

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DO MERCÚRIO NO ESTRESSE
OXIDATIVO, NA ATIVIDADE DA DELTA-ALA-D
E NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS
DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Denise Cargnelutti

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**EFEITO DO MERCÚRIO NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA
ATIVIDADE DA DELTA-ALA-D E NO CRESCIMENTO DE
PLÂNTULAS DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.)**

Por

Denise Cargnelutti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a
obtenção do grau de

Mestre em Bioquímica Toxicológica

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Orientadora

Vera Maria Morsch

Co-orientadora

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado

**EFEITO DO MERCÚRIO NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA
ATIVIDADE DA DELTA-ALA-D E NO CRESCIMENTO DE
PLÂNTULAS DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.)**

elaborada por

Denise Cargnelutti

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maria Rosa Chitolina Schetinger

(Presidente/Orientador)

Ricardo Simão Diniz Dalmolin, Dr. (UFSM)

Maria Ester Pereira, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 01 de fevereiro de 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Celita e Selito

Pela vida, amor, incentivo e compreensão.

Aos meus irmãos: Jocelito, Ademir, Joceli e Jocelaine

Pela amizade, amor, carinho e incentivo.

Ao meu namorado: Marciel

Pelo amor, amizade e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Prof.^a Maria Rosa Schetinger, pelas orientações, incentivos e auxílios em todos os momentos; pela dedicação e pelo modo dinâmico com os quais conduziste a tua orientada, muito obrigada.

À co-orientadora, Prof.^a Vera Maria Morsch, pelo conhecimento, atenção, amizade, confiança e dedicação, muito obrigada.

Ao professor Fernando Nicoloso, pelo auxílio, conhecimento e atenção, obrigada.

Às amigas, Luciane Belmonte, Rosélia e Luciane Tabaldi, pelo auxílio, atenção e incentivo, obrigada.

Aos demais amigos, pela convivência, pelas contribuições, especialmente os amigos Carlos Eduardo e Mushtaq Ahmed, e as amigas Vanessa, Jamile, Joseila, Renata, Liana e Margarete.

À UFSM, ao Curso, aos professores, à CAPES, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	05
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Objetivos.....	21
1.1.1. Objetivo Geral.....	21
1.1.2. Objetivos Específicos.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Mercúrio	22
2.1.2. Fontes	23
2.1.3. Ciclo do mercúrio.....	25
2.1.4. Mercúrio nos solos.....	26
2.1.5. Toxicidade.....	27
2.2. Espécies Reativas de Oxigênio.....	29

2.3. Sistema de Defesa Antioxidante.....	31
2.5. Delta-aminolevulinato desidratase.....	36
2.6. <i>Cucumis sativus</i> (Pepino).....	38
3. RESULTADOS.....	39
3.1. ARTIGO: Mercury-stressed induces oxidative stress in cucumber seedlings (<i>Cucumis sativus</i> L). Denise Cargnelutti, Luciane Almeri Tabaldi, Rosélia Maria Spanevello, Gladis de Oliveira Jucoski, Vanessa Battisti, Marciel Redin, Carlos Eduardo Blanco linares, Valderi Luiz Dressler, Érico Marlon de Moraes Flores, Fernando Teixeira Nicoloso, Vera Maria Morsch, Maria Rosa Chitolina Schetinger (Chemosphere, 2006).....	39
3.2. MANUSCRITO: Activities mercury toxicity alters the antioxidant system of growing cucumber seedlings. Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Gonçalves, J.F., Rauber, R., Bagatini, M.D., Pereira, L.B., Maldaner, J., Ahmed, M., Fernandes, P., Nicoloso, F.T., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C. (Submetido/ Chemosphere).....	48
4. DISCUSSÃO.....	77
5. CONCLUSÕES.....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

FIGURA 01 - Caminho das espécies reativas de oxigênio e sua remoção nas plantas.....	32
FIGURA 02 - Estrutura do ácido ascórbico atuando na estabilização dos radicais livres.....	34
FIGURA 03 - Formação do porfobilinogênio (PBG).....	36

ARTIGO:

FIGURA 01 - Effect of increasing concentration of HgCl ₂ in the growth medium on the length of roots (A), length of shoots (B), root fresh weight (C), shoot fresh weight (D), root dry weight (E) and shoot dry weight (F) of 10- and 15-day old cucumber seedlings. Data represent the mean ± S.D. of three different experiments. *Different from control to p<0.05.....	41
FIGURA 02 - Effect of increasing concentration of HgCl ₂ on chlorophyll content (A), lipid peroxides (B) and protein carbonyl (C) of 10- and 15-day old cucumber seedlings. Data represent the mean ± S.D. of three different experiments. The	

control specific activity (without mercury) that represents 100% was 11.42 ± 1.71 and $12.72 \pm 0.79 \text{ mg L}^{-1}$, 0.18 ± 0.02 and $0.08 \pm 0.01 \text{ nmol MDA (mg protein)}^{-1}$, and 14.2 ± 4.31 and $20.7 \pm 5.50 \text{ nmol carbonyl (mg protein)}^{-1}$, for 10 and 15 days, respectively. *Different from control to $p < 0.05$42

FIGURA 03 - Effect of increasing concentration of HgCl_2 on content soluble protein (A), catalase activity (B) and ascorbate peroxidase activity (C) of 10- and 15-day old cucumber seedlings. Data represent the mean \pm S.D. of three different experiments. *Different from control to $p < 0.05$42

MANUSCRITO:

FIGURA 01 - Effect of increasing concentration of HgCl_2 on the electrolyte leakage percentage (A) and hydrogen peroxide content (B) at 10- and 15-days-old cucumber seedlings. Data represent the mean \pm S.D. of three different experiments. *Different from control to $p < 0.05$73

FIGURA 02 - Effect of increasing concentration of HgCl_2 on the superoxide dismutase activity (A), and $-\text{SH}$ groups (B), ascorbic acid (C) carotenoid content (D) of 10- and 15-days- old cucumber seedlings. Data represent the mean \pm S.D. of three different experiments. *Different from control to $p < 0.05$74

FIGURA 03 - Effect of increasing concentration of HgCl_2 on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of 10- and 15-days- old cucumber seedlings. Data represent the mean \pm S.D. of three different experiments. *Different from control to $p < 0.05$75

FIGURA 04 - Effect of increasing concentration of HgCl₂ on catalase activity as a function of hydrogen peroxide content at 10- days (A) and 15- days (B) old-cucumber seedlings [(10 days) $y = 1.36 - 0.095X$ ($R^2 = -0.82$) and (15 days) $y = 0.47 - 0.198X$ ($R^2 = -0.75$)]; aminolevulinic acid dehydratase activity as a function of chlorophyll content at 10- days (C) and 15- days (D) old- cucumber seedlings [(10 days) $y = -0.246 + 0.84X$ ($R^2 = 0.79$) and (15 days) $y = 0.64 + 0.26X$ ($R^2 = 0.88$)]. Data represent the mean \pm S.D. of three different experiments. *Different from control to $p < 0.05$76

