat. **Plant Physiol.** Rockville, v. 112, n. 4, p. 1471-1478, 1996.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.
- ASAKAWA, T., MATSUSHITA, S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. **Lipids**, Champaign, v. 15, n. 3, p. 137-140, 1980.
- AXELROD, B., CHEESBROUGH, T.M., LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. **Methods Enzymol.** New York, v. 71, p. 441-451, 1981.
- BARCLAY, C.D., McKERSIE, B.D. Peroxidation reactions in plant membranes: effects of free fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 29, n. 12, p. 877-882, 1994.

- BASU, U., BASU, A., TAYLOR, G.J. Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. **Plant Physiol.** Rockville, v. 106, n. 1, p. 151-158, 1994.
- BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal. Biochem.** Orlando, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BENEYTOUT, J-L., ANDRIANARISON, R-H., RAKOTOARISOA, Z., TIXIER, M. Properties of a lipoxygenase in green algae (*Oscillatoria* sp.). **Plant Physiol.** Rockville, v. 91, n. 1, p. 367-372, 1989.
- BOURGEADE, P., BOYER, N. Plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity in response to mechanical stimulation of *Bryonia dioica* internodes. **Plant Physiol. Biochem.** Paris, v. 32, n. 5, p. 661-668, 1994.
- BOWLER, C., VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Superoxide dismutase in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.** Boca Raton, v. 13, n. 3, p. 199-218, 1994.
- BOWSHER, C.G., FERRIE, B.J.M., GHOSH, S., TODD, J., THOMPSON, J.E., ROTHSTEIN, S.J. Purification and partial characterization of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. **Plant Physiol.** Rockville, v. 100, n. 4, p. 1802-1807, 1992.
- BRISKIN, D.P., BASU, S., ASSMANN, S.M. Characterization of the red beet plasma membrane  $H^+$ -ATPase reconstituted in a planar bilayer system. **Plant Physiol.** Rockville, v. 108, n. 1, p. 393-398, 1995.
- BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymol.** New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CAHILL, D.M., McCOMB, J.A. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Physiol. Molec. Plant Pathol.** London, v. 40, n. 4, p. 315-332, 1992.
- CAKMAK, I., HORST, J.H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 83, n. , p. 463-468, 1991.

- \_\_\_\_\_, MARSCHNER, H. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. **J. Exp. Bot.** London, v. 39, n. 207, p. 1449-1460, 1988.
- \_\_\_\_\_, STRBAC, D., MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **J. Exp. Bot.** London, v. 44, n. 258, p. 127-132, 1993.
- CAMBRAIA, J., CALBO, A.G. Efeito do alumínio sobre a absorção e sobre o transporte de fósforo em dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 27, n. 154, p. 615-625, 1980.
- \_\_\_\_\_, LEMOS FILHO, J.P., OLIVA, M.A., ESTEVÃO, M.M. Efeito do alumínio sobre a fotossíntese em dois cultivares de sorgo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 30, n. 167, p. 55-62, 1983.
- CAMPBELL, M.M., ELLIS, B.E. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. III. purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Physiol.** Rockville, v. 98, n. 1, p. 62-70, 1992.
- \_\_\_\_\_, SEDEROFF, R.R. Variation in lignin content and composition. mechanisms of control and implications for genetic improvement of plants. **Plant Physiol.** Rockville, v. 110, n. 1, p. 3-13, 1996.
- CHANCE, B., MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.** New York, v. 2, p. 764-775, 1955.
- CHEN, J., SUCOFF, E.I., STADELMANN, E.J. Aluminum and temperature alteration of cell membrane permeability of *Quercus rubra*. **Plant Physiol.** Rockville, v. 96, n. 2, p. 644-649, 1991.
- CHÉOUR, F., ARUL, J., MAKHLOUF, J., WILLEMOT, C. Delay of membrane degradation by calcium treatment during cabbage leaf senescence. **Plant Physiol.** Rockville, v. 100, n. 4, p. 1656-1660, 1992.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **J. Agric. Food Chem.** Washington, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.
- COOKE, D.T., BURDEN, R.S. Lipid modulation of plasma membrane-bound ATPases. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 78, n. 1, p. 153-159, 1990.
- Del LONGO, O.T., GONZÁLEZ, C.A., PASTORI, G.M., TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v. 34, n. 7, p. 1023-1028, 1993.