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

TABELA 01 - Formas orgânicas e inorgânicas de mercúrio.....23

ARTIGO:

TABELA 01 - Mercury content of cucumber seedling growth under increasing concentrations of HgCl_2 for 10 or 15 days.....40

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – ácido 5-aminolevulínico
ANOVA – análise de variância
ASA – ácido ascórbico
CuSO₄ – sulfato de cobre
DMSO – dimetilsulfóxido
DNPH – dinitrofenilidrazina
DTNB – ácido 5-5' –ditio-bis-(nitobenzóico)
DTT – ditioneitol
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
ELP – porcentagem de vazamento de eletrólitos
GSH – glutatona reduzida
HCl – ácido clorídrico
Hg – mercúrio
Hg²⁺ - íon mercúrio
HgCl₂ – cloreto de mercúrio
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HNO₃ – ácido nítrico
H₂SO₄ – ácido sulfúrico
KI – iodeto de potássio
K₂HPO₄ – fosfato de potássio
MDA – malondialdeído
PBG - porfobilinogênio
PVP- polivinilpirrolidona
ROS – espécies reativas de oxigênio
Rpm – rotações por minuto

TBA – ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

-SH – grupos tiólicos não-protéicos

δ -ALA-D – delta-aminolevulinato desidratase

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO MERCÚRIO NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA ATIVIDADE DA DELTA-ALA-D E NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.)

Autora: Denise Cargnelutti

Orientadora: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-Orientadora: Vera Maria Morsch

Data e local de defesa: Santa Maria, 01 de fevereiro de 2007.

Neste estudo, foram investigados os efeitos do mercúrio (HgCl_2) em plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) através da análise de parâmetros bioquímicos e fisiológicos. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: as atividades de enzimas antioxidantes [catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD)] e os níveis de antioxidantes não-enzimáticos (ácido ascórbico (ASA), carotenóides e tióis não-protéicos (-SH)). O dano aos lipídios de membrana [a peroxidação lipídica e a porcentagem de vazamento de eletrólitos (ELP)], o conteúdo de clorofila e a oxidação de proteínas foram determinadas. Foram também determinados os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a atividade da delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALAD). O crescimento das plântulas de pepino foi avaliado baseado na matéria seca e fresca e no comprimento de raízes e parte aérea. As plântulas de pepino foram expostas a 0; 0,5; 50; 250 e 500 μM de HgCl_2 durante 10 e 15 dias. Os resultados demonstraram que o mercúrio foi absorvido pelas plântulas, e seu conteúdo foi maior nas raízes que na parte aérea. Além disso, uma redução no comprimento das raízes e da parte aérea, ambos aos 10 e 15 dias, que foi dependente do tempo e da concentração, foi observada em todas as concentrações testadas. Na concentração de 50 μM de HgCl_2 o peso fresco das raízes das plântulas aos 15 dias aumentou, no entanto, ele reduziu nas outras concentrações. Para as plântulas com 10 dias, foi observada uma redução na massa fresca de raízes e parte aérea. Nenhuma redução na massa fresca da parte aérea foi observada na concentração de 50 μM de HgCl_2 , aos 15 dias. Em relação ao peso seco, houve um aumento a 500 μM , ambos a 10 e 15 dias, entretanto, na concentração de 250 μM de HgCl_2 houve um aumento aos 15 dias. Além disso, foi observada uma redução significativa no peso seco da parte aérea em todas as concentrações testadas. Os resultados mostraram níveis elevados de peróxidos lipídicos, assim como aumento na oxidação de proteínas, e redução no conteúdo de clorofila quando as plântulas foram expostas a 250 e 500 μM de HgCl_2 . Em relação às enzimas antioxidantes, houve um aumento na atividade da CAT aos 10 dias de exposição ao HgCl_2 , a 50 μM . No entanto, na concentração mais alta (500 μM) de HgCl_2 , houve uma

marcada inibição. Também, tanto aos 10 quanto aos 15 dias, foi observada uma inibição na atividade da enzima APX nas concentrações de HgCl₂ mais elevadas (250 e 500 µM). A SOD, outra enzima do sistema de defesa antioxidante, mostrou atividade aumentada na concentração abaixo de 50 µM HgCl₂, e atividade reduzida nas concentrações mais altas. Em relação à ELP, foram observadas alterações somente na concentração mais elevada (500 µM de HgCl₂) aos 15 dias de exposição ao metal. Além disso, as plântulas com 10 dias de exposição ao metal, tiveram seus níveis de H₂O₂ reduzidos na concentração de 50 µM de HgCl₂, mas o H₂O₂ aumentou na concentração mais alta. Em relação aos antioxidantes não-enzimáticos, foram observados níveis de SH aumentados em todas as concentrações aos 10 dias de exposição. Os níveis de ASA também aumentaram em todas as concentrações testadas aos 10 e 15 dias de exposição ao metal. Ainda, os níveis dos carotenóides aumentaram em baixas concentrações e foram reduzidos em altas concentrações, ambos aos 10 e 15 dias de exposição ao mercúrio. A atividade da ALA-D aumentou a 50 µM de HgCl₂ aos 15 dias, e diminuiu em concentrações mais altas. Portanto, os resultados obtidos das análises bioquímicas e fisiológicas sugerem que a exposição ao mercúrio induz estresse oxidativo em plântulas de pepino, resultando em injúria nos tecidos o que leva a redução no crescimento e perda de matéria seca das plântulas.

Palavras-chave: *Cucumis sativus*; antioxidantes; espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Master Dissertation

Biological Sciences: Toxicological Biochemistry Post-Graduation

Universidade Federal de Santa Maria

MERCURY EFFECT IN THE OXIDATIVE STRESS, IN THE DELTA-ALA-D ACTIVITY AND ON GROWHT OF CUCUMBER SEEDLINGS (*Cucumis sativus* L.)

Author: Denise Cargnelutti

Oriented by: Maria Rosa Chitolina Schetinger

Co-oriented by: Vera Maria Morsch

Place and date: Santa Maria, February 01, 2007.

In this study, the effects of mercury (HgCl_2) in cucumber seedlings (*Cucumis sativus* L.) were investigated through the analysis of the physiological and biochemical parameters. The biochemical parameters analyzed were: the antioxidant enzyme activities (catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD)), and the non-enzymatic antioxidant levels (ascorbic acid (ASA), carotenoids, and non-protein thiol content (SH)). The damage at the membrane lipids (lipid peroxidation, electrolytic leakage percentage (ELP)), the chlorophyll content, and protein oxidation were determined. The hydrogen peroxide levels (H_2O_2) and the δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALAD) activity were also determined. The growth of cucumber seedlings was evaluated based on the dry and fresh matter, and on the root and shoot length. Cucumber seedlings were exposed to 0 to 500 μM of HgCl_2 during 10 and 15 days. The results showed that Hg was absorbed by the growing seedlings, and its content was greater in the roots than in the shoot. Moreover, a reduction in the root and shoot length, at both 10 and 15 days, which was dependent on time and concentration, was observed at all concentrations tested. At the concentration of 50 μM HgCl_2 the root fresh weight of 15-day-old seedlings increased, however, it reduced at the other concentrations. For 10-day-old seedlings, a reduction in root and shoot fresh biomass was observed. No reduction in shoot fresh biomass was observed at the concentration of 50 μM HgCl_2 , at 15 days. Regarding dry weight, there was an increase at 500 μM , both at 10 and 15 days, however, at the concentration of 250 μM HgCl_2 , there was an increase at 15 days. Moreover, a significant reduction in the dry weight of shoot in all tested concentrations was observed. The results showed higher levels of lipid peroxides, as well as a protein oxidation increase, and chlorophyll content reduction when seedlings were exposed to 250 and 500 μM HgCl_2 . In relation to the antioxidant enzymes, there was an increase in the CAT activity at 10 days of exposure to HgCl_2 , at 50 μM . However, in the higher concentration (500 μM) of mercury, there was a marked inhibition. Besides, at both 10 and 15 days, an inhibition of APX enzyme in the mercury higher concentrations (250 and 500 μM) was observed. The SOD, another enzyme of the antioxidant

system, showed an increased activity in the concentration below 50 μM HgCl_2 , and a reduced activity in the higher concentrations. Regarding ELP, alterations only in the higher concentrations (500 μM HgCl_2) and at 15 days of exposure to metal were observed. Furthermore, seedlings with 10 days of exposure to HgCl_2 had their reduced H_2O_2 levels at 50 μM HgCl_2 , but the H_2O_2 increased at the higher concentration. In relation to non-enzymatic antioxidants, increasing SH levels at all the concentrations at 10-days of exposure were observed. ASA levels also increased at all tested concentrations at 10 and 15 days of exposure at metal. Yet, the carotenoids levels increased at low concentrations and decreased at high concentrations, both at 10 and 15 days of exposure to Hg. δ -ALA-D activity increased at 50 μM HgCl_2 at 15 days, and was inhibited at higher concentrations. Therefore, the results obtained from the biochemical and physiological analyses suggest that mercury induces oxidative stress in cucumber seedlings, resulting in injuries in the tissues, which leads to a reduction in the growth, and loss of dry matter of the seedlings.

Keywords: *Cucumis sativus*; antioxidants; reactive oxygen species.

1. INTRODUÇÃO

Os metais são componentes essenciais em diferentes processos nos organismos vivos. Alguns metais, tais como o cálcio, o cobalto, o cromo, o cobre, o ferro, o potássio, o magnésio, o manganês, o sódio, o níquel e o zinco, são nutrientes essenciais para as plantas. No entanto, outros elementos metálicos, como por exemplo, o cádmio, o chumbo e o mercúrio, não têm um papel biológico conhecido (BRUINS et al., 2000). A similaridade química aos elementos essenciais faz com que esses outros elementos sejam potencialmente tóxicos para as células vegetais (CLEMENS, 2006).

Dentre os metais pesados o mercúrio é um dos poluentes mais perigosos do ambiente causando efeitos tóxicos tanto em animais aquáticos (PASSOS et al., 2006) e terrestres (PEROTONI et al., 2004) quanto em plantas aquáticas e terrestres (ISRAR et al., 2006; RELLÁN-ÁLVAREZ et al., 2006; CHO & PARCK, 2000).

Apesar da sua toxicidade, o mercúrio é extensivamente utilizado no processo de mineração do ouro (VEIGA & HINTON, 2002). Isso leva à contaminação do ambiente devido a sua liberação na atmosfera. Uma fração significativa este elemento também contamina a água e os solos depois da descarga dos resíduos do processo de amalgamação (VEIGA & HINTON, 2002). Além disso, este metal pesado é muito utilizado na indústria e, por consequência, é inadequadamente disposto na natureza. O mercúrio no ambiente pode originar-se de várias fontes, como áreas de mineração, áreas poluídas e com intensa atividade industrial (CHO & PARK, 2000; CATHUM et al., 2005). Ainda, a utilização do mercúrio em indústria de papel, tintas,

baterias, pesticidas e fertilizantes contribuem significativamente para a sua presença no ambiente (SINHA et al., 1996).

O mercúrio que é libertado na superfície dos solos geralmente é retido na fase sólida por adsorção a sulfatos, partículas de argila, e pela matéria orgânica (EVANS, 1989). Estas formas de mercúrio são insolúveis e, relativamente, imóveis. Porém, as reações de troca podem acontecer na solução do solo, levando ao aumento da solubilidade e da mobilidade do mercúrio no solo. Os íons cloreto (Cl^-) e hidróxido (OH^-) ocorrem naturalmente nos solos. O Hg^{2+} quando complexado com o Cl^- , forma o HgCl_2 que é bastante solúvel em água. Os complexos de $\text{Hg}(\text{OH})\text{Cl}$ e de $\text{Hg}(\text{OH})_2$ são as espécies de mercúrio predominantes em ambientes bem-oxigenados (SCHUSTER, 1991). O mercúrio tem uma forte afinidade por grupos tiólicos, e na sua especiação sob condições de anóxia prepondera os complexos sulfatos e bissulfatos (MOREL et al., 1998).

Em solos, o mercúrio leva a redução no crescimento, no metabolismo (ISRAR et al., 2006), na fotossíntese (GODBOLD & HUTTERMANN, 1986), na transpiração e na absorção de água das plantas, e induz o aumento da peroxidação lipídica (CHO & PARCK, 2000). Além disso, o mercúrio causa a inibição do crescimento da raiz e da parte aérea (SUSZCZYNSKY & SHANN, 1995), alterando assim o desenvolvimento normal da planta.

DIETZ et al. (1999) relataram que o excesso de metais pesados, entre eles o mercúrio, induz à formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em estresse oxidativo em plantas. As ROS tais como, o anion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), são produzidas normalmente nas células, mas a sua produção

é aumentada quando a célula está em condições de estresse (FOYER et al., 1994; HEGEDÜS et al., 2001). As ROS causam dano às membranas, pigmentos fotossintéticos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (FOYER et al., 1994). As células das plantas possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos que normalmente mantêm um balanço de ROS dentro das células. Dentre os antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11). Entre os antioxidantes não-enzimáticos estão o ácido ascórbico, a glutatona reduzida (GSH), os carotenóides e outros grupos tiólicos não protéicos que removem diferentes tipos de ROS e protegem a célula contra a injúria e a disfunção dos tecidos (HALLIWELL, 1987; FOYER et al., 1994).

A síntese de clorofila pode ser afetada por a uma diminuição na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) a qual é sensível a metais pesados, entre eles, o mercúrio, devido a sua natureza sulfidrílica (MORSCH et al., 2002). Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (ALA) originando o porfobilinogênio (GIBSON et al., 1955). A síntese do porfobilinogênio promove a formação de porfirinas, hemes, e clorofila, que são essenciais para o metabolismo da clorofila e da fotossíntese (JAFFE et al., 2000). A síntese diminuída de clorofila provoca a diminuição no crescimento devido a menor taxa fotossintética da planta.

O *Cucumis sativus* (pepino), uma importante espécie cultivada e consumida no Brasil, foi selecionado como uma planta teste, devido a sua sensibilidade para uma grande variedade de contaminantes (GORSUCH et al.,

1991, PEREIRA et al., 2006). Além disso, há informação disponível insuficiente sobre a toxicologia de mercúrio nesta espécie e sobre os mecanismos pelo qual esse elemento produz estresse oxidativo em plantas.

Tendo em vista que é de grande importância o estudo da toxicologia do mercúrio no metabolismo das plantas devido ao aumento crescente da contaminação dos solos devido ao uso de pesticidas agrícolas em solos, despejo do lixo industrial em locais inadequados, utilização do lodo de esgotos e as atividades de mineração, os objetivos deste trabalho foram:

1.1. Objetivos

1.1.2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de mercúrio em parâmetros oxidativos e de crescimento de plântulas de pepino durante os primeiros 10 e 15 dias de germinação.

1.1.3. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase) e os níveis de antioxidantes não-enzimáticos (carotenóides, ácido ascórbico e tióis não-protéicos) em plântulas de pepino após exposição ao mercúrio;

- Determinar os níveis de peroxidação lipídica, o conteúdo de peróxido de hidrogênio, as proteínas oxidadas e a porcentagem de vazamento de eletrólitos após exposição ao mercúrio;

- Avaliar a atividade da enzima delta-ALA-D e o conteúdo de clorofila em plântulas de pepino após exposição ao mercúrio;

- Avaliar as alterações no crescimento, e determinar o conteúdo de mercúrio absorvido pelas plântulas de *C. sativus* após exposição ao mercúrio.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Mercúrio

O mercúrio é um dos metais pesados mais tóxico encontrado no ambiente que inclui a litosfera, a hidrosfera, a atmosfera e a biosfera (ZHANG & WONG, 2006). Durante os últimos 2500 anos, foi extensivamente usado devido as suas propriedades químicas e físicas únicas. É o único metal encontrado na forma líquida em condições de temperatura ambiente e pressão (1 ATM), formando vapores incolores e inodoros (NASCIMENTO & CHASIN, 2001). No meio ambiente, ele ocorre associado a outros elementos químicos, formando compostos inorgânicos ou sais. Dentre estes elementos, o mais comum é o enxofre, com o qual forma o sulfeto de mercúrio insolúvel (ocorrendo na forma de cinábrio, HgS) que não é considerado tóxico. Este metal pode também ser encontrado na forma de compostos organometálicos. Muitos destes compostos têm importância no uso diário tanto na indústria como na agricultura (BOENING, 2000).

O mercúrio pode ser encontrado nas seguintes formas: mercúrio metálico (Hg^0), mercúrio (I) e mercúrio (II) nos quais os átomos perdem um ou dois elétrons, respectivamente, formando o íon mercuroso (Hg_2^{++}) e o íon mercúrico (Hg^{++}) (NASCIMENTO & CHASIN, 2001). Os sais de mercúrio mais importantes são o HgCl_2 (cloreto de mercúrio), um sublimado corrosivo muito tóxico, o Hg_2Cl_2 (calomelano), ocasionalmente ainda usado na medicina, o $\text{Hg}(\text{CNO})_2$ (fulminato de mercúrio), detonador usado em explosivos, e o HgS, de cor vermelha, usado como pigmento em tintas (HSDB, 2000). O HgCl_2 , o

Hg(OH)₂ e o HgS são as formas de mercúrio prevalentes existindo no ambiente, e CH₃HgCl e CH₃HgOH são as formas principais de compostos orgânicos de mercúrio, junto com outros organomercúrios (dimetilmercúrio e fenilmercúrio) existindo em frações pequenas (USEPA, 1997b).

As formas orgânicas do mercúrio (organomercuriais) são aquelas onde o elemento se liga a pelo menos um átomo de carbono. Esses compostos são os mais considerados por sua toxicidade, mas os que causam maior preocupação são os que contem radicais alquila de cadeia curta, onde o mercúrio se liga aos grupos metila, etila e propila (WHO, 1989). A tabela 1 apresenta as formas de mercúrio (orgânicas e inorgânicas) geralmente encontradas no ambiente, e algumas formas de mercúrio geradas através da atividade antropogênica.

Tabela 1- Formas orgânicas e inorgânicas do mercúrio. Adaptado de QUEIROZ (1995).

Inorgânicas	
- Metálico	Hg ⁰
- Sais mercuriosos	Hg ₂ Cl ₂
- Sais mercúricos	HgCl ₂
Orgânicas	
- Compostos de alquilmercúrio	CH ₃ HgCl
- Compostos de arilmercúrio	C ₆ H ₅ HgCl
- Compostos de alcoxiarilmercúrio	CH ₂ OCH ₂ HgCl

2.1.2. Fontes

O mercúrio na sua forma natural surge da degradação da crosta terrestre a partir de vulcões, solos, florestas, lagos e oceanos abertos (MASON et al., 1994). No entanto, as fontes artificiais de mercúrio são mais diversificadas do que as naturais (CARVALHO, 2001), sendo que a quantidade de mercúrio na atmosfera aumentou desde o início da revolução industrial (USEPA, 2003). Por exemplo, o mercúrio é usado em reatores nucleares na indústria de alvejantes, papel e tecidos, células de níquel-cádmio em baterias, na odontologia e na medicina (GARCIA-GUINEA & HARFFY, 1997), e faz parte de formulações de fungicidas destinados à agricultura (MEAGHER & RUGH, 1996). Outras fontes artificiais, como as indústrias de mineração, a queima de combustíveis fósseis, a incineração de materiais, as descargas urbanas e as industriais (DEPLEDGE et al., 1994; SEIGNEUR et al., 2004) contribuem de forma significativa para a poluição do ambiente com mercúrio. Embora o uso industrial do mercúrio tenha sofrido reduções (ANVISA, 2001), devido a um controle mais efetivo e a busca por alternativas viáveis, concentrações altas ainda estão presentes em produtos industriais (BOENING, 2000).

Patra & Sharma (2000) relataram que dois terços dos compostos de mercúrio no ambiente são originados de fontes naturais, e um terço é resultado de atividades humanas, principalmente com o uso de fertilizantes nos solos. A grande poluição com mercúrio no ambiente resultou, principalmente, no aumento da contaminação das espécies vegetais e animais ao longo das cadeias alimentares. De acordo com Chow et al. (1995), a concentração média do mercúrio na crosta terrestre é 0,5 ppm ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.1.3. Ciclo biogeoquímico do mercúrio

Como outros elementos, o mercúrio não é degradado e não pode ser destruído através de combustão ou eliminado do ambiente. Sendo assim, o ciclo de permanência do mercúrio no ambiente é tal que os seus compostos são transferidos entre o solo, a atmosfera e as águas superficiais. Através de uma série de transformações químicas complexas é possível obter os três estados de oxidação do mercúrio, como um ciclo no ambiente (ANDERSON, 1979).

Um agravante para o problema da poluição é que o mercúrio inorgânico pode ser convertido a metilmercúrio e a dimetilmercúrio pela ação de microorganismos (bactérias metanogênicas), processo conhecido como biotransformação (FARRELL et al., 1990; DAUGHNEY et al., 2002). Este processo representa um sério risco ambiental, visto que, o mercúrio se acumula na cadeia alimentar aquática, sendo que a sua concentração aumenta à medida que este metal avança nos níveis tróficos (BOENING, 2000; BAHIA, 1997). O mercúrio pode também ser liberado no ar na forma de Hg^0 (forma elementar) que é formado através de processos bioquímicos na presença de solos e de plantas (DU & FANG, 1982; GODBOLD & HÜTTERMANN, 1988; BOUDOU et al., 1991). A maioria dos compostos inorgânicos de Hg adicionados aos solos são decompostos para produzir Hg^0 , quando na presença de matéria orgânica e outros fatores que conduzem para a sua redução. Em geral, as reações do tipo $Hg_2^{2+} = Hg^{2+} + Hg^0$ são comuns na maioria dos solos (FREAR & DILLS, 1967).

2.1.4. Mercúrio nos solos

Patra et al. (2004) relataram que as concentrações de mercúrio encontradas normalmente em solos são baixas e não são tóxicas. O limite máximo estabelecido para o mercúrio em solos fica na faixa de $0,6 \text{ mg Kg}^{-1}$, que representa um solo não contaminado. Para solos contaminados, os níveis de mercúrio podem alcançar valores acima de 120 mg Kg^{-1} (EPA, 1997). Cavallini et al. (1999) mostraram que em solos contaminados com mercúrio em concentrações que variavam de 15 a $200 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, as plantas absorveram concentrações de mercúrio altas nas folhas ($2,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) e nas raízes ($4,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco). Além disso, um conteúdo de mercúrio alto foi encontrado em plantas que cresceram em áreas altamente industrializadas (WOJCIECHOWSKA-MAZUREK et al., 1995) e em solos com aplicação do lodo de esgoto. Chang et al. (2002), relataram que o limite máximo de mercúrio permitido para esta prática é no máximo 7 mg Kg^{-1} .

A especiação do mercúrio na solução do solo e entre os componentes da fase sólida controla fortemente a solubilidade, a mobilidade e a disponibilidade deste metal em ambos os ecossistemas terrestres e aquáticos (REVIS et al., 1989b). Na solução do solo, o mercúrio pode estar complexado em formas inorgânica e orgânica (Tabela 1), que têm diferentes disponibilidade/fitodisponibilidade (YIN et al., 1996; RAVICHANDRAN, 2004). Em solos altamente poluídos com sais de mercúrio solúvel, há um risco ambiental alto (FENGXIANG et al., 2006). O mercúrio é fortemente adsorvido aos constituintes do solo e como Hg^{2+} ou espécies hidrolisadas são praticamente imóveis no solo, mas quando combinadas com grupos orgânicos passam a ser móveis. A adsorção do mercúrio depende de inúmeros fatores

tais como a forma de mercúrio aplicada, a natureza dos constituintes do solo (orgânico e inorgânico), o pH do solo, os tipos de cátions no complexo de troca, o potencial redox e a classe textural (MORENO et al., 2004). MUNZUROGLU & GECKIL (2002) relataram que em solos, o efeito de um metal é determinado sinergisticamente ou antagonisticamente por outros cátions metálicos e seus ânions associados. Assim, alguns elementos naturais ou artificiais dos solos como o húmus e as ciclodextrinas, podem formar complexos estáveis com o mercúrio (MIERLE & INGRAM, 1991; WANG et al., 1995; CATHUM et al., 2005) reduzindo tanto a quantidade de mercúrio absorvida pelas plantas quanto a sua disponibilidade na solução do solo, além de reduzir a toxicidade dos solos contaminados. Além disso, há uma forte afinidade do Hg^{2+} e seus compostos inorgânicos às substâncias que contêm enxofre (grupos -SH e cisteína). O mercúrio se liga a esses compostos formando um complexo que limita grandemente a mobilidade do mercúrio em solos (USEPA, 1997a). O mercúrio presente em solos pode ser facilmente transferido para o topo da cadeia alimentar, das plantas para os herbívoros e desses para os carnívoros (GNAMUS et al., 2000) colocando em risco o ambiente.

2.1.5. Toxicidade

Embora alguns metais tais como o Mn, o Cu, o Zn, o Mo e o Ni sejam micronutrientes essenciais ou benéficos para microorganismos, plantas e animais, em altas concentrações, têm fortes efeitos tóxicos e são uma ameaça ambiental (NEDELKOSKA & DORAN 2000). Esta ameaça pode ser experimentada primeiro pelas plantas, os produtores primários, principalmente

pela contaminação dos solos, que tem aumentado paralelamente à industrialização (KLAASSEN et al., 1986). Stefanov et al. (1995) relataram que as espécies de plantas diferem na sua sensibilidade aos metais. As plantas que crescem em habitats com altas concentrações de metais provavelmente têm a habilidade para inativar estes elementos. Este processo acontece devido a formação de complexos entre o íon metálico e os grupos –SH produzidos pelas plantas. Também, as plantas que crescem em habitats metalíferos, mudam a composição química e a organização física das suas membranas celulares, impedindo que os íons sejam absorvidos pelas células.

Em relação ao mercúrio, estudos envolvendo o efeito da especiação sob diferentes condições, como por exemplo, o pH, as espécies ligantes e a concentração das espécies de mercúrio, foi observado que a sua toxicidade é influenciada grandemente pela natureza dos íons de mercúrio, por exemplo, a toxicidade do $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ é similar a do $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (FARRELL et al., 1990).

Salt et al. (1995) observaram que mesmo a exposição às concentrações relativamente baixas de mercúrio pode resultar em toxicidade para as plantas. Além de outros fatores, a toxicidade do mercúrio em baixas concentrações é devido a alta solubilidade das diversas formas do mercúrio em água. Dentre as diferentes formas do mercúrio, o Hg^{2+} é altamente solúvel em água e é reativo (HEATON et al., 2005). Assim como outros metais pesados, tais como o cádmio, o cobre, o chumbo e o zinco, os íons mercuriais acumulam-se em plantas (PATRA & SHARMA, 2000; DU et al., 2005) e interagem fortemente com os grupamentos sulfidrílicos de enzimas e proteínas no apoplasto das células de raiz (ASSCHE & CLIJSTERS, 1990). Assim, o alvo primário de toxicidade do mercúrio em plantas seriam os resíduos sulfidrílicos das

proteínas (WOOLHOUSE, 1983). Por exemplo, o Hg^{2+} pode ligar-se à proteínas dos canais de água das células da raiz causando uma obstrução física do fluxo de água (MAGGIO & JOLY, 1995) afetando, por consequência, a transpiração em plantas (MAUREL, 1997; ZHANG & TYERMAN, 1999). O outro sintoma tóxico de acumulação de mercúrio em plantas é o crescimento anormal (GODBOLD, 1991; COCKING et al., 1995; DU et al., 2005), níveis reduzidos de clorofila e proteínas (CHO & PARK, 2000; LENTI et al., 2002). Também, a acumulação do mercúrio em raízes bloqueia a captação e o transporte dos nutrientes (BOENING, 2000) e induz à produção de etileno em excesso (GOREN & SIEGEL, 1976). Porém, mecanismos bioquímicos e moleculares da fitotoxicidade do mercúrio ainda são desconhecidos (CHO & PARK, 2000).

Portanto, o maior risco para a saúde humana e para as cadeias alimentares é quando as plantas desenvolvem mecanismos de tolerância a metais e quando essas plantas são incorporadas as cadeias alimentares (MUNZUROGLU & GECKIL, 2002). Em peixes, o nível máximo aceitável de mercúrio é de 1 mg kg^{-1} (GUPTA & GUPTA, 1998; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996; WILLIAMS, 1975) e, em drogas e plantas, o limite aceitável de mercúrio em é de $0,5 \text{ } \mu\text{g de Hg g}^{-1}$ (CHOW et al., 1995). Contudo, essas concentrações podem estar bem acima dos valores aceitáveis.

Sendo assim, para resolver o problema da contaminação dos solos com mercúrio, estudos tem focalizado na utilização de plantas biorremediadoras. Esta tecnologia faz o uso de plantas tolerantes ao mercúrio, que absorvem o metal e descontaminam os solos (CHANG & YEN).

2.2. Espécies reativas de oxigênio

No ambiente contaminado com metais pesados, as raízes das plantas são a zona de contato primário com os poluentes do solo. A fim de sobreviver, as plantas desenvolvem mecanismos pelos quais quantidades excessivas de metais pesados são absorvidos e transformados em formas fisiologicamente toleráveis (COBBETT, 2000; HALL, 2002).

O excesso de metais pesados tóxicos, entre eles o mercúrio, induz à formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (CHO & PARCK, 2000), resultando em estresse oxidativo (DIETZ et al., 1999). Além disso, o mercúrio pode participar nas reações de Haber-Weiss e de Fenton e assim propiciar a formação de radicais hidroxil (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990), que iniciam o processo de peroxidação lipídica e de oxidação protéica.

Sob condições fisiológicas normais, as células produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da redução do oxigênio molecular. A produção dos derivados tóxicos de oxigênio é aumentada como resultado de vários tipos de estresse biótico ou abiótico (FOYER et al., 1994). A geração de ROS, tais como o anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o oxigênio singlete (1O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) tem demonstrado ser um dos agentes causadores da injúria nos tecidos depois da exposição das plantas a uma variedade de condições de estresse. São considerados fatores de estresses em plantas: a seca, o frio, a alta intensidade luminosa, a radiação UV, os metais pesados e alguns compostos químicos orgânicos (HEGEDÜS et al., 2001).

As ROS possuem potencial para interagir de forma não específica com muitos componentes celulares, desencadeando reações peroxidativas e causando um dano significativo às membranas e a outras macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos fotossintéticos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios (LIN & KAO, 2000; SHALATA & TAL, 1998; OLMOS et al., 1994; FOYER et al., 1994). Além disso, a alta afinidade de ligação do mercúrio aos compostos contendo enxofre, nitrogênio e grupos funcionais contendo oxigênio, nas moléculas biológicas, pode induzir a inativação e ao dano dessas moléculas (NELSON, 1999; CLEMENS, 2001).

2.3. Sistema de defesa antioxidante

Para o combate da toxicidade do metal e proteção das membranas celulares e organelas dos efeitos danosos das ROS, as células das plantas possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos que normalmente mantêm um balanço de ROS dentro das células. Dentre os antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11), bem como antioxidantes de baixo peso molecular, não enzimáticos, como o ácido ascórbico, a glutatona reduzida (GSH) e outros grupos tiólicos não protéicos que removem tipos diferentes de ROS (FOYER et al., 1994) e protegem a célula contra a injúria e a disfunção dos tecidos (MIQUEL, 1989). Além disso, em plantas, os carotenóides também possuem efeito antioxidante importante no sistema fotossintético (HALLIWELL, 1987).

A SOD é um componente essencial do sistema de defesa antioxidante em plantas, dismutando dois radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) até água e oxigênio molecular (Figura 1a-d) (VERMA & DUBEY, 2003; MITTLER, 2002). Contudo, o H_2O_2 é também tóxico para a célula e deve ser detoxificado pela catalase e/ou peroxidases. A catalase, presente nos peroxissomos, remove o H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos. É uma das enzimas chave envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em altas concentrações, pois apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 (MITTLER, 2002). A CAT, pertence a família das oxirredutases presente universalmente nos organismos que decompõe H_2O_2 em água e oxigênio molecular (MORITA et al., 1994). A APX, outra importante enzima do sistema de defesa antioxidante, é chave no ciclo da glutathiona-ascorbato que reduz o H_2O_2 (quando em baixas concentrações na célula) até água usando ascorbato como doador de elétrons, resultando na formação de dehidroascorbato (Figura 1b). Este é reciclado a ascorbato usando a GSH como doadora de elétrons, e a glutathiona oxidada (GSSG) é convertida pela enzima glutathiona redutase, dependente de NADPH (ASADA & TAKAHASHI, 1987). Deste modo, a SOD age como primeira linha de defesa convertendo o $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . A APX, a GPX e a CAT então detoxificam o H_2O_2 . Em contraste com a CAT (Figura 1d), a APX e a GPX requerem um ciclo regenerador de ascorbato e/ou glutathiona (Figura 1a-c). Esse ciclo usa elétrons diretamente do aparato fotossintético (Figura 1a) ou NAD(P)H (Figura 1b,c) como poder redutor.