- DELHAIZE, E., CRAIG, S., BEATON, C.D., BENNET, R.J., JAGADISH, V.C., RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiol.** Rockville, v. 103, n. 3, p. 685-693, 1993.
- \_\_\_\_\_, RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol.** Rockville, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.
- DIXON, R.A., PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.
- DOUGLAS, L.C. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. **Trends Plant Sci.** Cambridge, v. 1, n. 6, p. 171-178, 1996.
- EZAKI, B., TSUGITA, S., MATSUMOTO, H. Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 96, n. 1, p. 21-28, 1996.
- FAÇANHA, A.R., deMEIS, L. Inhibition of maize root H<sup>+</sup>-ATPase by fluridone and fluoraluminate complexes. **Plant Physiol.** Rockville, v. 108, n. 1, p. 241-246, 1995.
- FOLCH, J., LEES, M., SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 226, n. 3, p. 497-509, 1957.
- FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 92, n. 4, p. 696-717, 1994.
- FUENTE, J.M., RAMÍREZ-RODRIGUEZ, V., CABRERA-PONCE, J.L., HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, Washington, v. 276, p. 1566-1568, 1997.
- FUKUDA, H., KOMAMINE, A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll on *Zinnia elegans*. **Planta**, Berlin, v. 155, n. 5, p. 423-430, 1982.
- GASPAR, T., PENEL, C., CASTILLO, F.J., GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 64, n. 3, p. 418-423, 1985.

- GEERTS, A., FELTKAMP, D., ROSAHL, S. Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. **Plant Physiol.** Rockville, v. 105, n.1, p. 269-277, 1994.
- GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GONÇALVES, J.F.C., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., PACHECO, S. Aluminum and zinc effects on the metabolism of ribonucleic acid in two sorghum cultivars. **R. Bras. Fisiol. Veg.** Brasília, v. 8, n. 2, p. 81-86, 1996.
- GRABSKI, S., SCHINDLER, M. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiol.** Rockville, v. 108, n. 3, p. 897-901, 1995.
- GRANDMOUNGIN-FERJANI, A., SCHULER-MULLER, I., HARTMANN, M-A. Sterol modulation of plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. **Plant Physiol.** Rockville, v. 113, n. 1, p. 163-174, 1997.
- GRONEWALD, J.D., ABOU-KHALIL, W., WEBER, E.J., HANSON, J.B. Lipid composition of plasma membrane enriched fraction of maize roots. **Phytochem.** Oxford, v. 21, n. 4, p. 859-862, 1982.
- GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **TIBS**, New York, v. 15, p. 129-135, 1990.
- \_\_\_\_\_, QUINLAN, G.J., CLARK, I., HALLIWELL, B. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 835, p. 441-447, 1985.
- HARMAN, G.E., NEDROW, B.L., CLARK, B.E., MATTICK, R. Association of volatile aldehyde production during germination with poor soybean and pea seed quality. **Crop Sci.** Madison, v. 22, n. 4, p. 712-716, 1982.
- HAVIR, E.A., McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiol.** Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** Orlando, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

- HESS, D. Phenols. In: \_\_\_\_ (Ed.) **Plant physiology. molecular, biochemical, and physiological fundamentals of metabolism and development**. New York: Springer Verlag, 1975. p.117-137.
- HORST, W.J., ASHER, C.J., CAKMAK, I., SZULKIEWICZ, P., WISSEMEIER, A.H. Short-term responses of soybean roots to aluminium. **J. Plant Physiol.** Jena, v. 140, n. 1, p. 174-178, 1992.
- HUNTER, D., ETHERTON, B. A model for binding of  $Al^{3+}$  to the phospholipid components of biological membranes. **Plant Physiol.** Rockville, v. 89, Supl. p. 45, 1989.
- JENNINGS, A.C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Anal. Biochem.** Orlando, v. 118, n. 2, p. 396-398, 1981.
- JHAM, G.N., TELES, F.F.F., CAMPOS, L.G. Use of aqueous HCl/MeOH as sterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. **JAOCs**, Champaign, v. 59, n. 3, p. 132-133, 1982.
- JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochem.** Oxford, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, 1984.
- JONES, D.L., KOCHIAN, L.V. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminium toxicity? **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 11, p. 1913-1922, 1995.
- KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiol.** Rockville, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.
- KINRAIDE, T.B. Proton extrusion by wheat roots exhibiting severe aluminum toxicity symptoms. **Plant Physiol.** Rockville, v. 88, n. 2, p. 418-423, 1988.
- KNÖRZER, O.C., DURNER, J., BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 97, n. 2, p. 388-396, 1996.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiol.** Kyoto, v. 34, n. 5, p. 713-721, 1993.

- KOUKOL, J., CONN, E.E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. **J. Biol. Chem.** Bethesda, v. 236, n. 10, p. 2692-2698, 1961.
- KRÖNINGER, W., RENNENBERG, H., POLLE, A. Purification of two superoxide dismutase isozymes and their subcellular localization in needles and roots of norway spruce (*Picea abies* L.) trees. **Plant Physiol.** Rockville, v. 100, n. 1, p. 334-340, 1992.
- KUIPER, P.J.C. Environmental changes and lipid metabolism of higher plants. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 64, n. 1, p. 118-122, 1985.
- KUMAR, G.N.M., KNOWLES, N.R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. **Plant Physiol.** Rockville, v. 102, n. 1, p. 115-124, 1993.
- LARSSON, C., WIDELL, S., KJELLBOM, P. Preparation of high-purity plasma membranes. **Methods Enzymol.** New York, v. 148, p. 558-568, 1987.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Principles of biochemistry.** 2nd. ed. New York: Worth Publishers, Inc. 1993. 1113 p.
- LeNOBLE, BLEVINS, D.G., SHARP, R.E., CUMBIE, B.G. Prevention of aluminium toxicity with supplemental boron. I. maintenance of root elongation and cellular structure. **Plant Cell. Environ.** Oxford, v. 19, n. 10, p. 1132-1142, 1996.
- LEWIS, N.G., YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.** Palo Alto, v. 41, p. 455-496, 1990.
- LINDBERG, S., GRIFFITHS, G. Aluminium effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. **J. Exp. Bot.** London, v. 44, n. 267, p. 1543-1550, 1993.
- LUKASZEWSKI, K.M, BLEVINS, D.G. Root growth inhibition in boron-deficient or aluminum-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. **Plant Physiol.** Rockville, v. 112, n. 3, p. 1135-1140, 1996.
- MANSOUR, M.M.F., van HASSELT, P.R., KUIPER, P.J.C. Plasma membrane lipid alterations induced by NaCl in winter wheat roots. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 92, n. 3, p. 473-478, 1994.

- MARKWELL, M-A.K., HASS, S.M., BIEBER, L.L. A modification of Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal. Biochem.** Orlando, v. 87, n. 1, p. 206-210, 1978.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd. ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MATSUMOTO, H., YAMAMOTO, Y., KASAI, M. Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. **Soil Sci. Plant Nutr.** Tokyo, v. 38, n. 3, p. 411-419, 1992.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants - recent progress. **Phytochem.** Oxford, v. 26, n. 1, p. 11-20, 1987.
- MITCHELL, H.J., HALL, J.L., BARBER, M.S. Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Plant Physiol.** Rockville, v. 104, n. 1, p. 551-556, 1994.
- MORRISON, I.M. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **J. Sci. Food Agric.** London, v. 23, n. 5, p. 455-463, 1972.
- MOUSTAKAS, M., OUZOUNIDOU, G., LANNOYE, R. Aluminum effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminum-tolerant and non-tolerant wheat cultivar. **J. Plant Nutrit.** Monticello, v. 18, n. 4, p. 669-683, 1995.
- MYASAKA, S.C., KOCHIAN, L.V., SHAFF, J.E., FOY, C.D. Mechanisms of aluminum tolerance in wheat: an investigation of genotypic differences in rhizosphere pH,  $K^+$ , and  $H^+$  transport, and root-cell membrane potentials. **Plant Physiol.** Rockville, v. 91, n. 3, p. 1188-1196, 1989.
- NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NAVARI-IZZO, F., QUARTACCI, M.F., IZZO, R. Lipid changes in maize seedlings in response to field water deficits. **J. Exp. Bot.** London, v. 40, n. 215, p. 675-680, 1989.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Free fatty acids, neutral and polar lipids in *Hordeum vulgare* exposed to long-term fumigation with  $SO_2$ . **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 81, n. 4, p. 467-472, 1991.



- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, MELFI, D., IZZO, R. Lipid composition of plasma membranes isolated from sunflower seedlings grown under water-stress. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 87, n. 4, p. 508-514, 1993.
- \_\_\_\_\_, VANGIONI, N., QUARTACCI, M.F. Lipids of soybean and sunflowers seedlings grown under drought conditions. **Phytochem.** Oxford, v. 29, n. 7, p. 2119-2123, 1990.
- NEUBAUER, C., YAMAMOTO, H.Y. Mehler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quenching in intact chloroplasts. **Plant Physiol.** Rockville, v. 99, n. 4, p. 1354-1361, 1992.
- OLSSON, M. Alteration in lipid composition, lipid peroxidation and anti-oxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. **Plant Physiol. Biochem.** Paris, v. 33, n. 5, p. 547-553, 1995.
- ONO, K., YAMAMOTO, Y., HACHIYA, A., MATSUMOTO, H. Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. **Plant Cell Physiol.** Kyoto, v. 36, n. 1, p. 115-125, 1995.
- PALTA, J.P., WHITAKER, B.D., WEISS, L.S. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. **Plant Physiol.** Rockville, v. 103, n. 3, p. 793-803, 1993.
- PELLET, D.M., PAPERNIK, L.A., KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiol.** Rockville, v. 112, n. 2, p. 591-597, 1996.
- PICHORNER, H., COUPERUS, A., KORORI, S.A.A., EBERMANN, R. Plant peroxidase has a thiol oxidase function. **Phytochem.** Oxford, v. 31, n. 10, p. 3371-3376, 1992.
- PINTON, R., CAKMAK, I., MARSCHNER, H. Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxider radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. **J. Exp. Bot.** London, v. 45, n. 270, p. 45-50, 1994.
- QUESADA, M.A., TIGIER, H.A., BUKOVAC, M.J., VALPUESTA, V. Purification of an anionic isoperoxidase from peach seeds and its immunological comparison with other anionic isoperoxidases. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 79, n. 4, p. 623-628, 1990.

- REIS, W.J.P., ROCHA, V.S., REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A., SEDIYAMA, C.S. Correlação entre a evolução de n-hexanal e aldeídos totais e a germinação e vigor de sementes de soja. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 36, n. 203, p. 27-37, 1989.
- RENGEL, Z., GRAHAM, R.D., PEDLER, J.F. Manganese nutrition and accumulation of phenolics and lignin as related to differential resistance of wheat genotypes to the take-all fungus. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 151, n. 2, p. 255-263, 1993.
- RITENOUR, M.A., SALTVEIT, M.E. Identification of a phenylalanine ammonia-lyase inactivating factor in harvested head lettuce (*Lactuca sativa*). **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 97, n. 2, p. 327-331, 1996.
- ROCHESTER, C.P., KJELLBOM, P., LARSSON, C. Lipid composition of plasma membranes from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 71, n. 3, p. 257-263, 1987.
- RÖSLER, J., KREKEL, F., AMRHEIN, N., SCHMID, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. **Plant Physiol.** Rockville, v. 113, n. 1, p. 175-179, 1997.
- ROUET-MAYER, M-A., BUREAU, J-M., LAURIÈRE, C. Identification and characterization of lipooxygenase isoforms in senescing carnation petals. **Plant Physiol.** Rockville, v. 98, n. 3, p. 971-978, 1992.
- RYAN, P.R., DiTOMASO, J.M., KOCHIAN, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **J. Exp. Bot.** London, v. 44, n. 259, p. 437-446, 1993.
- \_\_\_\_\_, EMMANUEL, D., RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 103-110, 1995.
- \_\_\_\_\_, SHAFF, J.E., KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots. correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. **Plant Physiol.** Rockville, v. 99, n. 3, p. 1193-1200, 1992.
- RYYPPÖ, A., VAPAAVUORI, E.M., RIKALA, R., SUTINEN, M-L. Fatty acid composition of microsomal phospholipids and H<sup>+</sup>-ATPase activity in the roots of scots pine seedlings grown at different root temperatures during flushing. **J. Exp. Bot.** London, v. 45, n. 280, p. 1533-1539, 1994.

- SAKAKI, T., TANAKA, K., YAMADA, M. General metabolic changes in leaf lipids in response to ozone. **Plant Cell Physiol.** Kyoto, v. 35, n. 1, p. 53-62, 1994.
- SAMUELS, T.D., KÜÇÜKAKYÜZ, K., RONCÓN-ZACHARY, M. Al partitioning patterns and root growth as related to Al sensitivity and Al tolerance in wheat. **Plant Physiol.** Rockville, v. 113, n. 2, p. 527-534, 1997.
- SANTOS, I.C., REIS, W.J.P., MOREIRA, M.A., REZENDE, S.T., ROCHA, V.S., SEDIYAMA, C.S. Determinação de aldeídos totais para avaliar o potencial de germinação de sementes de soja. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 40, n. 231, p. 438-444, 1993.
- SANZ, L.C., PEREZ, A.G., RIOS, J.J., OLIAS, J.M. Physico-chemical properties of chickpea lipoxygenases. **Phytochem.** Oxford, v. 31, n. 10, p. 3381-3384, 1992.
- SARNI, F., GRAND, C., BOUDET, A.M. Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar steams (*Populus x euramericana*). **Eur. J. Biochem.** Berlin, v. 139, n. 2, p. 259-265, 1984.
- SASAKI, M., KASAI, M., YAMAMOTO, Y., MATSUMOTO, H. Involvement of plasma membrane potential in tolerance mechanism of plant roots to aluminium toxicity. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 119-124, 1995.
- \_\_\_\_\_, YAMAMOTO, Y., MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 96, n. 1, p. 193-198, 1996.
- SATO, T., KIUCHI, F., SANKAWA, U. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. **Phytochem.** Oxford, v. 21, n. 4, p. 845-850, 1982.
- SATO, Y., WATANABE, T., KOMAMINE, A., HIBINO, T., SHIBATA, D., SUGIYAMA, M., FUKUDA, H. Changes in the activity and mRNA of cinnamyl alcohol dehydrogenase during tracheary element differentiation in *Zinia*. **Plant Physiol.** Rockville, v. 113, n. 2, p. 425-430, 1997.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.** Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.
- SIEGEL, B.Z. Plant peroxidase - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, p. 303-312, 1993.