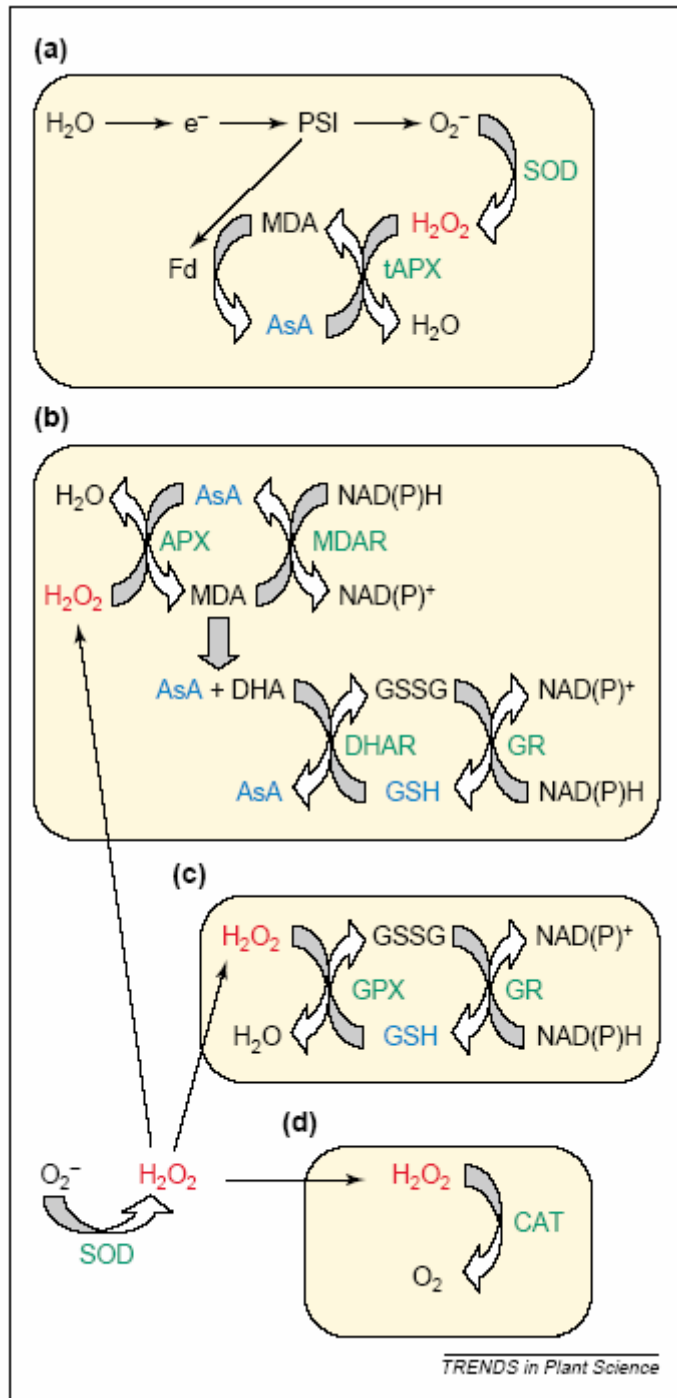


Figura 1 - Caminho das espécies reativas de oxigênio e sua remoção nas plantas (a) Ciclo água-água. (b). Ciclo ascorbato glutaciona (c). Ciclo glutaciona peroxidase (d). ROS estão indicadas em vermelho, antioxidantes em azul e enzimas removedoras de ROS em verde (Adaptado de Mittler, 2002).

Essas enzimas reduzem de forma eficiente as ROS sob circunstâncias normais, mas se a redução completa não ocorrer, como em condições de produção aumentada, o resultado pode ser um estado de estresse oxidativo levando a oxidação de biomoléculas, tais como, lipídios, proteínas e DNA (RICHTER & SCHWEITZER, 1997). Além disso, a oxidação e a inativação dos componentes celulares podem desencadear o processo de morte celular (BUCKNER et al., 2000).

Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, as defesas antioxidantes não-enzimáticas são de fundamental importância para as células. O ácido L-ascórbico é encontrado em concentrações baixas e desempenha um importante papel na tolerância das plantas ao estresse como um componente do sistema antioxidante (NOCTOR & FOYER, 1998). Está envolvido na regulação da fotossíntese, na expansão celular, na alongação das raízes e no transporte dos elétrons transmembrana (NOCTOR & FOYER, 1998; SMIRNOFF, 2000). Também é importante na remoção dos radicais livres de oxigênio (SINHA et al., 2005). Os radicais livres de oxigênio estão envolvidos na oxidação do ácido ascórbico para formar ácido dehidroascórbico, o qual é regenerado posteriormente até ácido ascórbico (Figura 2) (FRIDOVICH & HANDLER, 1961). Os antioxidantes, tais como, o ácido ascórbico e a glutathione, que são encontrados em concentrações altas (5 – 20 mM ácido ascórbico e 1–5 mM glutathione) nos cloroplastos e outros compartimentos celulares, são importantes para a defesa das plantas contra o estresse oxidativo (ZENK, 1996).

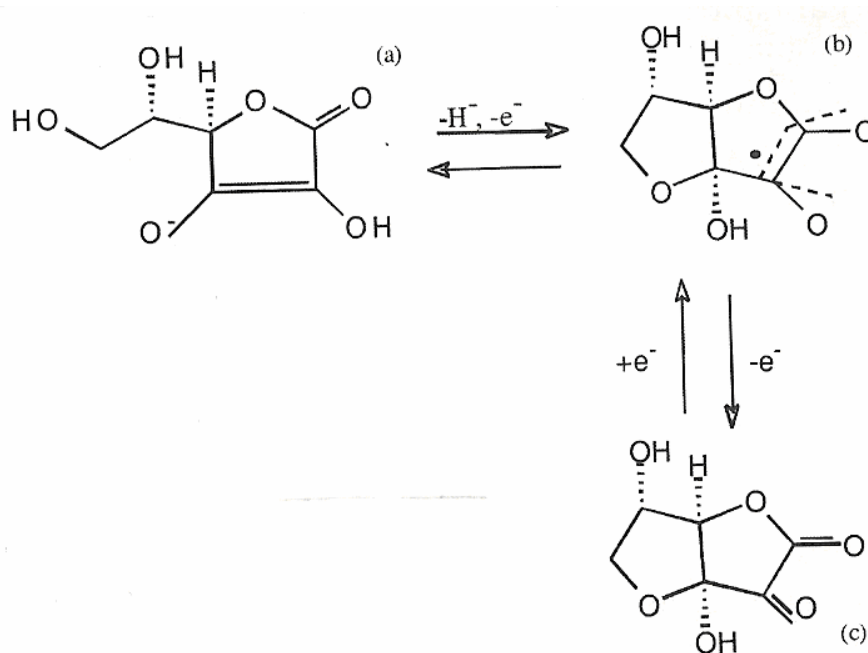


Figura 2 – Estrutura do ácido ascórbico atuando na estabilização dos radicais livres. a) ascorbato, b) radical ascorbil, c) ácido ascórbico. Adaptado de Machlin (1991).

Os grupos tióis não protéicos, entre estes a glutatona, são conhecidos por possuírem um papel central nos mecanismos de resposta aos metais traços em plantas terrestres (ZENK, 1996; RAUSER, 1999). A GSH, um tripeptídeo contendo enxofre, é um antioxidante muito importante envolvido na defesa celular contra agentes tóxicos (SCOT et al., 1993). A GSH reduz diretamente a maioria das espécies reativas de oxigênio, enquanto que a enzima glutatona redutase usa NADPH para reduzir GSSG a GSH (GRANT et al., 1997). Vários radicais livres e oxidantes são capazes de oxidar GSH a GSSG (NOCTOR & FOYER, 1998). Estudos mostram que níveis elevados de GSH celular estão associados à tolerância à metais pesados em plantas (CHEN & GOLDSBROUGH, 1994) e a exposição aos metais pesados leva a

uma síntese acelerada de GSH em raízes e em culturas de células (SCHNEIDER & BERMANN, 1995). Além disso, a GSH pode reagir quimicamente com o oxigênio singlete, com o radical superóxido e hidroxila, funcionando como removedor de radicais livres. É também o precursor das fitoquelatinas que agem como peptídeos que complexam metais pesados em plantas (ROSEN, 2002). Os níveis de GSH em tecidos de plantas são modificados na presença de metais (KOVIDEVA et al., 1997). Embora seja conhecido o papel da GSH como um importante antioxidante celular, vários aspectos sobre a função de seus componentes precisam ser detalhados (BARTOSZ, 1996).

Também, os carotenóides possuem um papel importante na proteção do pigmento clorofila sob condições de estresse e são conhecidos por manter as reações fotodinâmicas, protegendo a clorofila da peroxidação lipídica e impedindo o colapso da membrana dos cloroplastos (KNOX & DODGE, 1985).

Dessa forma, os metais pesados tornam-se tóxicos para as plantas sempre que seus níveis de acumulação exceder a capacidade de detoxificação. Assim, o fator que determina o estresse oxidativo é a velocidade com que as plantas ativam suas reservas antioxidantes (RANIERI et al., 1993), aspecto este que confere tolerância ao estresse (SINHA et al., 1996). SINHA et al. (2005) sugerem que a capacidade de tolerância das plantas aos metais depende do balanço entre os fatores que favorecem o estresse oxidativo e os fatores que o reduzem.

2.4. Delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D)

A enzima citoplasmática delta-aminolevulinato desidratase (E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase, catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido delta-aminolevulinico (ácido delta-aminolevulínico, δ -ALA), formando o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (Figura 3). O produto final do caminho dos tetrapirrólicos, tais como o heme, as clorofilas e as corinas, está envolvido em muitos aspectos do metabolismo, como o transporte de elétrons até a fotossíntese (JAFFE, 2000).

A δ -ALA-D possui grande importância toxicológica, pois alguns metais, tais como o cádmio (NORIEGA et al., 2007), mercúrio e chumbo (MORSCH, 2002; PRASAD & PRASAD, 1987), são capazes de inibir esta enzima. A δ -ALA-D é sensível à agentes oxidantes, tais como metais pesados e ROS, devido a sua natureza sulfidrílica (ROCHA et al., 2001). Além disso, a sua inibição leva a síntese reduzida de clorofila, o que traz prejuízos para o crescimento das plantas. PEREIRA et al. (2006) observaram que o alumínio inibe a atividade da δ -ALA-D de plântulas de *Cucumis sativus*, sendo que esta inibição esteve relacionada com alterações no crescimento das plântulas. Além disso, CHO & PARK (2000) observaram que até mesmo baixas concentrações de mercúrio no substrato reduzem o crescimento de raízes e da parte aérea de plantas de tomate, sendo que essa redução foi concomitante com a indução de radicais livres e a redução nos níveis de clorofilas.

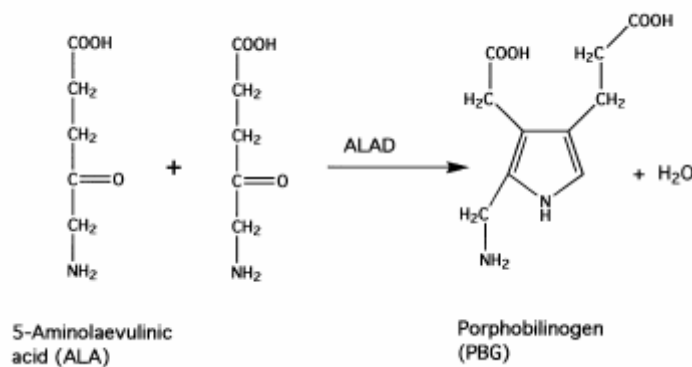


Figura 3 - Formação do porfobilinogênio (PBG) (Adaptado de Senior et al., 1996).

2.5. *Cucumis sativus* L. (Pepino)

O pepino é uma importante espécie cultivada e consumida no Brasil. Trabalhos recentes mostraram que o pepino é sensível para uma grande variedade de contaminantes (GORSUCH et al., 1991, PEREIRA et al., 2006) e, em função disso, foi selecionado como uma planta teste para o estudo do metabolismo dos metais em plantas. Além disso, há informação disponível insuficiente sobre a toxicologia de mercúrio nesta espécie e sobre os mecanismos pelo qual esse elemento produz estresse oxidativo em plantas.

Ferri (1985) relatou que o estudo do metabolismo dos metais é melhor observado em plântulas devido a alguns fatores; no período de plântula, é observado um metabolismo acelerado, com divisão e expansão celular, e formação dos tecidos, dessa forma vários processos relacionados ao metabolismo do mercúrio seriam detectáveis. Além disso, em uma plântula em emergência as substâncias nutrientes são tomadas do material de estoque das sementes e apenas água e oxigênio que a plântula absorve do meio. Ainda, o período que vai da germinação até a época em que a plântulas se torna

estabelecida como um organismo independente constitui a fase mais crucial da história de vida da planta. Durante esse período a planta é mais susceptível a injúria por diversos fatores como a presença do mercúrio.