- SNOWDEN, K.C., GARDNER, R.C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiol.** Rockville, v. 103, n. 3, p. 855-861, 1993.
- \_\_\_\_\_, RICHARDS, K.D., GARDNER, R.C. Aluminum-induced genes: induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips. **Plant Physiol.** Rockville, v. 107, n. 2, p. 341-348, 1995.
- SUHAYADA, C.G., HAUG, A. Organic acids reduce aluminum toxicity in maize root membranes. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 68, n. 2, p. 189-195, 1986.
- TAKAHAMA, U., ONIKI, T., SHIMOKAWA, H. A possible mechanism for the oxidation of sinapyl alcohol by peroxidase-dependent reactions in the apoplast: enhancement of the oxidation by hydroxycinnamic acids and components of the apoplast. **Plant Cell Physiol.** Kyoto, v. 37, n. 4, p. 499-504, 1996.
- TICE, K.R., PARKER, D.R., DeMASON, D. Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. **Plant Physiol.** Rockville, v. 100, n. 1, p. 309-318, 1992.
- TODD, J.F., PALIYATH, G., THOMPSON, J.E. Characteristics of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. **Plant Physiol.** Rockville, v. 94, n. 3, p. 1225-1232, 1990.
- VAUGHN, K.C., DUKE, S.O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 60, n. 1, p. : 106-112, 1984.
- VIANELLO, A., MACRI, F. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. **J. Bioenerg. Biomembr.** New York, v. 23, n. 3, p. 409-423, 1991.
- WHETTEN, R., SEDEROFF, R. Lignin Biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v.7, n. 7, p. 1001-1013, 1995.
- WHITAKER, B.D., LEE, E.H., ROWLAND, R.A. EDU and ozone protection: foliar glycerolipids and steryl lipids in snapbean exposed to O<sub>3</sub>. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 80, n. 2, p. 286-293, 1990.
- WIDELL, S., LUNDBORG, T., LARSSON, C. Plasma membranes from oats prepared by partition in an aqueous polymer two-phase system. **Plant Physiol.** Rockville, v. 70, n. 5, p. 1429-1435, 1982.

- WILSON JR., D.O., McDONALD JR., M.B. A convenient volatile aldehyde assay for measuring soybean seed vigor. **Seed Sci. Technol.** Zürich, v. 14, n. 2, p. 259-268, 1986.
- WINGSTRAND, G., LINDBERG, S. Effects of phloridzin, metavanadate and oligomycin on membrane bound ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ ) ATPase activity in sugar beet roots. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 56, n. 3, p. 333-338, 1982.
- WYRAMBIK, D., GRISEBACH, H. Purification and properties of isoenzymes of cinnamyl-alcohol dehydrogenase from soybean-cell-suspension cultures. **Eur. J. Biochem.** Berlin, v. 59, n. 1, p. 9-15, 1975.
- ZEL, J., SCHARA, M., SVETEK, J., NEMEC, M., GOGALA, N. Influence of aluminum on the membranes of mycorrhizal fungi. **Water, Air and Soil Pollut.** Dordrecht, v. 71, n. 3-4, p. 101-109, 1993a.
- \_\_\_\_\_, SVETEK, J., CRNE, H., SCHARA, M. Effects of aluminum on the membrane fluidity of mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 89, n. 1, p. 172-176, 1993b.
- ZHANG, G., SLASKI, J.J., ARCHAMBAULT, D.J., TAYLOR, G.J. Aluminum-induced alterations in lipid composition of microsomal membranes from an aluminum-resistant and an aluminum-sensitive cultivar of *Triticum aestivum*. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 96, n. 4, p. 683-691, 1996.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ Alteration of plasma membrane lipids in aluminium-resistant and aluminium-sensitive wheat genotypes in response to aluminium. **Physiol. Plant.** Copenhagen, v. 99, n. 2, p. 302-308, 1997.
- ZHANG, J., KIRKHAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **J. Plant Physiol.** Jena, v. 149, n. 5, p. 489-493, 1996.
- ZHAO, X-J., SUCOFF, E., STADELMANN, E.J.  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiol.** Rockville, v. 83, n. 1, p. 159-162, 1987.
- ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiol.** Rockville, v. 40, n. 5, p. 779-784, 1965.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE

Quadro 1A - Quadrados médios de análise de variância da atividade da  $H^+$ -ATPase de uma fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes e de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Atividade da $H^+$ -ATPase |                 |
|--------------------|----|----------------------------|-----------------|
|                    |    | Ápices de Raízes           | Raízes Inteiras |
| Cultivar           | 1  | 0,0071**                   | 0,6943**        |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,6170**                   | 0,7420**        |
| Cultivar x Al      | 1  | 0,0709**                   | 0,0092*         |
| Blocos             | 5  |                            |                 |
| Resíduo            | 15 | 0,00061                    | 0,0018          |
| CV (%)             |    | 1,6                        | 3,7             |

\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 2A - Quadrados médios de análise de variância da composição de ácidos graxos dos lipídios totais na fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Composição de Ácidos Graxos |           |           |           |           |           |
|--------------------|----|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                    |    | 16:0                        | 16:1      | 18:0      | 18:1      | 18:2      | 18:3      |
| Cultivar           | 1  | 92,1302**                   | 0,1408ns  | 4,5880*   | 69,8901** | 7,8085**  | 16,8981** |
| Alumínio (Al)      | 1  | 30,3054**                   | 89,8721** | 3,3496*   | 86,0816** | 15,9621** | 0,0075ns  |
| Cultivar x Al      | 1  | 84,0052**                   | 0,4181ns  | 58,7861** | 4,6625*   | 33,2667** | 50,6763** |
| Blocos             | 2  |                             |           |           |           |           |           |
| Resíduo            | 6  | 0,4200                      | 0,5832    | 0,3559    | 0,6457    | 0,5416    | 0,3206    |
| CV (%)             |    | 1,6                         | 8,0       | 8,4       | 10,3      | 2,7       | 7,9       |

\* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 3A - Quadrados médios de análise de variância do ILD<sub>C18</sub> e das relações AGI/AGS, 18:2/16:0 e 18:2/18:3 de ácidos graxos dos lipídios totais na fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios   |           |           |            |
|--------------------|----|--------------------|-----------|-----------|------------|
|                    |    | ILD <sub>C18</sub> | AGI/AGS   | 18:2/16:0 | 18:2/18:3  |
| Cultivar           | 1  | 0,00021ns          | 0,12403** | 0,06901** | 14,06167** |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,02900**          | 0,09720** | 0,05200** | 7,03801**  |
| Cultivar x Al      | 1  | 0,00608**          | 0,00403ns | 0,10641** | 33,7010**  |
| Blocos             | 2  |                    |           |           |            |
| Resíduo            | 6  | 0,00010            | 0,00295   | 0,00091   | 0,27550    |
| CV (%)             |    | 1,2                | 2,8       | 4,4       | 11,5       |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 4A - Quadrados médios de análise de variância da composição de ácidos graxos dos lipídios totais na fração purificada da membrana plasmática de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Composição de Ácidos Graxos |          |          |          |          |           |
|--------------------|----|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|                    |    | 16:0                        | 16:1     | 18:0     | 18:1     | 18:2     | 18:3      |
| Cultivar           | 1  | 87,5880**                   | 0,4219ns | 7,7281** | 0,0154ns | 0,0007ns | 160,967** |
| Alumínio (Al)      | 1  | 17,9097**                   | 5,6444** | 6,5860** | 8,0524** | 2,4521ns | 109,022** |
| Cultivar x Al      | 1  | 34,2732**                   | 3,2552** | 0,3234ns | 1,6060ns | 6,7951** | 120,143** |
| Blocos             | 2  |                             |          |          |          |          |           |
| Resíduo            | 6  | 0,5558                      | 0,1597   | 0,2317   | 0,2829   | 0,4083   | 0,7024    |
| CV (%)             |    | 1,9                         | 11,4     | 12,8     | 9,7      | 1,8      | 6,1       |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade



Quadro 5A - Quadrados médios de análise de variância do ILD<sub>C18</sub> e das relações AGI/AGS, 18:2/16:0 e 18:2/18:3 de ácidos graxos dos lipídios totais na fração purificada da membrana plasmática de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios   |           |           |           |
|--------------------|----|--------------------|-----------|-----------|-----------|
|                    |    | ILD <sub>C18</sub> | AGI/AGS   | 18:2/16:0 | 18:2/18:3 |
| Cultivar           | 1  | 0,14300**          | 3,40268** | 0,06021** | 4,18900** |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,10268**          | 1,7864**  | 0,02521** | 1,31340** |
| Cultivar x Al      | 1  | 0,06900**          | 1,32668** | 0,00907*  | 3,19300** |
| Blocos             | 2  |                    |           |           |           |
| Resíduo            | 6  | 0,00029            | 0,00871   | 0,00080   | 0,08459   |
| CV (%)             |    | 1,5                | 3,2       | 3,0       | 10,0      |

\* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 6A - Quadrados médios de análise de variância da composição de ácidos graxos dos lipídios totais de tecidos do sistema radicular de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Composição de Ácidos Graxos |      |           |           |           |           |
|--------------------|----|-----------------------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                    |    | 16:0                        | 16:1 | 18:0      | 18:1      | 18:2      | 18:3      |
| Cultivar           | 1  | 2,07368ns                   | ---  | 8,5021**  | 86,2371** | 0,0205ns  | 4,3898ns  |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,00008ns                   | ---  | 11,2200** | 64,1894** | 6,3169ns  | 55,0788** |
| Cultivar x Al      | 1  | 57,3927**                   | ---  | 9,1937**  | 0,5611ns  | 52,2291** | 6,8562ns  |
| Blocos             | 4  |                             |      |           |           |           |           |
| Resíduo            | 12 | 2,46290                     | ---  | 0,1911    | 0,2213    | 2,8169    | 2,3713    |
| CV (%)             |    | 6,0                         | ---  | 13,6      | 4,8       | 3,6       | 9,2       |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 7A - Quadrados médios de análise de variância do ILD<sub>C18</sub> e das relações AGI/AGS, 18:2/16:0 e 18:2/18:3 de ácidos graxos dos lipídios totais de tecidos do sistema radicular de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Quadrados Médios   |           |           |           |
|--------------------|----|--------------------|-----------|-----------|-----------|
|                    |    | ILD <sub>C18</sub> | AGI/AGS   | 18:2/16:0 | 18:2/18:3 |
| Cultivar           | 1  | 0,00084ns          | 0,55444ns | 0,00882ns | 0,08064ns |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,00925 *          | 0,58141ns | 0,01152ns | 2,21113** |
| Cultivar x Al      | 1  | 0,04512**          | 6,92665** | 0,64082** | 0,00060ns |
| Blocos             | 4  |                    |           |           |           |
| Resíduo            | 12 | 0,00179            | 0,15259   | 0,01268   | 0,14624   |
| CV (%)             |    | 2,8                | 7,4       | 6,3       | 13,5      |

\* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 8A - Quadrados médios de análise de variância da peroxidação dos lipídios na fração purificada da membrana plasmática de ápices de raízes e de raízes inteiras de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Peroxidação dos Lipídios |                 |
|--------------------|----|--------------------------|-----------------|
|                    |    | Ápices de Raízes         | Raízes Inteiras |
| Cultivar           | 1  | 13,9245ns                | 78,4476**       |
| Alumínio (Al)      | 1  | 35,8370ns                | 3,3718ns        |
| Cultivar x Al      | 1  | 200,9907**               | 6,9479ns        |
| Blocos             | 4  |                          |                 |
| Resíduo            | 12 | 15,3499                  | 4,0637          |
| CV (%)             |    | 16,0                     | 14,6            |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 9A - Quadrados médios de análise de variância da peroxidação dos lipídios e da produção de aldeídos voláteis em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Peroxidação dos Lipídios |             | Aldeídos Voláteis |             |
|--------------------|----|--------------------------|-------------|-------------------|-------------|
|                    |    | Sist. Radicular          | Parte Aérea | Sist. Radicular   | Parte Aérea |
| Cultivar           | 1  | 1271,933**               | 465,748ns   | 30,27ns           | 3481,24**   |
| Alumínio (Al)      | 1  | 5292,859**               | 698,467ns   | 21387,12**        | 199,86*     |
| Cultivar x Al      | 1  | 620,130**                | 0,653ns     | 2106,54**         | 4,05ns      |
| Blocos             | 4  |                          |             |                   |             |
| Resíduo            | 12 | 32,931                   | 197,556     | 10,58             | 27,82       |
| CV (%)             |    | 16,7                     | 32,7        | 5,5               | 7,6         |

\* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 10A - Quadrados médios de análise de variância das atividades das peroxidases (POXs) e das peroxidases do ascorbato (APXs) em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Atividade da POXs |             | Atividade da APXs |             |
|--------------------|----|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
|                    |    | Sist. Radicular   | Parte Aérea | Sist. Radicular   | Parte Aérea |
| Cultivar           | 1  | 0,7554**          | 0,00003ns   | 55,4071**         | 418,6273**  |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,2675**          | 0,01675**   | 90,5982**         | 259,3904**  |
| Cultivar x Al      | 1  | 0,0237**          | 0,00079ns   | 685,1650**        | 1,0115ns    |
| Blocos             | 5  |                   |             |                   |             |
| Resíduo            | 15 | 0,0013            | 0,00031     | 1,1481            | 5,3491      |
| CV (%)             |    | 3,9               | 3,0         | 4,8               | 15,8        |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 11A - Quadrados médios de análise de variância das atividades das oxidases dos polifenóis (POLs) e das catalases (CATs) em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Atividade da POLs |             | Atividade da CATs |             |
|--------------------|----|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
|                    |    | Sist. Radicular   | Parte Aérea | Sist. Radicular   | Parte Aérea |
| Cultivar           | 1  | 0,0094**          | 0,00013ns   | 18,08ns           | 51697,83**  |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,0396**          | 0,00013ns   | 79254,22**        | 992492,3**  |
| Cultivar x Al      | 1  | 0,0236**          | 0,00013ns   | 787,75**          | 12477,19**  |
| Blocos             | 5  |                   |             |                   |             |
| Resíduo            | 15 | 0,0009            | 0,0015      | 64,19             | 135,87      |
| CV (%)             |    | 5,9               | 8,2         | 3,3               | 3,0         |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 12A - Quadrados médios de análise de variância das dismutases do superóxido (SODs) e das lipoxigenases (LOXs) em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Atividade da SODs |             | Atividade da LOXs |             |
|--------------------|----|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
|                    |    | Sist. Radicular   | Parte Aérea | Sist. Radicular   | Parte Aérea |
| Cultivar           | 1  | 940,56*           | 233,59ns    | 9,645**           | 0,9051**    |
| Alumínio (Al)      | 1  | 14475,43**        | 1765,66ns   | 50,654**          | 0,8283**    |
| Cultivar x Al      | 1  | 13362,28**        | 4436,35ns   | 7,551**           | 0,0823**    |
| Blocos             | 4  |                   |             |                   |             |
| Resíduo            | 12 | 152,84            | 1064,89     | 0,041             | 0,0006      |
| CV (%)             |    | 4,1               | 6,5         | 8,8               | 4,3         |

\* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 13A - Quadrados médios de análise de variância das atividades das amônia liases da fenilalanina (PALs) e das desidrogenases dos álcoois cinamílicos (CADs) em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Atividade da PALs |                         | Atividade da CADs |             |
|--------------------|----|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------|
|                    |    | Sist. Radicular   | Parte Aérea             | Sist. Radicular   | Parte Aérea |
| Cultivar           | 1  | 55,377**          | 2,543**                 | 1104,06**         | 263,89ns    |
| Alumínio (Al)      | 1  | 19,958**          | 0,14e <sup>-13</sup> ns | 340,76ns          | 54,53ns     |
| Cultivar x Al      | 1  | 4,360**           | 0,041ns                 | 2905,50**         | 263,91ns    |
| Blocos             | 5  |                   |                         |                   |             |
| Resíduo            | 15 | 0,217             | 0,058                   | 106,68            | 289,19      |
| CV (%)             |    | 7,8               | 16,2                    | 12,0              | 28,7        |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade

Quadro 14A - Quadrados médios de análise de variância dos teores de lignina e de compostos fenólicos solúveis em tecidos do sistema radicular e da parte aérea de dois cultivares de sorgo

| Fontes de Variação | GL | Lignina         |                        | Compostos Fenólicos Solúveis |                 |             |
|--------------------|----|-----------------|------------------------|------------------------------|-----------------|-------------|
|                    |    | Sist. Radicular | Parte Aérea            | GL                           | Sist. Radicular | Parte Aérea |
| Cultivar           | 1  | 0,00905**       | 0,00271**              | 1                            | 81902,08**      | 25807,24**  |
| Alumínio (Al)      | 1  | 0,06594**       | 0,33e <sup>-5</sup> ns | 1                            | 665357,4**      | 50078,64**  |
| Cultivar x Al      | 1  | 0,00009ns       | 0,50e <sup>-5</sup> ns | 1                            | 825,43ns        | 2480,79**   |
| Blocos             | 5  |                 |                        | 4                            |                 |             |
| Resíduo            | 15 | 0,00013         | 0,00026                | 12                           | 406,510         | 61,495      |
| CV (%)             |    | 3,4             | 9,2                    |                              | 6,8             | 3,3         |

\*\* Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade