



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ERICA PATRÍCIA LIMA PEREIRA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE *Amburana cearensis*
(Fr. Allemão) A. C. Smith SUBMETIDAS A ESTRESSE
HÍDRICO**

SALVADOR
2010

ERICA PATRÍCIA LIMA PEREIRA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE *Amburana cearensis*
(Fr. Allemão) A. C. Smith SUBMETIDAS A ESTRESSE
HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luzimar Gonzaga Fernandez

Co-orientador: Prof. Dr^o. Renato Delmondez de Castro

Salvador
2010

Elaborada por Marcos A.N. Ferreira. Bel em Biblioteconomia e Documentação e Bel em Arquivologia – Instituto de Ciência da Informação – Universidade Federal da Bahia

P4360m

Pereira, Erica Patrícia Lima

Mercadores bioquímicos da atividade antioxidante em sementes de amburana cearensis (Fr. Allemão) A. C. Smith submetidas a estresse hídrico. / Erica Patrícia Lima Pereira. - Salvador, 2010.

100f., Il., color.

Orientação: Profª Drª Luzimar Gonzaga Fernandez

Co-orientador: Prof. Drº. Renato Delmondez de Castro

Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Saúde Coletiva - Universidade Federal da Bahia, 2010.

1. Plantas medicinais. 2. *Amburana cearensis*. 3 *Amburana cearensis* – atividade antioxidante. I – Título.

CDU: 615.322

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos seis dias do mês de dezembro de dois mil e dez, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a Defesa de Dissertação da Pós-graduanda **Érica Patrícia Lima Pereira**, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores **Marcondes Viana da Silva**, **Renata Silva Mann** e **Luzimar Gonzaga Fernandez**. O título da Dissertação apresentado foi **MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE AMBURANA CEARENSIS (Fr. Alemão) A. Smith SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO**. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Marcondes Viana da Silva

APROVADO

Profª. Dra. Renata Silva Mann

APROVADO

Profª. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez

APROVADO

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 06 de dezembro de 2010.

Prof. Dr.

Profª. Dra.

Profª. Dra.

ERICA PATRÍCIA LIMA PEREIRA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE EM SEMENTES DE *Amburana cearensis*
(Fr. Allemão) A. C. Smith SUBMETIDAS A ESTRESSE
HÍDRICO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 06 de dezembro de 2010.

Banca Examinadora

Luzimar Gonzaga Fernandez. Orientadora _____
Doutora em Bioquímica / Biologia Molecular Estrutural – UPC, Espanha
Profª Associada III da Universidade Federal da Bahia/Instituto de Ciências da Saúde

Renata Silva-Mann _____
Doutora em Fitotecnia/Universidade Federal de Lavras
Profª Adjunta II da Universidade Federal de Sergipe
Coordenadora da RIDESA-Sergipe

Marcondes Viana da Silva _____
Doutor em Ciências e Tecnologia de Alimentos/Universidade Federal de Viçosa
Profº Titular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB
Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais - DEBI
Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos - NECAL

*Dedico este projeto de mais uma etapa de
vida, ao meu maior exemplo!*

Vô Geraldo Lopes (In Memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pelo dom de existir. Acreditar que com Ele tudo posso que é questão de ter experimentado, e eu experimentei!

A minha Mãe Maria por me ouvir e interceder a mim, junto a seu Filho nos momentos de maior angústia.

A minha querida e estimada orientadora Dr^a Luzimar Gonzaga Fernandez, que como ela mesma diz: “és uma mãe”. Obrigada por confiar em mim, e me ensinar todos os dias a viver, com suas palavras de carinho, “obrigada Luzi”.

A professora Dr^a Marta Bruno Loureiro, por me acolher e me ajudar nesta etapa, a qual eu agradeço e aponto como uma das pessoas mais fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr^o Renato Delmondez de Castro, por ter aberto as portas para iniciação de mais esta etapa, que eu pretendi e consegui concluir.

Aos meus pais é claro, Everaldo e Maria Pureza, pessoas essenciais e fundamentais na construção do ser que eu sou. O meu amor por vocês é infinitamente grande! Mainha obrigada pelas noites em claro só para me fazer companhia.

As minhas irmãs, mesmo longe o nosso amor é o mesmo, essa é mais uma das nossas vitórias!

As três estrelinhas que Papai do Céu colocou em minha vida, Maria Fernanda, Maria Laís e Ryan Gabriel, apesar de serem tão pequeninos, já despertam tanto amor.

A minha vizinha, que sempre me espera chegar e me vê sair.

Ao meu noivo Tiago Oliveira, pelo amor, apoio e dedicação!

A Cristiane Brito, amiga para todas as horas, que eu aprendi a conhecer e conviver, você foi uma companheira, conselheira, e que na última semana do meu desespero me confortou com suas palavras. Não vou esquecer jamais de quem me ensinou a pôr sementes de Amburana para germinar.

A Leilane Leal por compartilhar momentos agradabilíssimos, minha amiga e irmã companheira de verdade.

A você Clarissa Abreu, seu sorriso encanta a nossa copa! Obrigada pelas pesagens das minhas sementes, por anotar minhas absorbâncias, enfim pelo seu companheirismo.

Ao Paulo Teixeira, pela amizade e disponibilidade, sempre!

A Manuela Oliveira, pelas doces palavras e por me transmitir as suas experiências de final de mestrado.

A Ivana Virgens, paciente, companheira, amiga enfim, sofreu junto comigo nos meus momentos mais angustiantes. Obrigada por tudo.

Ao Paulo Ribeiro, quando começou a me ajudar nas análises bioquímicas, eu te agradei e você me disse: “deixa pro final” então, aqui estão os meus sinceros agradecimentos.

A Cinara D`Sousa, pelos abraços nos momentos importantes, e pelas sábias palavras.

Pensou que eu esqueceria de você meu amigo? Alexandre..., sempre te achei um excelente companheiro, porém “atrapalhado e indisciplinado”, mais saiba que trabalhar com você neste último mês de experimento, me fez ver a pessoa que você é muito obrigada meu amigo pela força, conte comigo sempre, você foi essencial no momento certo. Valeu Garotinho...

A minha colega que se tornou amiga Thaiana Sacramento.

Aos colegas do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde, em especial aos Professores Dr^a Silvia Lima Costa, Dr^o Ramon dos Santos El-Bachá, aos grandes colegas Vitor e Bruno.

Aos colegas do LABIOMAR, em especial a Professora Bernadete e a Sheila.

Ao Núcleo de Pós Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, em especial ao professor Roberto Paulo Correia de Araújo, mentor e coordenador deste programa.

Aos colegas da turma 2009.1 dos Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos membros que compuseram a minha banca de Defesa, Prof^o Marcondes Viana da Silva que além da defesa contribuiu de forma essencial na qualificação deste trabalho e a Prof^a Renata Silva Mann, pela disponibilidade em partilhar as suas experiências de trabalho.

A minha família, tios e tias, primos e primas, obrigada sempre.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para mais este passo dado e finalizado.

Obrigada!

RESUMO

A Organização Mundial de Saúde tem incentivado o uso da medicina tradicional nos sistemas de saúde de forma integrada às técnicas da medicina ocidental moderna. Contudo, destaca-se a necessidade de se garantir a segurança, eficácia e a qualidade dos referidos medicamentos. Assim, é de fundamental importância investir na pesquisa científica em plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população, considerando-se a análise de princípios bioativos e a necessidade de um modelo de exploração auto-sustentável, através de estudos intra e interdisciplinar (Química-Agronomia-Bioquímica-Farmacologia). Nativa do semiárido nordestino, a *Amburana cearensis* ocorre do norte do Maranhão até o sul da Bahia, sendo conhecida como Amburana-de-cheiro, Cerejeira, Cumaru, dentre outras. Possui importância econômica na carpintaria e perfumaria, e inestimável valor quanto ao uso tradicional no tratamento de enfermidades. As cascas do caule e as sementes são usadas sob a forma de chá, para o tratamento de doenças do trato respiratório por apresentarem atividade antiinflamatória e espasmolítica. Neste contexto, a presente proposta teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante em sementes de *Amburana cearensis*, submetidas a estresse por restrição hídrica, por meio de marcadores bioquímicos tais como fenóis totais, capacidade seqüestradora de hidrogênio pelo DPPH e atividade de enzimas antioxidantes (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, catalase e superóxido dismutase). Houve diminuição da atividade antioxidante das sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água que variou entre 6,21 a 2,81%, entretanto, aumentou em sementes submetidas ao estresse hídrico de 6,21% para 7,49% (-1,2 MPa) e para 10,00% (-1,4 MPa). Houve uma direta relação entre a atividade antioxidante analisada e o conteúdo de fenóis totais em extratos metanólicos de sementes de *A. cearensis*, nas primeiras 48 de embebição em água e uma relação inversa a partir deste período, o que não ocorreu quando submetida a estresse hídrico com PEG -1,4 MPa. Variações significativas das atividades enzimáticas foram verificadas a partir de 48 horas de embebição. A atividade da superóxido dismutase (SOD) diminuiu acentuadamente nas sementes submetidas ao tratamento com o PEG, em ambos os potenciais, quando comparadas com a germinação em água. A atividade das enzimas glutaciona redutase (GR) e glutaciona peroxidase (GPOX) apresentaram comportamentos semelhantes, com aumento da atividade enzimática a partir de 48 horas de embebição, sendo o valor máximo de atividade em 72 horas, quando submetidas ao estresse hídrico. A resposta enzimática obtida neste estudo permitiu concluir que as enzimas antioxidantes podem ser consideradas como os melhores biomarcadores bioquímico/moleculares para avaliação da atividade antioxidante das sementes de *A. cearensis* em resposta ao estresse hídrico durante a germinação e conseqüentemente, ao estresse oxidativo, em sementes de *A. cearensis*.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Fitoquímicos bioativos. Plantas medicinais. Enzimas antioxidantes. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

The World Health Organization has encouraged the use of traditional medicine in health systems in an integrated techniques of western medicine. However, there is the need to ensure the safety, efficacy and quality of these medicines. Thus, it is extremely important to invest in scientific research on medicinal plants traditionally used by the population, considering the analysis of bioactive principles and the need for a model farm self-sustaining through intra-and interdisciplinary studies (Chemistry-Biochemistry-Agronomy Pharmacology). Native semi-arid Northeast, the *Amburana cearensis* occurs in northern Maranhão to the south of Bahia, being known as Amburana-of-smell, Cherry, Cumarú, among others. It has economic importance in the carpentry and perfume, as invaluable and the traditional use in treating diseases. The stem bark and seeds are used in the form of tea, for the treatment of respiratory diseases because they have anti-inflammatory and spasmolytic activity. In this context, this proposal was to evaluate the antioxidant activity in seeds of *Amburana cearensis* subjected to stress by fluid restriction, by means of biochemical markers such as total phenols, hydrogen capacity by DPPH scavenging activity and antioxidant enzymes (glutathione peroxidase, glutathione reductase, catalase and superoxide dismutase). There was a decrease of antioxidant activity of seeds of *A. cearensis* during germination in water that ranged from 6.21 to 2.81%, however, increased in seeds subjected to water stress of 6.21% to 7.49% (-1.2 MPa) and 10.00% (-1.4 MPa). There was a direct relationship between antioxidant activity and content analyzed for total phenols in methanolic extracts of seeds of *A. cearensis* the first 48 of soaking in water and an inverse relationship from this period, which did not occur when subjected to water stress -1.4 MPa with PEG. Significant variations of enzyme activities were observed from 48 hours of soaking. The activity of superoxide dismutase (SOD) decreased markedly in seeds subjected to treatment with PEG in both potential when compared with germination in water. The activity of the enzyme glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPOX) showed similar, with increased enzymatic activity from 48 hours of soaking, having maximum activity at 72 hours, when subjected to water stress. The enzymatic response obtained in this study concluded that the antioxidant enzymes may be regarded as the best biomarker biochemical / molecular evaluation of the antioxidant activity of seeds of *A. cearensis* in response to water stress during germination and, consequently, to oxidative stress in seeds of *A. cearensis*.

Keywords: antioxidant activity. Bioactive phytochemicals. Medicinal plants. Antioxidant enzymes. Phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Abrangência do semi-árido nordestino no Brasil.....	21
Figura 2	Fases de germinação das sementes.....	24
Figura 3	Reações de catalisação da Superóxido Dismutase (SOD).....	30
Figura 4	Forma biologicamente ativa da enzima Superóxido Dismutase (SOD).....	30
Figura 5	Forma biologicamente ativa da enzima Catalase (CAT).....	32
Figura 6	Reação de catalisação pela Catalase (CAT).....	32
Figura 7	Forma biologicamente ativa da enzima Peroxidase (POX).....	33
Figura 8	Ciclo da ascorbato glutationa.....	34
Figura 9	Reação de catalisação da Glutationa.....	35
Figura 10	Forma biologicamente ativa da enzima Glutaciona Peroxidase.....	36
Figura 11	Reação de catalisação da Glutaciona Peroxidase (GPOX)	36
Figura 12	Forma biologicamente ativa da Glutaciona redutase (GR)	37
Figura 13	Ciclo metabólico da Glutaciona.....	38
Figura 14	A espécie <i>Amburana cearensis</i>	39
Figura 15	Distribuição geográfica da <i>Amburana cearensis</i>	40
Figura 16	Estruturas químicas da <i>Amburana cearensis</i>	44
Figura 17	Curva de embebição e germinação de sementes de <i>Amburana cearensis</i>	61
Figura 18	Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante (AH).....	63
Figura 19	Atividade antioxidante em sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.....	64
Figura 20	Análise do conteúdo de fenóis totais nas sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000	69
Figura 21	Atividade da enzima SOD em sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.....	73
Figura 22	Perfil eletroforético das isoenzimas Superóxido Dismutase (SOD) em cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e sob restrição hídrica em PEG -1,2 e -1,4 MPa em diferentes períodos de embebição (0,24,48,72,84,96 e 120 horas). Utilizou-se 30 µg/g de proteínas.....	75
Figura 23	Perfil eletroforético da isoenzima SOD em cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> sob restrição hídrica em PEG -1,4 MPa em diferentes períodos de embebição (0,24,48,72,84,96 e 120 horas). Utilizou-se 45 µg/g de proteína.....	76
Figura 24	Atividade da enzima Glutaciona Redutase (GR) em cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e sob restrição hídrica em PEG -1,2 e PEG -1,4 MPa em diferentes períodos de coleta (0,24,48,72,84,96 e 120 horas).....	77
Figura 25	Atividade da enzima Glutaciona Peroxidase (GPOX), de cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e sob	

	restrição hídrica em PEG -1,2 e PEG -1,4 MPa em diferentes períodos de coleta (0,24,48,72,84,96 e 120 horas).....	78
Figura 26	Perfil eletroforético das isoenzimas Glutathione Peroxidase em sementes de <i>Amburana cearensis</i> .(A) durante a germinação em água e (B) sob restrição hídrica em PEG -1,2 MPa em diferentes períodos de coleta (0,24,48,72,84,96 e 120 horas).....	79
Figura 27	Perfil eletroforético das isoenzimas Catalase (CAT) em sementes de <i>Amburana cearensis</i> durante a germinação em água (A) e sob restrição hídrica em PEG -1,2(P1) e -1,4(P2) Mpa.....	81
Figura 28	Curva analítica para a realização das leituras espectrofotométricas da atividade antioxidante.....	96
Figura 29	Curva analítica para a realização das leituras espectrofotométricas dos fenóis totais.....	96
Figura 30	Reação de identificação da superóxido dismutase.....	99
Figura 31	Reação de identificação glutathione redutase.....	99
Figura 32	Reação de identificação glutathione peroxidase.....	99
Figura 33	Reação de identificação catalase.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mecanismo de remoção de EROS em células vegetais através de enzimas antioxidantes.....	28
Tabela 2	Utilização da <i>A. cearensis</i> como planta medicinal.....	41
Tabela 3	Preparo da curva de calibração para determinação da atividade antioxidante.....	52
Tabela 4	Preparo da curva de calibração para análise dos fenóis totais.....	53
Tabela 5	Análise biométrica das sementes de <i>Amburana cearensis</i>	60
Tabela 6	Resumo da análise de variância para análise da atividade antioxidante e do teor de fenóis totais entre os períodos de embebição das sementes de <i>A. cearensis</i> em água.....	68
Tabela 7	Resumo da análise de variância para atividade antioxidante e teor de fenóis totais dos cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.....	69
Tabela 8	Teor de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante (AA) dos cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000 em diferentes períodos de embebição (0, 24, 48, 72, 84 e 96 horas).....	70
Tabela 9	Resumo da análise de variância quanto a atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD), Glutaciona Peroxidase (GPOX) e Glutaciona Redutase (GR) de cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> durante a germinação em água, em diferentes períodos de embebição (0, 24, 48, 72, 84 e 96 horas).....	71
Tabela 10	Resumo da análise de variância para a atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD), Glutaciona Peroxidase (GPOX) e Glutaciona Redutase (GR) dos cotilédones de sementes de <i>A. cearensis</i> durante a embebição em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.....	72
Tabela 11	Diluição de BSA com água bidestilada para obtenção de diferentes concentrações e realização da curva analítica.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANAVA	Análise de variância
APS	Persulfato de Amônio
BSA	Soro de Albumina Bovino
CAT	Catalase
CF	Compostos Fenólicos
CuZnSOD	Superóxido Dismutase dependente de cobre e zinco
CUG	Coeficiente de uniformidade de germinação
Cu	Cobre
DHA	Deidroascorbato
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetrácetico
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EC ₅₀	Concentração eficiente
Fe-SOD	Superóxido Dismutase dependente de ferro
FT	Fenóis Totais
GR	Glutathione Redutase
GSSG	Glutathione oxidada
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione S-Transferase
GPOX	Glutathione Peroxidase
H ₂ O	Molécula da água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IUCN	International Union for Conservation of Nature
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IVG	Índice de Velocidade de germinação
KDa	Kilodaltons
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico

LBBB	Lab.de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos
MDA	Monodeidroascorbato
MDAR	Monodeidroascorbato Redutase
MnSOD	Superóxido Dismutase dependente de manganês
MPa	Mega Pascal
mA	Miliampère
MeOH	Álcool Metílico
MTT	3-4,5-Dimetiltetrazólio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
Ni - SOD	Superóxido Dismutase dependente de Níquel
NaHPO ₄	Fosfato de Sódio
NO ₂	Óxido Nítrico
Ni	Níquel
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
POX	Peroxidases
PSB	Tampão Fosfato Salino
RAS	Regras para Análise de Sementes
SOD	Superóxido Dismutase
SO ₂	Dióxido de enxofre
TEMED	Tetrametil diaminoetileno
TMBZ	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UICN	União Internacional para Conservação da Natureza

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	19
2.2	O SEMIÁRIDO E A CAATINGA NORDESTINA.....	20
2.3	FATORES AMBIENTAIS E ESTRESSE OXIDATIVO EM SEMENTES.....	22
2.3.1	Estresse ambiental	22
2.3.2	Embebição e Germinação.....	23
2.3.2.1	Metabolismo germinativo.....	25
2.3.3	Aspectos ecológicos relacionados à germinação das sementes.....	26
2.4	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES.....	26
2.4.1	Espécies Reativas de Oxigênio (EROS).....	27
2.4.2	Compostos fenólicos como antioxidantes.....	28
2.4.3	Enzimas antioxidantes.....	29
2.4.3.1	Superóxido Dismutase (SOD).....	29
2.4.3.2	Catalase (CAT).....	31
2.4.3.3	Peroxidase (PO).....	32
2.4.3.4	Glutathiona.....	34
2.4.3.5	Glutathiona Peroxidase (GPOX).....	35
2.4.3.6	Glutathiona Redutase (GR).....	36
3	AMBURANA CEARENSIS.....	38
3.1	ESTUDO FITOQUÍMICO DA AMBURANA CEARENSIS.....	42
4	OBJETIVOS.....	45
4.1	OBJETIVO GERAL.....	45
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5.	MATERIAS E MÉTODOS.....	46
5.1	AMOSTRA BIOLÓGICA.....	46
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES DE <i>A.CEARENSIS</i> ...	46
5.2.1	Teste de germinação.....	46
5.2.2	Morfometria das sementes.....	47
5.2.3	Umidade.....	47
5.2.4	Peso de mil sementes.....	48
5.2.5	Lipídeos Totais.....	48
5.3	CURVA DE EMBEBIÇÃO EM SEMENTES.....	49
5.4	PREPARO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	49
5.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	50
5.5.1	Preparo dos Extratos para Determinação do Teor de Fenóis Totais e Atividade Antioxidante.....	51

5.5.1.1	Atividade antioxidante- Método do sequestro do radical DPPH.....	51
5.5.1.2	Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	52
5.5.3	Atividade Enzimática.....	54
5.5.3.1	Preparo dos Extratos.....	54
5.5.3.2	Determinação da Atividade Enzimática.....	54
5.5.3.3	Perfil Isoenzimático.....	55
5.5.3.3.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	55
5.5.3.3.2	Revelação.....	56
5.5.3.3.2.1	Superóxido Dismutase (SOD).....	56
5.5.3.3.2.2	Glutathione Redutase (GR).....	57
5.5.3.3.2.3	Glutathione Peroxidase (GPOX).....	57
5.6	ANÁLISES DOS DADOS.....	58
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.1	CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES.....	59
6.2	CURVA DE EMBEBIÇÃO.....	60
6.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	62
6.3.1	Atividade antioxidante – Método sequestro do radical DPPH.....	62
6.4	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	66
6.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	70
7	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE A – CURVAS ANALÍTICAS.....	96
	ANEXO A – TABELAS E QUADROS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS APRESENTADOS NA DISSERTAÇÃO.....	97
	ANEXO B – TABELAS E QUADROS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS APRESENTADOS NA DISSERTAÇÃO.....	98
	ANEXO C – REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	99
	ANEXO D - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA A REVELAÇÃO ENZIMÁTICA.....	100

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamento provavelmente coincide com o aparecimento do próprio homem. Relatos populares além de reportagens indicam que alguns animais silvestres também as utilizavam parecendo conhecer o poder curativo para ferimentos, dores, dentre outras (PEREIRA et. al., 2008).

O trabalho que será descrito, nas linhas que seguirão, vai abordar os aspectos de utilização, o processo germinativo e marcadores bioquímica da atividade antioxidante, que envolve uma planta comumente conhecida no nordeste brasileiro. Das diversas plantas medicinais existentes, encontra-se a *Amburana cearensis*, que é uma planta, popularmente utilizada, na busca da cura de afecções respiratórias, além de possuir a função de hepatoprotetora, e outras. A função germinativa é o ponto mais importante para o processo de desenvolvimento e manutenção da planta. O aprofundamento nos estudos nesta fase de desenvolvimento se faz necessário, pois, com isso visualizam-se as promessas de sustentabilidade das espécies, que se encontram ameaçadas de extinção.

Devido à crescente busca por fitoterápicos, a Organização Mundial da Saúde (OMS), visando garantir medicamentos com bons precedentes, estabeleceu normas para manipulação e divulgação destes, com o intuito de se obter resultados para os reais benefícios e possíveis riscos à saúde.

De acordo com o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, é de grande importância esta linha de estudo, para “garantir a população brasileira o acesso seguro e o uso racional destas plantas e/ou fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL, 2007). Por essas razões, pesquisas sobre espécies vegetais com potencial medicinal vêm sendo valorizadas, com possibilidade de descoberta de novos princípios ativos úteis como medicamento pela população, e nesse contexto, o chamado “saber popular” (DI STASI, 1996).

Estudos têm sido conduzidos com biocompostos com características de antioxidantes biológicos, que são moléculas naturais com o poder de prevenir a formação incontrolável de radicais livres e a atividade de espécies reativas de oxigênio (EROS), ou ainda inibir reações em estruturas biológicas. A degradação ou

transformação de radicais livres e atividades de espécies reativas de oxigênio pode ser atenuada por meio de oxidação e da atividade de antioxidantes endógenos, principalmente reduzindo moléculas (LORENZI, 2002). Os níveis metabólicos normais de espécies reativas de oxigênio são mantidos pela atividade antioxidante de diversas enzimas ou componentes celulares (LEAL et al., 2005). Porém, o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento de espécies oxidantes, gera um estado que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (AQUINO, 2005).

Para prevenir que estas lesões oxidativas ocorram se faz necessárias avaliações bioquímicas que permitam identificar e/ou demonstrar a atividade antioxidante e enzimática, das estruturas celulares pontuando as biomoléculas que possam estar envolvidas nestes processos, e como podem estar se mantendo durante todo o processo de formações e remoção dos radicais livres no organismo. A atividade metabólica de enzimas antioxidantes e teores fisiológicos anormais de compostos fenólicos pode ser usada como marcadores correlacionados às situações de estresse oxidativo (COSTA, 2003).

Amburana cearensis A.C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. Allem.) pertencente à família Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae), sendo ao lado da *A. acreana* os únicos representantes do gênero. Popularmente, é conhecida por diversas designações, como imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru, dentre outras (MAIA, 2004). Esta espécie tem sido identificada como espécie sob risco de extinção pela União Internacional para Conservação da Natureza – UICN (LEITE, 2005), visto que a utilização desta espécie ocorre sem nenhum manejo de conservação e sustentabilidade.

A utilização pela população no tratamento de doenças, tendo como partes utilizadas principalmente as cascas do caule e as sementes. As cascas do caule de *A. cearensis* são utilizadas na preparação de “lambedos” (bebida açucarada caseira) para o tratamento de asma, tosse e bronquite e em forma de chá por apresentar atividade antiinflamatória e espasmolítica. Industrialmente, a forma farmacêutica disponível é o xarope de cumaru (MAIA, 2004; AQUINO et al., 2005). Com o estudo fitoquímico da casca do caule da amburana tem-se observado uma elevada quantidade de cumarina (principal componente) e compostos fenólicos, sobretudo flavonóides como isocampferídio, o flavonóide majoritário; campferol; quercetina; 4’-

metoxi-fisetina; afromosina; 7-hidroxi-8,4'-dimetoxi-isoflavon e os biflavonoídes amburanina, ácido protocatecuico e ácido vanílico; glicosídeos fenólicos, como amburosídeo A e B e esteróides glicosilados β -sitosterol e estigmasterol. (LEAL et al., 2006).

A Amburana é uma espécie nativa do bioma Caatinga e semiárido do nordeste brasileiro, apresentando-se como região marcada pelas condições climáticas extremas, com prolongados períodos de seca. Entretanto, a Caatinga se destaca pela sua diversidade biológica exuberante, abrigando espécies vegetais adaptadas, proporcionando vastas condições de estudo e exploração destas espécies vegetais para fins medicinais.

A Amburana é resistente e tolerante aos estresses por calor e seca, apresentando como estratégia de sobrevivência a rápida regeneração de suas estruturas aéreas tão logo surjam às primeiras chuvas, sendo esta característica comum às espécies vegetais nativas da Caatinga, assim como desejáveis do ponto de vista agrônomo para a sua utilização de modo sustentável.

Pelo exposto, o uso sustentável desta espécie implica na aquisição de conhecimento sobre os mecanismos básicos de germinação de suas sementes em condições normais e sob restrição hídrica, visando subsídios para multiplicação e produção agrônoma, de modo a reduzir a extração insustentável das estruturas ou eventualmente de toda a planta em seus habitats naturais, e promover benefícios socioeconômicos para o sustento de muitos (pequenos) agricultores da região que utilizam esta como planta medicinal e para outros fins. O presente trabalho ocorreu em torno da avaliação dos estágios germinativos da Amburana buscando-se avaliar a atividade antioxidante em sementes de *Amburana cearensis*, submetidas a estresse por restrição hídrica, por meio de marcadores bioquímicos tais como fenóis totais, capacidade seqüestradora de hidrogênio pelo DPPH e atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, catalase e superóxido dismutase.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais correspondem, incontestavelmente as mais antigas armas empregadas no tratamento de enfermidades humanas. A dor fez com o homem buscase o analgésico; a doença, o remédio. Portanto, é fácil inferir que o uso de plantas no combate a doenças seja tão antigo quanto à própria humanidade (OLIVEIRA e AKISUE, 2000). No contexto do desenvolvimento humano, pode-se citar diferentes civilizações, como os gregos, romanos e egípcios que muito antes de Cristo já utilizavam plantas como fins medicinais (AGRA, 1994).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002). Houve épocas, entretanto, em que a confiança nas virtudes das ervas diminuiu, contudo, elas mantiveram-se como fonte indispensável de drogas. A indústria química farmacêutica produzia os mais diversos tipos de fármacos, que se mostravam eficazes como medicamentos, porém com custos cada vez mais altos deixando grande parte da população mundial sem acesso a esses benefícios. Além disso, efeitos colaterais decorrentes do uso desses medicamentos eram cada vez mais freqüentes. Não existia vantagem em se tratar rápida e eficientemente um mal, introduzindo-se outro. Os medicamentos precisavam ser ao mesmo tempo eficazes seguros e de custo acessível a todos (OLIVEIRA e AKISUE, 2000).

De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002).

A vasta gama de informações sobre o uso de centenas de plantas como “remédios” em todos os lugares do mundo, leva a necessidade de se desenvolver

métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. Como a maior parte da flora é ainda desconhecida do ponto de vista químico, bem como o saber tradicional associado a esta, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudanças culturais acrescentam um censo de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive para uso científico (ELISABETSKY, 2000).

2.2 O SEMIÁRIDO E A CAATINGA NORDESTINA

No contexto de utilização de plantas medicinais, encontra-se o nordeste brasileiro, mais precisamente o semiárido, que ocupado pelo maior bioma nordestino a Caatinga, abriga uma diversidade biológica fundamental para o enriquecimento de estudos. No âmbito da flora nordestina, o que se vê neste bioma é uma riqueza explorada, porém, sem os devidos manejos de sustentabilidade e preservação, levando este ecossistema a riscos de desertificação e extinção.

O Brasil possui 385 milhões de hectares de florestas nativas (IPEF, 2000), sendo que o semiárido corresponde à região Nordeste do Brasil e o norte de Minas Gerais incluída em uma área delimitada pela isoietas de 800 mm.ano⁻¹ de precipitação pluvial média, coincidindo com a região do “polígono das secas”. Ocupa uma área de aproximadamente 900.000km², abrangendo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, compreendidas aproximadamente entre as coordenadas 36°- 44°30`W e 02°50`S, em seu limite norte nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte, até 17°20`S, e no limite sul em Minas Gerais (GIULIETTI e QUEIROZ 2006), representado na Figura 1.

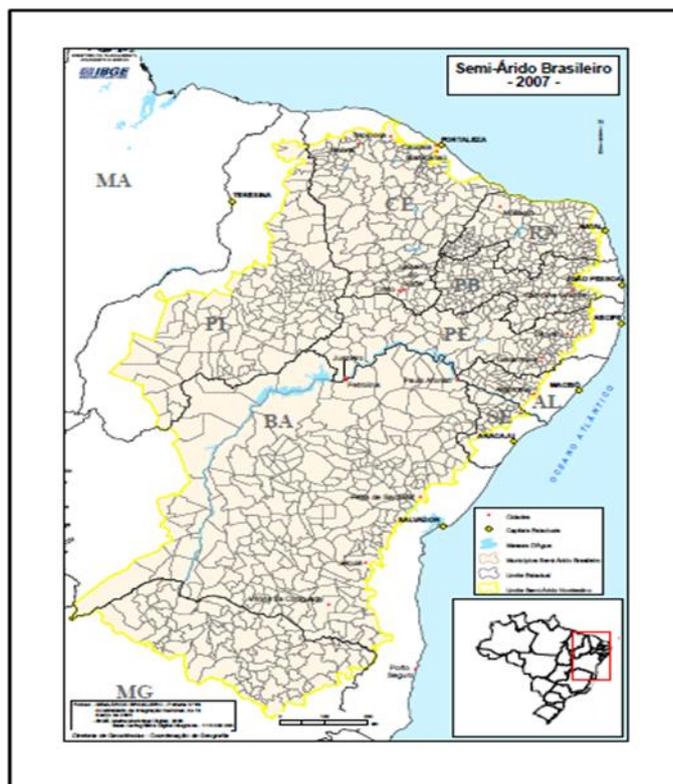


Figura 1- Abrangência do seminário nordestino no Brasil
Fonte: (BRASIL, 2005; IBGE, 2005)

Os termos semiárido e Caatinga são frequentemente utilizados de maneira equivocada, gerando confusão. O termo Caatinga deve ser empregado para o tipo de vegetação característica do bioma, enquanto o semiárido pode ter uma conotação geográfica ou política, a primeira relacionada à região onde predomina o clima semiárido e a segunda à região compreendida pelo polígono das secas (GIULIETTI e QUEIROZ 2006).

A Caatinga é considerada o ecossistema mais explorado e degradado do mundo, pelo uso intensivo da terra (PRADO, 2003), apresentando características peculiares deste bioma, demonstrando uma vegetação xerófita de fisionomia e florística variada. Fitogeograficamente ocupa cerca de 11% do território nacional.

As espécies da Caatinga apresentam adaptações morfológicas e/ou fisiológicas que possibilitam a sobrevivência em condições de seca. Sendo assim, pode-se destacar o mecanismo de fechamento estomático, a redução da área foliar, a senescência e a caducifolia, bem como o ajustamento osmótico. O déficit de água nos tecidos afeta todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento dos vegetais. Já o mecanismo de fechamento estomático, nos horários mais quentes do dia,

constitui uma estratégia utilizada por muitas espécies que habitam regiões áridas e semiáridas, evitando a perda excessiva de água por meio da transpiração (LARCHER, 2000).

As plantas quando submetidas ao estresse, sendo este de qualquer natureza (biótico ou abiótico) tendem a criar estratégias para poderem sobreviver, e assim utilizam-se além das estratégias acima citadas, como também os processos bioquímicos, como a atividade de enzimas e outros metabólitos primários e secundários. Desse modo, conseguem superar o processo de estresse sem sofrer maiores danos.

Nesta região, a demanda por recursos florestais em propriedades agrícolas e industriais vem crescendo a cada dia. Portanto, árvores e arbustos assumem importante papel na economia rural. Desta forma, é importante o desenvolvimento de protocolos de propagação e utilização de espécies nativas de uso múltiplo ou de reconhecido potencial na produção de compostos naturais 'úteis'. Ou seja, que possam ser cultivadas e manejadas sustentavelmente, agregando significativo valor ao contexto da agricultura familiar regional, e passível de utilização em projetos de restauração de áreas degradadas e preservação do bioma Caatinga.

Algumas espécies vegetais características da região da Caatinga, são utilizadas pela população como medicamento para tratar principalmente afecções respiratórias. Essa utilização vem sendo passada de geração a geração, e devido a este uso populacional, é que se faz necessário maiores investigações com a finalidade de caracterizar e identificar os componentes químicos onde se observa o poder medicinal da amburana, o que a faz estar entre as espécies mais utilizadas, do ponto de vista medicinal.

2.3 FATORES AMBIENTAIS E ESTRESSE OXIDATIVO EM SEMENTES

2.3.1 Estresse Ambiental

Entre os fatores ambientais, a água é o fator que mais influencia o processo de germinação. Com a absorção de água, ocorre a re-hidratação dos tecidos e,

conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários à retomada de crescimento por parte do eixo embrionário (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Muitos dos processos deletérios sofridos pelas plantas submetidas a condições adversas são mediados por espécies reativas de oxigênio (EROS), geradas em diferentes compartimentos celulares como consequência tanto do funcionamento defeituoso de vias metabólicas como processos fisiológicos normais. O efeito sinalizador ou destrutivo de EROS depende de suas concentrações, locais de produção e interação com compostos relacionados a outros estresses na planta, assim como do estágio de desenvolvimento da mesma (GECHEV, 2006).

Segundo Henriques e colaboradores (2001), as proteções celulares contra os efeitos deletérios das EROS incluem a prevenção, a interceptação e a reparação. Onde a prevenção ocorre para evitar a formação, a interceptação neutraliza, por meio de enzimas antioxidantes ou por antioxidantes de baixo peso molecular, como as vitaminas C e E, carotenóides, glutathione reduzida, compostos fenólicos, dentre outros e a reparação minimiza os efeitos das EROS.

Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, portanto, a produção de EROS pode ser considerada como uma característica universal do estresse (CARRILLO e VALE, 2005). Os fatores ambientais capazes de produzir estresse oxidativo podem ser classificados em abióticos: alta irradiância, seca, hiperoxia, hipoxia, abnóxia, deficiência mineral, baixas e altas temperaturas; bióticos: infestação bacteriana, fúngica ou viral; e xenobióticos: herbicidas, fungicidas, contaminantes atmosféricos (SO₂, NO, NO₂, ozônio) e metais pesados. Estes últimos são de características antropogênicas (CARRILLO e VALLE, 2005).

2.3.2 Embebição e Germinação

A germinação de sementes inclui diversos eventos como embebição, reativação do metabolismo, aumento na atividade respiratória, atividade enzimática e de organelas, síntese de proteínas e ácidos nucléicos, hidratação das proteínas,

mudanças estruturais subcelulares e alongamento celular, que de modo integrado transformam a semente com baixo teor de água e metabolismo reduzido em uma estrutura com metabolismo vigoroso, culminando no crescimento do embrião (BEWLEY e BLACK, 1994).

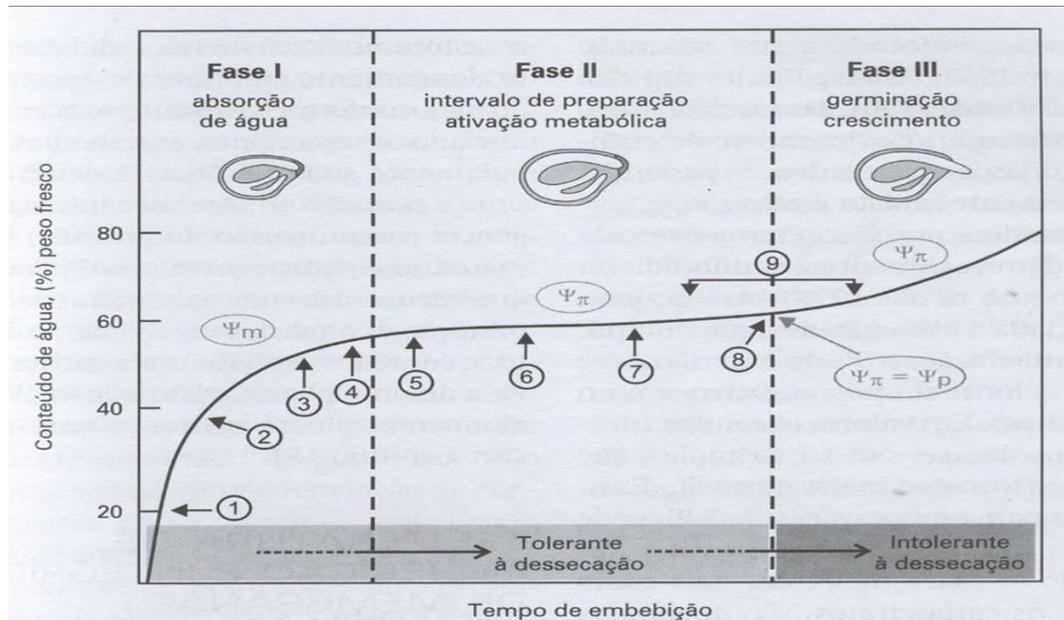


Figura 2 - Fases de germinação das sementes.
Fonte: (FERREIRA; BORGHETTI 2004)

Os fatores ambientais necessários para a germinação de sementes quiescentes são a água, a temperatura e o oxigênio. Destes, a água é o primeiro requisito, sendo que a quantidade de água necessária é aquela que leva os tecidos desidratados das sementes a um nível de hidratação adequado para que o embrião possa retomar o seu crescimento (PAIVA, 2007, MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1978).

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), a água é o fator que exerce a mais determinante influência sobre o processo de germinação. Da absorção de água resulta a reidratação dos tecidos com a consequente intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas que culminam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada de crescimento por parte do eixo embrionário.

A magnitude da embebição é determinada por três fatores, a composição da semente, a permeabilidade do tegumento da semente, ou do fruto à água e a disponibilidade de água na forma líquida ou gasosa no ambiente. A embebição está relacionada com as propriedades dos colóides e não com a viabilidade das

sementes, ocorrendo igualmente em sementes vivas ou mortas; e é dependente da temperatura, ocorrendo mais rapidamente em temperaturas mais elevadas (MAYER; POLJAKOFF - MAYBER, 1978).

2.3.2.1 Metabolismo Germinativo

A respiração e a atividade metabólica se intensificam na primeira fase, que é a etapa de máxima absorção de água, pois, esse máximo é uma propriedade dos colóides hidrofílicos da semente, assim que a semente atinge certo grau de hidratação, pois no metabolismo celular a água é essencial.

A água além de ser o fator iniciante da germinação, está também envolvida, direta ou indiretamente em todas as etapas do metabolismo subsequente. Sua participação é essencial nas reações enzimáticas, na solubilização e no transporte de metabólitos e como reagente de hidrólise de proteínas, carboidratos e lipídeos dos tecidos de reserva da semente (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988; MAYER e POLJAKOFF-MAYBER, 1989; WOODSTOCK e LAO, 1981).

Assim, o déficit hídrico, como fator limitante da produção vegetal, ocupa posição de destaque, pois afeta as relações hídricas nas plantas alterando o metabolismo (NOGUEIRA et al., 2001), o que pode favorecer a biossíntese de metabólitos primários e secundários como resposta ao estresse hídrico.

Além da água, as condições de armazenamento pode ser um fator limitante para o metabolismo germinativo das sementes, pois, durante o armazenamento as condições adversas ambientais resultam no envelhecimento das sementes que podem apresentar desde redução da viabilidade até a completa perda do poder germinativo, produção de plântulas de menor tamanho, produção de plântulas anormais, dentre outros (BEWLEY e BLACK, 1994).

O aumento na atividade celular ocorre a expensas das substâncias de reserva das sementes, que são utilizadas para a produção de metabólitos ricos em energia para a manutenção dos tecidos vivos das sementes e de biossíntese de novos compostos para o reparo de estruturas danificadas pela deterioração (BEWLEY e BLACK, 1994).

2.3.3 Aspectos ecológicos relacionados à germinação das sementes

De acordo com Bewley e Black (1994), o estresse hídrico pode reduzir tanto a porcentagem como a velocidade de germinação, com uma ampla variação de respostas entre as espécies, desde aquelas muito sensíveis até as mais resistentes, sendo que estas possuem a vantagem ecológica de estabelecimento de plântulas em áreas onde as sementes sensíveis à seca não podem fazê-lo. Segundo os autores acima citados, sementes de leguminosas que possuem casca dura apresentam maior retenção de longevidade mesmo em condições estressantes.

Potenciais muito baixos, especialmente no início da embebição, influenciam a absorção de água, inviabilizando a seqüência dos eventos germinativos (BANSAL et al., 1980). A deficiência hídrica é o fator limitante de maior significância a sobrevivência e crescimento inicial de plantas (BLAKE, 1993).

O estresse hídrico produzido por Polietilenoglicol exerce efeitos negativos na germinação e no vigor, devido ao efeito osmótico e/ou iônico que dificultam a absorção de água ou facilitam a penetração de íons nas células (VAN DER MOEZEL e BELL, 1987). Além disso, pode ser atribuído ao estresse, a diminuição da germinação, a menor mobilização de reservas, menor síntese e atividade enzimática ou mudanças na turgescência celular (BRUNI e LEOPOLD, 1992; DELL'AQUILA, 1992; BEWLEY e BLACK, 1994; MACHADO NETO et al., 2006).

2.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que atuam em baixas concentrações em substratos oxidáveis e, portanto, diminuem significativamente ou inibem a oxidação destes substratos (HALLIWELL, 1995, HALLIWELL e GUTERIDGE, 1989). As sementes, em geral são ricas em ácidos graxos essenciais, fibras e compostos fenólicos, que exercem atividade antioxidante. Segundo Suhaj (2006) estas moléculas são agrupadas de acordo com seu mecanismo de ação, em antioxidantes primários e sinérgicos. Os primários atuam retardando ou inibindo a iniciação,

podendo ainda interromper a propagação em cadeia dos radicais. Os sinérgicos atuam por diversos mecanismos reacionais, reduzindo radicais fenoxil quando associado ao ácido ascórbico ou palmitato de ascorbila. Os removedores de oxigênio são oxidados pela remoção do oxigênio livre e os agentes complexantes atuam sequestrando íons metálicos, essenciais para as reações iniciais da autoxidação, neste grupo são utilizados o ácido cítrico, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e os derivados do ácido fosfórico (FENNEMA, 2000).

Existem diversos compostos com ação biológica e importantes propriedades intrínsecas como antioxidantes: a vitamina C, a vitamina E, β -caroteno, glutathione, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e a catalase (HALLIWELL, 1999; EVANS, et al., 1997; JOURDHEUIL et al., 1998; MCKENZIE et al., 1998; KRISHNA et al., 1996), adicionalmente, incluem-se os flavonóides, alcalóides e carotenóides (APEL e HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2005).

A destruição do maior número de radicais livres e atividades de espécie de oxigênio ocorre por meio de oxidação e de antioxidantes endógenos principalmente reduzindo moléculas (LORENZI, 2002). Os níveis metabólicos normais de espécies reativas de oxigênio são mantidos pela atividade antioxidante de diversas enzimas ou componentes celulares (LEAL et al., 2005). Porém o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento de espécies oxidantes, gera um estado pro - oxidante, que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (AQUINO, 2005).

2.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

Uma vez que tenha havido a formação das espécies reativas de oxigênio, elas vão atuar nos tecidos vegetais causando danos, tanto fisiológicos como bioquímicos. Em destaque na Tabela 1, encontra-se os mecanismos de remoção das EROS por enzimas antioxidantes, o que remove, os seus produtos, e os locais de atuação.

Tabela 1 - Mecanismo de remoção de EROS em células vegetais através de enzimas antioxidantes.

Mecanismo	Remove	Produz	Localização celular
Superóxido Dismutase	O_2^-	H_2O_2	Cloroplasto, Citosol, Mitocôndria, Peroxissomo
Catalase	H_2O_2	H_2O_2	Mitocôndria, Peroxissomo
Peroxidases	H_2O_2	H_2O_2	Vários locais
Glutationa peroxidase	H_2O_2	H_2O_2	Cloroplasto, Citosol, Mitocôndria, Retículo endoplasmático

Fonte: Adaptado de Mooller et. al. (2007).

A atividade alterada de enzimas e teores fisiológicos anormais de compostos fenólicos pode ser usada como marcadores correlacionados a situação de estresse oxidativo (COSTA, 2003) e justificar características farmacológicas de plantas medicinais.

Uma das estratégias que a célula usa para lidar com a formação de EROS e o estresse oxidativo é agir diretamente sobre os EROS através de compostos antioxidantes.

Pode-se afirmar que a propriedade antioxidante de vegetais se deve, principalmente a presença de compostos fenólicos (POKORNY, 1991). Neste contexto, os vegetais que apresentam propriedade antioxidante integram o grupo destas substâncias, denominadas funcionais, por estarem potencialmente envolvidas na redução de risco de doenças (KROON; WILLIAMSON, 1999).

2.4.2 Compostos Fenólicos como antioxidantes

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, constituem uma mistura complexa de produtos originados do metabolismo secundário das plantas, que diferem em estrutura química e reatividade. Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóicos e cinâmicos),

cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias. (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005).

2.4.3 Enzimas antioxidantes

Enzimas antioxidantes são substâncias que mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, poderiam atrasar ou inibir as taxas de oxidação (ROCHA, et al., 2007).

2.4.3.1 Superóxido Dismutase - SOD (EC 1.15.1.1)

Nome sistemático: superóxido: superóxido oxidoreductase

As enzimas superóxido dismutase, destacam-se por serem as primeiras enzimas que atuam na defesa do organismo, contra as espécies reativas de oxigênio (ANTUNES-NETO et al., 2005). A função das SOD é de possibilitar que duas moléculas de O_2^- se dismutem para formar H_2O_2 , que é considerado um agente antioxidante fraco Figura 3.





Figura 3 - Reações de catalisação da Superóxido Dismutase (SOD)
Fonte: (RENZ, 2003)

O O_2 pode ser produzido em qualquer local onde esteja presente uma cadeia de transporte de elétrons. Aliás, as membranas fosfolipídicas são impermeáveis ao radical superóxido e, portanto é importante que a SOD esteja no local onde é formado (ALSCHER, ERTURK e HEATH, 2002).

As SODs (Figura 4) são um grupo de metaloproteínas multiméricas que têm sido classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico presente em seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) ou ferro (Fe-SOD), sendo que as Cu/Zn-SOD são consideradas as mais abundantes em vegetais (SCANDALIOS, 1993; MALLICK e MOHN, 2000). As Cu/Zn-SOD e algumas Mn-SOD e Fe-SOD de procariontes são diméricas, enquanto que as Mn-SOD das mitocôndrias e de algumas bactérias termófilas são tetraméricas. Também tem sido relatado um novo tipo de SOD que tem Ni (Ni-SOD) no sítio ativo em *Streptomyces* e cianobactérias. A Ni-SOD tem uma estrutura homohexamérica onde cada subunidade está conformada por quatro hélices, onde se localiza o sítio ativo (WUERGES et al., 2004). A Ni-SOD apresenta baixo peso molecular, sendo este de 13.000 KDa (WUERGES et al., 2004). Apesar de tantas pesquisas serem realizadas com esta enzima, nenhum outro substrato foi descrito quanto a sua especificidade para o superóxido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

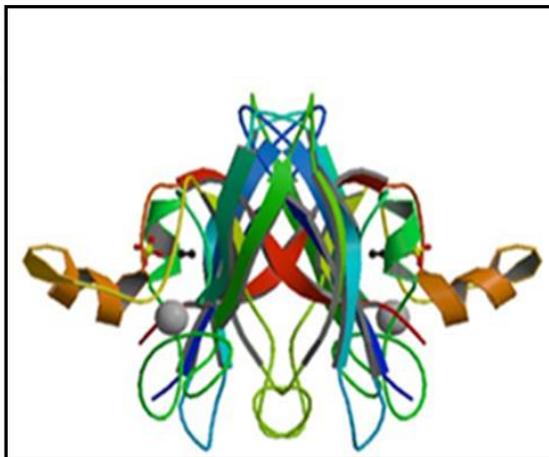


Figura 4 - Forma biologicamente ativa da enzima Superóxido Dismutase (SOD)
Fonte: (PROTEÍN DATA BANK, 2010)

De maneira geral, as Cu/Zn-SOD são encontradas no citosol e no estroma dos cloroplastos (HAYAKAWA, KANEMATSU e ASADA, 1994). As Cu/Zn-SOD possuem um peso molecular de 32.000 KDa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). A isoenzima Cu/Zn-SOD, extraída de folha de *Nicotiana plumbaginifolia* (tabaco) teve seu peso molecular determinado em cerca de 33,200 KDa, sendo que a eletroforese revelou a presença de duas subunidades iguais de 16,600 KDa.

As Mn-SOD e Fe-SOD têm sido encontradas geralmente na matriz mitocondrial de células eucarióticas e em células procarióticas. A Mn-SOD é uma proteína cujo peso molecular é de 40.000 KDa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985), quando associada a membrana tem sido observada nos cloroplastos de algumas plantas (SEHMER e DIZENGREMEL, 1998). A Fe-SOD foi encontrada em algumas famílias de plantas superiores e está associada principalmente aos cloroplastos, esta isoenzima possui peso molecular de 55,850 KDa (MALLICK; MOHN, 2000).

2.4.3.2 Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)

Nome sistemático: H₂O₂: H₂O₂ oxidorreductase

A Catalase (CAT) é uma enzima que tem por função catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (H₂O) e oxigênio (O₂). A inibição da CAT leva a um aumento das espécies reativas de oxigênio, proporcionando ao organismo um estresse oxidativo (SILVA, et. al, 2008).

A CAT é uma enzima tetraédrica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos (Figura 5). A Catalase apresenta um peso molecular de 240.000 KDa em célula animal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). Em plantas existem pelo menos três tipos de Catalases distintas, que diferem em termos de localização e regulação biossintética (SCANDALIOS, GUAN e POLYDOROS, 1997): (1) aquelas presentes em sistemas fotossintéticos e que têm funções de eliminação de H₂O₂ durante a fotorespiração; (2) produzidas pelo tecido vascular que tem papel na lignificação e (3) abundantes em sementes e plantas novas e sua atividade é relacionada com a remoção do excesso de H₂O₂ produzido pela degradação de

ácidos graxos no ciclo do glioxilato nos glioxissômos (VAN BREUSEGEM et al., 2001).

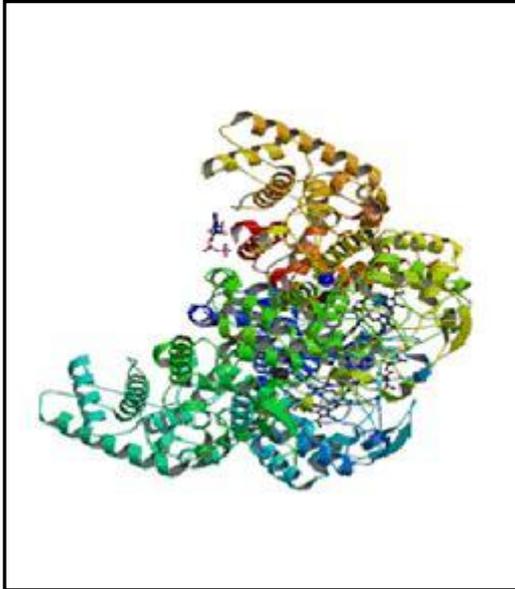


Figura 5 - Forma biologicamente ativa da enzima Catalase (CAT).
Fonte: (PROTEIN DATA BANK, 2010)

As evidências sugerem que a CAT utiliza um mecanismo de dois estágios tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas, Figura 6.

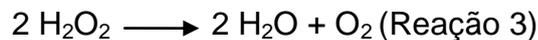


Figura 6 - Reação catalisada pela Catalase (CAT)
Fonte: (RENZ, 2003)

No primeiro estágio o ferro do grupo heme da catalase interage com o H_2O_2 para formar um peróxido de ferro rico em oxigênio. Este composto intermediário é denominado componente I. Em baixas concentrações de H_2O_2 ($< 10^{-6}\text{M}$), o componente I pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol ou ácido ascórbico). Com elevadas concentrações de H_2O_2 , o componente I reage com uma segunda molécula de H_2O_2 para produzir água e uma molécula de oxigênio (SCANDALIOS, 1994).

2.4.3.3 Peroxidase - POX (E.C 1.11.1.7)

Nome sistemático: doador: peróxido de hidrogênio oxidoreductase

As peroxidases (Figura 7) estão presentes em todos os compartimentos celulares e catalisam a transferência de elétrons ao H_2O_2 usando diferentes substratos reduzidos como doadores. Essa enzima possui peso molecular de 35.000 KDa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). As POX de plantas aumentam em resposta a vários estresses bióticos e abióticos, participam no catabolismo de auxinas e em processos de síntese de parede celular como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação em plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra patógenos (SYROS et al., 2004).

O aumento de peroxidases tem sido correlacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações plantas-microrganismos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002). Dentre as peroxidases de funções específicas na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio estão as peroxidases, mais importantes denominadas de Ascorbato Peroxidase - APX (E.C.1.11.1.11) e Glutathiona Peroxidase - GPOX (E.C.1.11.1.9). Como está presente em quase todos os compartimentos celulares a ascorbato peroxidase age na desintoxicação de peróxido de hidrogênio. O ciclo da ascorbato-glutathiona é encontrado em quase todos os compartimentos celulares (RIZHSKY, LIANG e MITTLER, 2003).

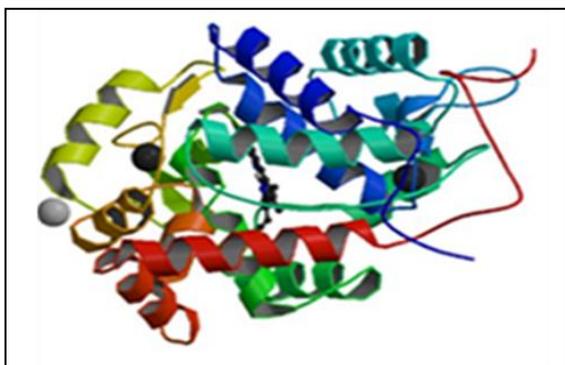


Figura 7 - Forma biologicamente ativa da enzima Peroxidase (POX).
Fonte: (PROTEIN DATA BANK, 2010)

O ascorbato reduz o H_2O_2 à água pela APX e o produto monodeidroascorbato (MDA) formado, volta a se reduzir à ascorbato por três vias: a primeira é por causa da dismutação espontânea que sofre o MDA que produz ascorbato e deidroascorbato (DHA); na segunda via, o MDA é reduzido enzimaticamente pela monodeidroascorbato redutase (MDAR); numa terceira via o DHA formado da

primeira via é reduzido a ascorbato pela deidroascorbato redutase, que utiliza glutathiona como agente redutor (Figura 8). A glutathiona oxidada é regenerada pela glutathiona redutase (GR) (E.C 1.6.4.2). Tanto a GR como a MDAR consomem $\text{NADPH} + \text{H}^+$ como fonte de elétrons para produzir os seus correspondentes substratos (MITTLER, 2002). No ciclo água-água também tem participado da APX, porém em uma via diferente que está localizada no cloroplasto e atua parte do metabolismo da fase “luminosa” da fotossíntese. O O_2 formado pela transferência de um elétron do PSI para O_2 é dismutado em H_2O_2 e O_2 pela SOD e seguidamente o H_2O_2 é eliminado pela APX. O ciclo água-água utiliza elétrons da ferredoxina para regenerar ascorbato, portanto não tem consumo de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ nesta via metabólica (MITTLER, 2002).

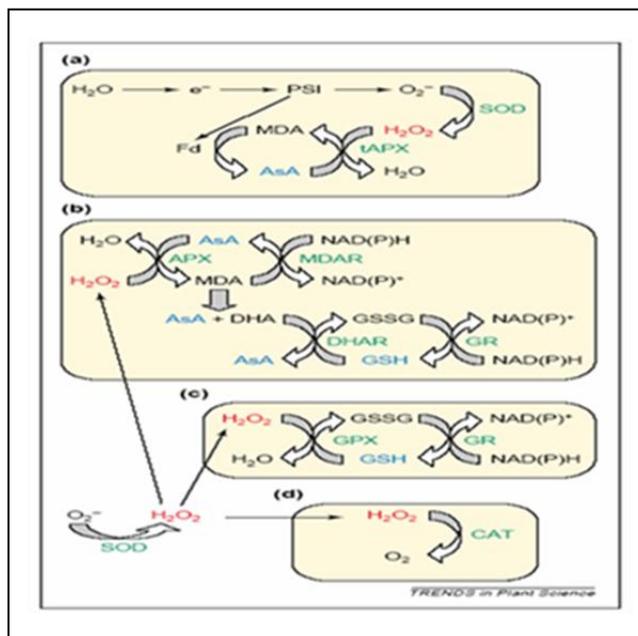


Figura 8 - Ciclo da ascorbato glutathiona. (a) Ciclo água-água; (b) Ciclo ascorbato-glutathiona; (c) Ciclo glutathiona peroxidase (d). As ROS encontram-se em vermelhas, os antioxidantes em azuis e as enzimas removedoras de ROS em verde. Fonte: Adaptado de Mittler (2002)

2.4.3.4 Glutathiona

A Glutathiona é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas e proteção celular (MEISTER, 1983).

A forma reduzida da glutathiona reduzida (GSH) mantém estáveis os grupos tióis das proteínas, reduz ligações dissulfetos induzidas pelo estresse oxidativo, neutraliza radicais livres, dentre outras funções. Por isso, a concentração intracelular da GSH é um indicador da capacidade da célula em manter sua homeostase, por meio da neutralização de agentes oxidantes (SOUZA e MENEZES, 2004). A Figura 9 apresenta a reação de ação da glutathiona como agente redutor.

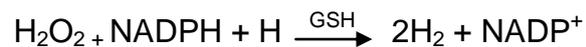


Figura 9 - Reação de catalisação da Glutathiona
Fonte: (BARREIROS, 2006)

2.4.3.5 Glutathiona Peroxidase - GPOX (E.C.1.11.1.9)

A Glutathiona peroxidase (Figura 10) pertence a uma família de múltiplas isoenzimas que catalisam a redução de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e lipoperóxidos por redução de glutathiona. A enzima é uma das poucas que contém na sua estrutura primária um aminoácido raro, a selenocisteína, que é codificado por um triplete (TGA) que normalmente é um códon de terminação. A substituição do enxofre por selênio contribui para que este aminoácido tenha um grande poder nucleofílico e menor pK do que a cisteína. Assim a enzima GPX na qual o aminoácido selenocisteína é considerado seu sítio catalítico, adquire um grande potencial redox para o seu substrato (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999). A enzima GPX dependente de selênio possui peso molecular de 81.000 KDa, esta enzima é encontrada em tecidos de mamíferos em algas e fungos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

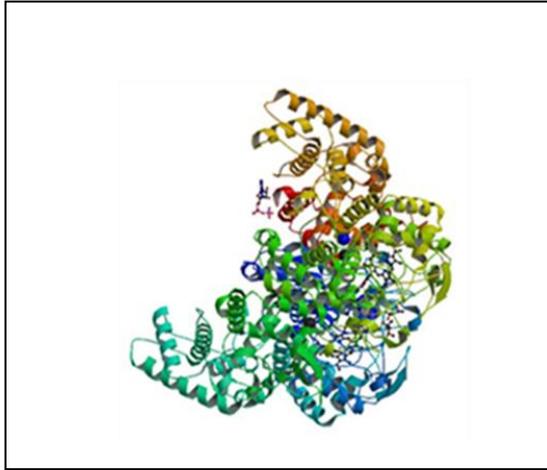


Figura 10 - Forma biologicamente ativa da enzima Glutathione Peroxidase (GPOX).
Fonte: (PROTEIN DATA BANK, 2010)

Quatro grupos de GPX que contém selenocisteína têm sido identificados em vertebrados; a GPX citosólica; a GPX de plasma extracelular; GPX gastrointestinal; e a fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPX). A identificação da atividade GPX, genes com seqüências homólogas com animais, o isolamento de uma proteína a partir de um gene de citros e a sua caracterização como fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase não foi conhecida em plantas até relativamente pouco tempo (ESH DAT et al., 1997).

Atividade GPX tem sido detectada em extratos celulares de plantas superiores utilizando H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos como substratos. No entanto, ao menos uma parte desta atividade pode ser devida à presença de GST que também é conhecido por ter alguma atividade GPX (CHURIN, SCHILLING e BÖRNER, 1999). Na Figura 11 é apresentada a reação de redução do peróxido de hidrogênio, frente à enzima glutathione peroxidase.

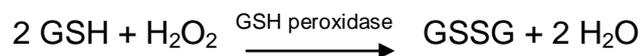


Figura 11 - Reação de catalisada pela Glutathione Peroxidase (GPOX)
Fonte: (BARREIROS, 2006)

2.4.3.6 Glutathione Redutase - GR (E.C 1.6.4.2)

Nome sistemático: NAD(P)H glutathione oxidoreductase

Esta enzima (Figura 12) age conjugadamente a glutathione peroxidase. A glutathione redutase (GR) não remove a EROS, mas sim regenera a glutathione à sua

forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH + H⁺), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona, como está representado na Figura 13.

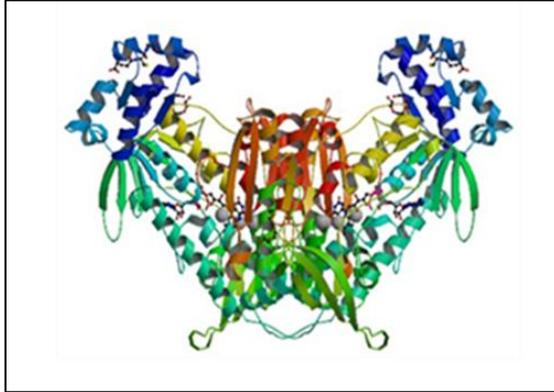


Figura 12 - Forma biologicamente ativa da Glutathiona Redutase (GR)
Fonte: (PROTEIN DATA BANK, 2010)

Glutathiona e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico deste peptídeo apresentam associações com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo. Estas alterações implicam em lesões de DNA gerando processos pré-mutagênicos.

A resistência de muitas células contra o estresse oxidativo está associada com elevados níveis intracelular de glutathiona em sua forma reduzida (JUNIOR et al., 2001). Conforme descrito por Rover Jr e colaboradores (2001) a enzima dependente de selênio, a glutathiona peroxidase, utiliza a glutathiona (GSH) como agente redutor no ciclo de interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

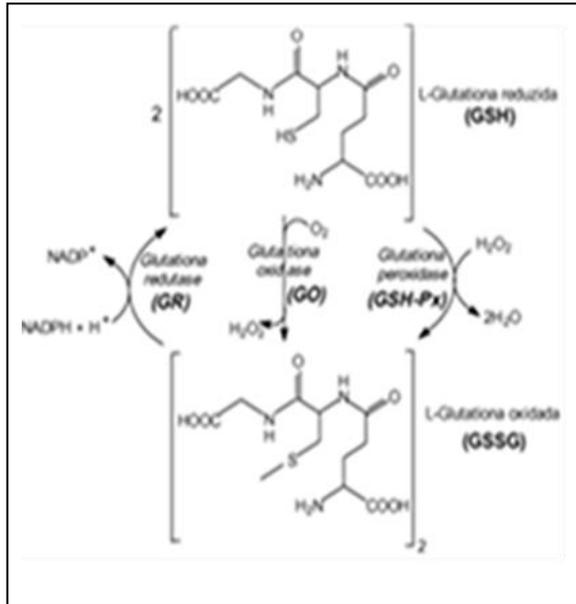


Figura 13 - Ciclo metabólico da Glutathiona
 Fonte: (MEISTER, 1983)

3 AMBURANA CEARENSIS

A *Amburana cearensis* (Freire Allemão) A. C. Smith, Tropical Woods, 62:30, 1940 (Figura 14) é uma espécie vegetal pertencente a divisão Magnoliophyta (Angiospermae), a classe das Magnoliopsida (Dicotyledonae) e ordem Fabales, é uma espécie pertencente à Família Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae), sendo ao lado da *A. acarena* os únicos representantes do gênero. Frequentemente existe confusões com outra leguminosa homônima chamada *Dipteryx odorata*, ambas ricas em cumarina (MAIA, 2004). É conhecida popularmente por cerejeira, amburana, amburana-de-cheiro, angelim, baru, cabocla e imburana-cheirosa, cerejeira-rajada, cumaré, cumaru, cumaru-de-cheiro, imburana-brava, cumaru-do-ceará, cumbaru, cumbaru-das-caatingas, emburana, imburana, imburana-de-cheiro, louro-ingá, umburana, umburana-lisa, umburana-macho, umburana-de-cheiro, umburana-vermelha, ishpingo, palo, trébol, roble criollo e tumi (IPEF, 2008).

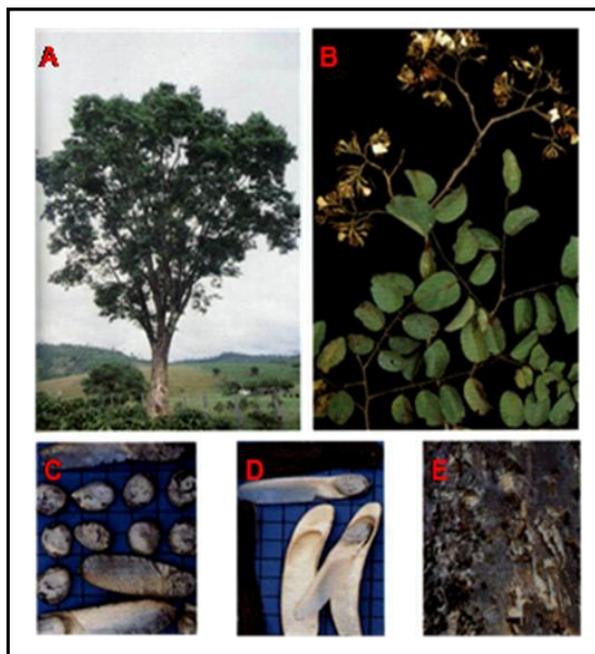


Figura 14 - A espécie *Amburana cearensis*: (A) Planta adulta; (B) Flores; (C) Fruto; (D) Sementes e (E) Caule. Fonte: (LORENZZI, 1996)

Ocorre naturalmente no Nordeste do país (Figura 15), na vegetação da Caatinga, nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia dentre outros, e ainda no Espírito Santo e Minas Gerais na Floresta Pluvial do Vale do Rio Doce e nos afloramentos calcários e matas decíduas dos Estados de Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul e São Paulo. Apresenta porte regular (Figura 14 A), podendo atingir até 10m de altura na Caatinga e até 20m na Zona da mata (CORREA, 1978; LORENZI, 1992).

Revestida por uma casca vermelho-pardacenta, folhas alternadas, com 7-12 folíolos ovados, flores brancacentas, miúdas e muito aromáticas. O fruto é um legume, pendente, onde a vagem tardiamente deiscente é achatada e quase preta, contendo uma, ou, raro, duas sementes na porção terminal alada, achatada, rugosa e provida de uma asa membranácea, preta, de cheiro ativo e agradável (Figura 14 B e 14 C). Qualquer parte da planta quando cortada e exposta ao ar durante algum tempo, exala forte cheiro de cumarina, de onde vêm um dos seus nomes vulgares cumaru-da-caatinga (LIMA, 1989).

Em análises morfoanatômicas, foi possível verificar que as sementes de *A. cearensis* são bitegmentadas, exotestais e tem os cotilédones como principal tecido de reserva. O tegumento é bastante rígido composto por células esclerenquimáticas, sendo a camada externa denominada exotesta, formada por macroesclereídes

seguida por osteoesclereídes e a camada interna formada pelo tégmen o que dificulta a absorção de água. Na análise histoquímica pôde-se verificar que o amido representa a reserva do tecido parenquimático no embrião e que ocorre considerável redução na concentração dessa substância conforme a expansão do embrião no processo de germinação (TELES et al., 2008; SIMÕES, 2008; LOUREIRO et al., 2008).

A germinação é um dos mais comuns e eficazes processos, já que leguminosas germinadas são amplamente consumidas em todo o mundo. O processo é influenciado por fatores externos, tais como tempo e presença ou ausência de luz, ambos podem ajudar ou inibir o processo de germinação em relação às matérias de reserva da semente (LÓPEZ-AMORÓS et al., 2006).

Durante a germinação, algumas biomoléculas de reserva das sementes são mobilizadas e degradadas para serem utilizadas em processos de obtenção de energia e durante a síntese de novos constituintes celulares do embrião, ocasionando alterações bioquímicas, nutricionais e sensoriais dessas leguminosas (LÓPEZ-AMORÓS et al., 2006).

A sua árvore é considerada ornamental, devido principalmente aos ramos e troncos que são lisos, e vem sendo também utilizados no paisagismo e arborização urbana (LORENZI; MATOS, 2002; CORREA, 1984).

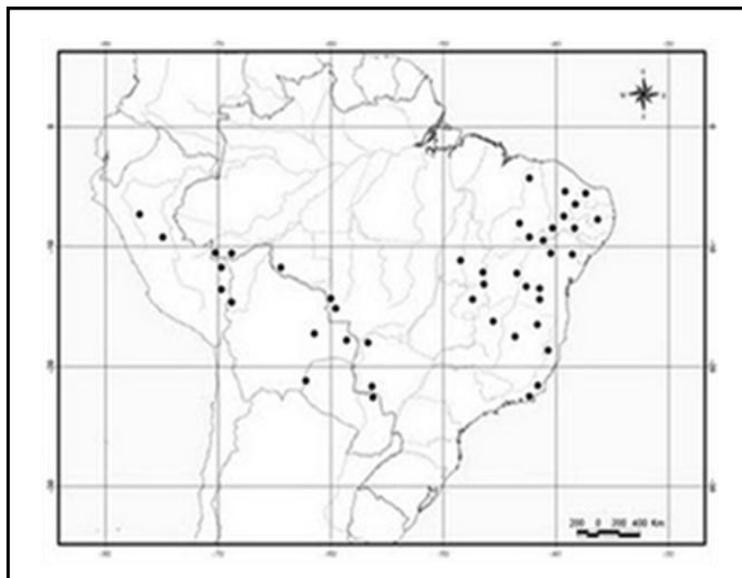


Figura 15 - Distribuição geográfica da *Amburana cearensis*
Fonte: (LORENZZI, 1992)

Identificada como espécie sob risco de extinção pela União Internacional para Conservação da Natureza – UICN (International Union for Conservation of Nature – IUCN) (LEITE, 2005), sendo, classificada por Roque (2009) e outros autores na categoria medicinal, pois é utilizada popularmente no tratamento de várias doenças. As cascas e as sementes da *A. cearensis* são utilizadas no combate de gripe, sinusite, dor de cabeça, dores musculares, tosse e prisão de ventre. As sementes são torradas, piladas e o pó proveniente desse processo é aspirado pelo doente, e por possuírem odor agradável são também utilizadas como aromatizante e repelente de insetos, para perfumar roupas e estantes, e na indústria cosmética e de perfumes. As sementes e as cascas torradas, posteriormente trituradas, reduzidas a pó, são usadas como “rapé” e empregadas no tratamento de sinusites (AGRA, et al., 2007), sendo também utilizadas sob a forma de chá por apresentar atividade antiinflamatória e espasmolítica, e no tratamento da asma, tosse e bronquite. A maceração dos frutos n’água é usada para o tratamento de infecções urinárias (AGRA, et al., 2007).

Além das sementes e do pó, a madeira é reconhecida por ser resistente e de cheiro agradável sendo usada pela indústria de móveis na fabricação de mesas, janelas, porta dentre outras. Contudo, a maior finalidade desta planta está voltada para utilização como planta medicinal. Agra e colaboradores (2007) descreveram a *A. cearensis* como a espécie referida para mais de cinco usos medicinais, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Utilização da *A. cearensis* como planta medicinal

Doenças	Casos analisados (%)
Sistema reprodutivo	39,3
Problemas menstruais	21,4
Infamações Ovarianas e Prostáticas	14,3
Sistema respiratório	38,6
Tratamento de bronquites	22,8
Gripes	14,0
Expectorante	7,0
Asmas e coqueluches	3,5
Doenças do estômago	26,5
Laxativo	17,6
Antidiarréico	14,7
Doenças hepáticas	11,8

Fonte: (AGRA, et al., 2007)

O uso da casca do caule macerada, no vinho ou cachaça é indicado como tônico, no tratamento da anorexia, e quando seca e triturada em forma de pó, é aplicada contra úlceras externas (AGRA et al., 2007). Cascas do caule também são utilizadas na preparação de lambedo para o tratamento de doenças respiratórias. O pó da madeira, rico em compostos fenólicos, é aplicado em tonéis de aguardente de cana-de-açúcar para acelerar o processo de maturação da bebida (MAIA, 2004; AQUINO et al., 2005). As cascas podem ser usadas na produção de balas. As balas são muito procuradas pela população, pois além de potencial medicinal, possuem sabor muito agradável (ROQUE, 2009). De acordo com Leal e colaboradores (2003) foram comprovadas as atividades broncodilatadora, analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *A. cearensis*, o qual demonstrou ser isento de toxicidade em doses terapêuticas, garantindo eficácia e segurança no tratamento de asma, bronquite, gripes e resfriados. Um decocto ou xarope da casca do caule é utilizado no tratamento de gripes, tosses e bronquites. Industrialmente, a forma farmacêutica disponível é o xarope de cumaru (MAIA, 2004; AQUINO et al., 2005).

A *A. cearensis* demonstra resistência ou tolerância aos estresses por calor e seca, apresentando como estratégia de sobrevivência a rápida regeneração de suas estruturas aéreas tão logo surjam às primeiras chuvas, sendo estas características desejáveis do ponto de vista agrônomo e comum às espécies nativas da Caatinga.

O uso sustentável desta espécie implica na aquisição de conhecimento sobre os mecanismos básicos de germinação de suas sementes, dentre outros, visando multiplicação e produção agrônoma de modo a reduzir a extração não sustentável das estruturas ou eventualmente de toda a planta em seus habitats naturais, e promover benefícios socioeconômicos para o sustento de muitos (pequenos) agricultores da região.

3.1 ESTUDOS FITOQUÍMICO DA *AMBURANA CEARENSIS*

Estudos realizados por Leal e colaboradores (2003), visando descobrir uma fonte alternativa renovável e contribuir para a preservação da *A. cearensis*, demonstraram que há uma estreita semelhança química entre as plantas silvestre e a cultivada. Ao

analisar extratos hidroalcoólicos da casca do caule em ensaios farmacológicos verificou-se que alguns de seus constituintes químicos, demonstraram atividades analgésicas, broncodilatadora e antiinflamatória (LEAL et al., 2003).

As Leguminosas contêm vários compostos fenólicos aos quais são atribuídos propriedades antioxidantes naturais, tornando-os um importante grupo de compostos bioativos (LÓPEZ-AMORÓS et al., 2006). Por ser a *A. cearensis* uma leguminosa com fim medicinal, e devido a sua extensiva exploração faz-se necessário uma revisão do estudo fitoquímico desta espécie, pois, o conhecimento fitoquímico desta espécie, está praticamente restrito ao estudo dos constituintes químicos da casca do caule, em razão de ser esta parte utilizada medicinalmente (CANUTO et al., 2008).

O estudo fitoquímico da casca do caule de *A. cearensis* tem revelado uma elevada presença de cumarina (principal componente) e compostos fenólicos, sobretudo flavonóides como isocampferídio, o flavonóide majoritário; campferol; quercetina; 4'-metoxi-fisetina; afromosina; 7-hidroxi-8,4'-dimetoxi-isoflavona e os biflavonoídes amburanina, ácido protocatecuico e ácido vanílico; glicosídeos fenólicos, como amburosídeo A e B e esteróides glicosilados β -sitosterol e estigmasterol (LEAL et al., 2006).

A *A. cearensis*, apresenta atividade hepatoprotetora (LEAL, 2006) e neuroprotetora (LEAL et al., 2005) devido à presença do amburosídeo A, em razão de sua ação antioxidante enquanto que a ação broncodilatadora do isocampferídio-2 foi evidenciada pelo seu efeito relaxante muscular em traquéia de cobaias (LEAL et al., 2006).

Quimicamente (Figura 16), a casca do caule é constituída basicamente de cumarina (1), responsável pelo seu odor peculiar, dos flavonóides isocampferídio (6), campferol (7) e afromosina (5), quercetina (8), 4'-metoxi-fisetina (9) pelos glicosídeos fenólicos amburosídeos A (12) e B (13), dos ácidos fenólicos ácido vanílico (2) e ácido protocatecuico (3) ácido p-hidroxi-benzóico(4), ácido(E)-o-cumárico glicosilado(15) e do estereoisômero Z- do ácido o- cumárico glicosilado(16) além de quantidades abundantes de sacarose (14) e da mistura de β -sitosterol (10) e estigmasterol (11) (BRAVO et al.,1999; CANUTO, 2006 CANUTO, 2010). Em outros trabalhos, onde se analisou parte do caule, por essa ser a parte mais utilizada popularmente, (LEAL et al., 2003, 2005, 2006, 2008, 2009) revelaram que a cumarina (1), o isocampferídio (6) e o amburosídeo A (12) possuem efeitos

antinflamatório, antioxidante e broncodilatador, sendo indicados como princípios ativos da planta.

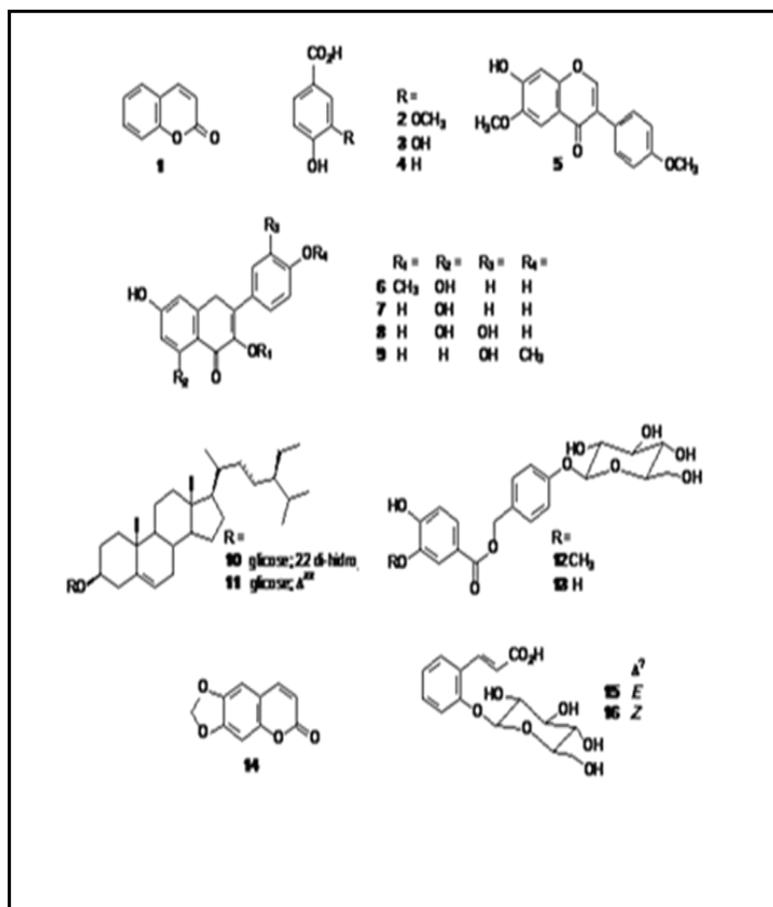


Figura 16 - Estruturas químicas da *Amburana cearensis*. Cumarina (1), Ácido vanílico (2), ácido protocateúico (3), ácido p-hidroxi-benzóico (4), afromosina (5), isocampferídio (6), campferol (7), quercetina (8), 4'-metoxi-fisetina (9), β-sitosterol (10), estigmasterol (11), amburosídeo A (12), amburosídeo B (13), sacarose(14), ácido (E)-o-cumarico glicosilado(15), Z-do ácido o-cumarico glicosilado(16). Fonte: (CANUTO, 2006, 2010)

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antioxidante, teores de fenóis totais e atividade de enzimas antioxidantes (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, catalase e superóxido dismutase), em sementes de *Amburana cearensis*, submetidas a estresse por restrição hídrica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar parâmetros bioquímicos de cotilédones descorticados de *A. cearensis* procedente da Caatinga submetidas à estresse por restrição hídrica;
2. Determinar atividade antioxidante em cotilédones descorticados de *A. cearensis*, durante a germinação em água e sob restrição hídrica;
3. Quantificar compostos fenólicos totais em sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica;
4. Verificar a correlação entre a concentração de fenóis totais com a medida da atividade antioxidante de extratos de sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica;
5. Avaliar a atividade e o perfil eletroforético de enzimas das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, catalase e superóxido dismutase, em sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica;
6. Validar o uso de marcadores bioquímicos/moleculares para avaliar estresse oxidativo e atividade antioxidante em sementes de *A. cearensis*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Biocompostos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (LBBB/ICS/UFBA).

5.1 AMOSTRA BIOLÓGICA

As sementes de *Amburana cearensis* (Fr. Allem) A.C. Smith, foram fornecidas pela Embrapa/Petrolina, sendo estas coletadas no ano de 2009. Quando recebidas às sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em refrigerador a 4° C, até o momento de sua utilização. O município de Petrolina situa-se no sertão de Pernambuco e possui uma área de 4.599 Km²(IBGE, 2009). O clima da região é do tipo Tropical Semiárido, a temperatura média anual é de 26°C, precipitação 535,5 mm e umidade relativa de 66% (EMBRAPA, 2009). A vegetação natural e predominante é a Caatinga.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES DE *A. CEARENSIS*

5.2.1 Teste de Germinação

As sementes passaram pelo processo de beneficiamento manual, visando retirar possíveis indivíduos que estivessem fora do padrão visual adotado para a realização dos ensaios. Para os experimentos, foram utilizadas 5 replicatas de 20 sementes de *A. cearensis*, totalizando 100 sementes que foram separadas aleatoriamente, por contagem manual. As sementes antes de serem colocadas para embeber, sofreram desponte do lado oposto ao hilo com o objetivo de garantir uma maior uniformidade de embebição na germinação, já que as estas sementes

possuem dormência. Os ensaios foram realizados em caixas do tipo gerbox, sendo o substrato entre papéis (germitest) umedecido com água destilada, na quantidade equivalente a 3 vezes o peso do substrato seco. As caixas foram colocadas em sacos plásticos transparentes e em seguida transferidas para a câmara de germinação tipo BOD, sem luz, a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, até que as sementes emitissem as radículas mais ou menos aos 9 dias. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

5.2.2 Morfometria das sementes

Para as análises morfométricas foram selecionadas 150 sementes (3 replicatas de 50 sementes de *A. cearensis*) aleatoriamente, onde foi medido a altura (medida do ápice à base), a largura e a espessura (região mediana) de cada semente com o auxílio de um paquímetro digital (Lee Tools- Electric Digital Caliper 6"). Foram verificadas dimensões de altura, largura e espessura em mm.

5.2.3 Umidade

Para a determinação do teor de água utilizou-se a metodologia sugerida em Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), onde as sementes foram colocadas em recipientes de alumínio medindo de 5 a 8 cm de altura e diâmetro de 6 cm previamente tarado e com peso de $4,5 \pm 0,5\text{g}$. A análise foi realizada em triplicatas. Em cada recipiente foi colocado 5 sementes, divididas em duas partes e a partir destas, obtido o peso inicial. Em seguidas as replicatas foram colocadas em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24h até atingirem o peso constante. Após 24 horas, os recipientes foram rapidamente tampados, colocados por 30 minutos em dessecador para que esfriassem, foram pesados e os valores obtidos foram utilizados para os cálculos da umidade empregando a fórmula que se segue:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{100(P - p)}{P - t}$$

Onde:

P = Peso Inicial (Peso do recipiente e sua tampa mais o peso da semente úmida)

p = Peso Final (Peso do recipiente e sua tampa, mais o peso da semente seca)

t = Tara (Peso do recipiente com sua tampa).

5.2.4 Peso de mil sementes

Utilizando um béquer, previamente tarado, fizeram-se pesagens de 10 repetições de 100 sementes (10x100) e o valor total foi somado para se obter o Peso de 1000 sementes.

5.2.5 Lipídeos Totais

Para extração e quantificação de lipídeos totais, a metodologia utilizada foi à proposta pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Realizou-se a pesagem de 15 gramas de sementes inteiras, em seguida com um gral e um pistilo, as sementes foram levemente trituradas. Com a amostra triturada, pesou-se novamente e a mesma foi levada para estufa de secagem a $105^{\circ}\text{C} \pm 1$, onde permaneceu por 24 horas. Decorridas às 24 horas em estufa, a amostra foi pesada novamente e levada para a extração dos lipídeos totais utilizando o aparelho de Soxhlet, e uso de 300 mL do solvente hexano PA. Para a obtenção dos lipídeos totais realizou-se 12 ciclos de extração. O extrato obtido foi coletado e colocado em frasco pequeno de vidro (previamente pesado) e colocados em capela de exaustão para a evaporação do solvente.

Através da fórmula: $P_1 - P_0$ foi calculado o teor de lipídeo total nas sementes

$$\text{Lipídeos totais} = P_1 - P_0$$

Onde:

P_1 = Peso do recipiente com amostra

P_0 = Peso do recipiente sem a amostra.

5.3 CURVA DE EMBEBIÇÃO EM SEMENTES

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com dez replicatas de 10 sementes por tratamento. Os tratamentos avaliados foram as sementes embebidas em água, as sementes embebidas em solução de Polietilenoglicol 8000 nos potenciais osmóticos de -1,2 e -1,4 MPa. Os períodos de avaliação totalizaram 168 horas, sendo 12 horas para as sementes submetidas a embebição em solução osmótica de PEG 8000 e para as sementes embebidas em água o período de avaliação, deu-se a cada 24 horas. Antes da montagem do teste, as sementes passaram por desinfestação superficial por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 10 minutos e sofreram escarificação do lado oposto ao hilo a fim de promover uma uniformidade na embebição das mesmas. Em seguida, foram dispostas em caixas gerbox tendo como substrato papel para germinação umedecido em água destilada em volume equivalente a três vezes o peso do substrato e incubadas em câmara tipo B.O.D. ajustada à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, na ausência de luz, de acordo com as recomendações de Brasil (2009). Após cada período de embebição, as sementes foram pesadas em balança de precisão para a elaboração da curva de embebição, sendo registrado além do peso, o número de sementes que emitiram a raiz, considerando-se este o parâmetro analisado.

5.4. PREPARO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três replicatas de 20 sementes por tratamento. Para cada tratamento foi delineado 4 (quatro) períodos de embebição e a semente sem embeber. Os períodos selecionados foram: sementes secas, consideradas 0 horas, 24, 48, 72 e 96h, para o

tratamento em água e os mesmos para o tratamento em Polietilenoglicol 8000 (PEG 8000), nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa. Os potenciais de PEG foram escolhidos baseados em trabalhos anteriormente realizados por Loureiro e colaboradores 2008, na perspectiva de se realizar um possível *screening* hídrico.

As sementes utilizadas no experimento passaram por desinfestação superficial por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 10 minutos, secas em papel toalha, escarificadas por desponte na região oposta ao hilo e dispostas uniformemente entre substrato composto por três folhas de papel de germinação (germitest) estéril em caixas gerbox embebidos com as devidas soluções 3 vezes o peso do substrato (BRASIL, 2009). Em seguida permaneceram em germinador ajustado à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ sem luz.

A parte vegetal coletada para este experimento foram os cotilédones, os quais passaram pelo processo de retirada dos tegumentos (descorticação).

Após a coleta, os cotilédones foram desidratados por imersão em nitrogênio líquido e triturados até atingir uma granulometria fina, pesados, e em seguida secos por 48 horas em liofilizador da marca Chemlab England, modelo SB5 usando bomba de vácuo da marca Speedivac, de modelo ED 100.

5.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Faz-se necessário ressaltar que, os cotilédones foram escolhidos como material vegetal para as análises bioquímicas, por ser o órgão da semente onde se encontra a maior quantidade das reservas, as quais serão mobilizadas durante o desenvolvimento germinativo da planta.

5.5.1 Preparo dos Extratos para Determinação do Teor de Fenóis Totais e Atividade Antioxidante

Os extratos foram preparados segundo Sousa e colaboradores (2007), entretanto, algumas modificações foram realizadas para ajuste de protocolo para análise de sementes, da espécie de trabalho, sendo descrito a seguir. Utilizou-se o processo de maceração, pesando-se 2 g da amostra para 10 mL de álcool metílico

(PA) a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, por duas vezes consecutivas. Cada extração foi realizada em 24 horas. Modificou-se o tempo de extração de 48 horas para 24 horas e o solvente utilizado. O rendimento dos extratos foi calculado usando-se a expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato}/\text{massa do material vegetal}) \times 100$.

O extrato obtido foi submetido ao processo de centrifugação por 10 min. a $13000 \times g$, a centrifuga utilizada foi a da marca Hettich Zentrifugen, de modelo Universal 320R. Após 24 horas, os extratos foram armazenados em potes de vidro com tampa e levados a capela de exaustão, onde permaneceram abertos (sem as tampas) para que o solvente fosse completamente evaporado. O pellet foi ressuspendido com mais 10 mL de álcool metílico PA, e repetido todo o processo de maceração.

5.5.1.1 Atividade Antioxidante – Método do Sequestro do Radical DPPH

A capacidade antioxidante do extrato metanólico dos cotilédones das sementes de *A. cearensis* foi avaliada, seguindo a metodologia proposta por Brand-Williams e colaboradores (1995), e adaptações realizadas por Sousa e colaboradores, 2007. Para realizar a quantificação da atividade antioxidante foi preparada uma solução estoque de DPPH com concentração de 120 mM, da qual foi retirada 2 mL de solução para obtenção de uma solução com a concentração final de 60 mM.

O extrato a ser analisado ($1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi preparado dissolvendo-se 0,010mg do extrato bruto, obtido a partir do processo de maceração em 10 mL de álcool metílico PA. Essa mistura foi agitada em agitador de tubos. Para a obtenção da solução de trabalho foi realizada a mistura de 2 mL de cada extrato final obtido com 4 mL de metanol PA, objetivando preparar uma solução com $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ a 60 mM, sendo esta a solução final de trabalho. A solução final de trabalho foi incubada por 30 minutos a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. Desta mistura foi retirado 1 mL da solução e feita a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 515 nm, em cubetas com capacidade para 1,5mL.

No experimento em questão foram preparadas soluções de trabalho com diferentes concentrações. Visando ajustes do protocolo utilizaram-se soluções de

trabalho contendo 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ de extrato. Após análise preliminar da atividade antioxidante foi definida 500 $\mu\text{g/mL}$ a concentração final para análise. Isso ocorreu por ter sido esta concentração a que melhor expressou valores em porcentagem (%) de atividade antioxidante para cotilédones de sementes de *A. cearensis*.

Em seguida, foram preparadas diluições para obtenção das concentrações para a realização da curva de calibração utilizando como padrão o ácido gálico. Para a realização da atividade antioxidante, utilizaram-se os valores expressos na Tabela 3 e como branco para a calibração do espectrofotômetro utilizou-se o álcool metílico.

Tabela 3 - Preparo da curva de calibração para determinação da atividade antioxidante.

Tubos Soluções (mL)	1	2	3	4	5	6	7
Concentração do ácido gálico	0	10	20	30	40	50	60
Solução de DPPH	0,00	0,85	1,65	2,50	3,35	4,15	5,00
Álcool metílico	5,00	4,15	3,35	2,50	1,65	0,85	0,00
Volume final	5						

5.5.1.2 Determinação do Teor de Fenóis Totais

Para quantificar os fenóis totais, utilizou-se a metodologia proposta por Folin – Ciocalteu (1927), adaptado por Sousa e colaboradores (2007). A partir dos extratos obtidos pelo processo de maceração, retirou-se 25mg e acrescentou-se 10 mL de álcool metílico PA. Esta primeira solução foi agitada em agitador de tubos até a dissolução completa da amostra. Em seguida, esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL e o seu volume aferido com álcool metílico PA para os 25 mL. Desta solução foi retirada uma alíquota de 7,5 mL, sendo esta transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e novamente esta solução foi avolumada para 10 mL com álcool metílico PA. Esta última solução foi à utilizada para a quantificação dos fenóis totais.

Retirou-se 100 μL desta última solução e adicionou-se 500 μL do reagente de FOLIN-CIOCALTEAU e 6 mL de água destilada. Agitada por 60 segundos, em agitador de tubos, e após agitação, acrescentou-se 2mL de Na_2CO_3 a 15%, e novamente agitada, por 30 segundos. Em seguida a solução foi incubada por 2

horas, ao abrigo da luz. A seguir, foram lidas as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 750nm. Como branco, utilizou-se o álcool metílico.

Tabela 4 - Preparo da curva de calibração para análise dos fenóis totais.

Tubos Soluções (µL/mL)	1	2	3	4	5	6	7
Concentração do Padrão	0	50	100	150	200	300	500
Ácido Gálico	0	250	500	750	1000	1500	2500
Água	5,00	4,75	4,50	4,25	4,00	3,50	2,50
Volume final	5						

5.5.2 Preparo dos Extratos e Quantificação das Proteínas Totais

As amostras após terem sido coletadas nos períodos determinados (0, 24, 48, 72 e 96 horas), foram desidratadas por imersão em nitrogênio líquido (N₂), trituradas em cadinhos com pistilos de porcelana até que adquirissem uma granulometria de pó fino. A extração de proteínas foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951) com intuito de se obter as amostras para a realização da atividade enzimática e dos perfis isoenzimáticos.

Nos tubos contendo as amostras, foi adicionada a solução tampão de extração Laemmli (1970). Estes tubos foram devidamente pesados, marcados e furados. Os mesmos, foram aquecidos em banho maria por 10 minutos. Em seguida os tubos contendo as amostras foram levados para uma centrífuga refrigerada (marca Hettich Zentrifugen, modelo Universal 320 R), onde passaram pelo processo de centrifugação nas condições de 14.000 x g por 15 minutos a 4° C. Após obtenção dos extratos, a concentração de proteínas totais foi determinada, pelo método de Bradford (1976), utilizando o Bio-Rad Protein Assay Kit II. Utilizou-se a solução de albumina bovina (BSA) como padrão. O BSA foi diluído em água bidestilada para a obtenção das várias concentrações, para o preparo da curva de calibração, como representado na Tabela 11 (Anexo A). A leitura das absorvâncias foi realizada no comprimento de onda de 595 nm.

5.5.3 Atividade Enzimática

Para a realização da atividade enzimática, foram utilizadas as mesmas partes botânicas que foram utilizadas para todos os outros ensaios – os cotilédones. Estes foram triturados na presença de nitrogênio líquido, e todas as precauções tomadas para evitar que houvesse desnaturação protéica. Após a trituração as amostras, foram levadas para a temperatura de -80°C , onde permaneceram até o momento de serem liofilizadas.

5.5.3.1 Preparo dos Extratos

Todos os extratos foram preparados seguindo-se as recomendações dos Kits enzimáticos para Catalase (CAT), Glutathione reductase (GR), Glutathione peroxidase (GPOX) e Superóxido dismutase (SOD). Utilizou-se como tampão extrator, o Tampão Fosfato salino (PBS), pH 7,3 composto de: NaCl ; KCl; KH_2PO_4 e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Pesou-se 0,2 gramas de cada amostra, em seguida todas foram mantidas no gelo onde permaneceram até o momento de serem centrifugadas a 4°C . A cada amostra foi adicionado 1 mL do tampão extrator, em seguida as amostras foram centrifugadas nas seguintes condições: 15 min, a $14000 \times g / 4^{\circ}\text{C}$. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos e imediatamente levados a temperatura de -20°C . O pellet, foi ressuspenso com 1 mL do tampão extrator. A seguir, foram realizadas alíquotas de $2 \times 500\mu\text{L}$ para a dosagem da atividade enzimática e $5 \times 50\mu\text{L}$ para a realização dos perfis eletroforéticos.

5.5.3.2. Determinação da Atividade Enzimática

As enzimas analisadas foram a Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPOX) e a Glutathione Redutase (GR).

Para a realização da determinação da atividade enzimática utilizou-se os kits específicos para cada enzima, sendo as dosagens realizadas pelo método Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), que é um teste quantitativo, simples, específico, sensível e que requer pequeno volume de amostra. Além disso, este teste exige procedimentos simples de extração se comparados aos métodos analíticos convencionais, permitindo o processamento de um grande número de amostras em um tempo relativamente curto.

Para a realização das análises das enzimas (SOD, CAT, GR e GPOX), foi homogeneizado 0,1 g da amostra em 1 mL do tampão do ensaio e centrifugadas a 10.000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e mantido em gelo. Para a realização da dosagem das enzimas, adicionou-se em cada poço 2 a 78 µL da amostra ou 1 a 10 µL da solução controle, sendo em seguida o volume ajustado para 78 µL com o tampão de análise. Em seguida foram adicionados 10 µL da solução de parada para a amostra de alto controle, a mistura foi incubada por 5 minutos a 25°C. As amostras foram diluídas até obter a concentração necessária para leitura das absorbâncias de acordo com a sensibilidade do espectrofotômetro utilizado. A diluição que foi realizada para todas as amostras antes da determinação enzimática foi de 4x menos que o da matriz.

5.5.3.3 Perfil Isoenzimático

Os perfis eletroforéticos foram realizados segundo Alfenas 2006, usando géis de poliacrilamida e as revelações foram específicas para cada enzima deste estudo.

5.5.3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

As enzimas envolvidas na eliminação das EROS ocorrem em diferentes compartimentos, havendo, portanto, diferentes isoenzimas.

O sistema utilizado foi PAGE, que se originou do inglês “*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”, ou seja, eletroforese em gel de poliacrilamida. Este sistema é

usado para análise do padrão de enzimas e outras proteínas nativas. A eletroforese foi realizada em sistema descontínuo, onde os íons tamponantes do gel são diferentes daqueles dos eletrodos (ALFENAS, 2006).

As corridas eletroforéticas foram conduzidas verticalmente sob condições não desnaturantes. Uma corrente contínua de 30 mA foi aplicada por 3 horas para cada enzima, sendo que para a CAT e para GPOX, a corrida foi a 4°C e para a SOD e GR a 25°C.

A concentração do gel de poliacrilamida variou a depender da enzima analisada. Para avaliação da CAT utilizou-se o gel empilhador de 4% e o gel de corrida de 7,5%; e para as demais enzimas GPOX, SOD, GR o gel empilhador foi de 4% e o gel de corrida de 12%. O tampão foi preparado de acordo com Laemmli (1970), sendo o Tris-glicina pH 8,9. Preparou-se uma solução estoque, composta por tris base (31,6 g), glicina (19,95 g) e água bidestilada (500 mL). Como esta solução foi feita para estoque, o pH ficou $9,2 \pm 0,2$. No momento de uso esta solução foi diluída na proporção de 1:10, após a diluição verificou-se o pH e este encontrava-se na faixa de 8,9. No anexo B, encontra-se o quadro com as soluções utilizadas.

5.5.3.3.2 Revelação

Para a revelação e avaliação das bandas das isoenzimas das enzimas antioxidantes (CAT, GPOX, SOD, GR) utilizou-se a metodologia sugerida por Alfenas (2006), sendo realizadas algumas modificações quando necessárias para adaptação do protocolo a enzima analisada.

5.5.3.3.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Nome sistemático: superóxido: superóxido oxidoreductase EC 1.15.1.1.

A revelação das bandas correspondentes a enzima Figura 30, (Anexo C) ocorre quando se aplica a riboflavina e esta por fotólise, busca um elétron para o O_2 , resultando o íon superóxido, O_2^- . Este íon vai atuar como redutor. O 3-4,5-

Dimetiltetrazólio (MTT) utilizado na solução A vai ser reduzido à respectiva formazana (ALFENAS, 2006).

A revelação ocorreu pelo sistema Tetrazólio, onde a solução A, composta de (tampão fosfato 50 mM, pH 7,5 mais 20 mg de MTT) foi aplicada ao gel após a eletroforese. O gel ficou incubado nesta primeira solução por 20 minutos ao abrigo da luz. Passado o período de incubação na solução A, o gel foi lavado rapidamente com água destilada e imerso na a solução B, composta de tampão fosfato 50 mM, pH 7,5 contendo 0,4 mL de tetrametil diaminoetileno - TEMED e 1mg de riboflavina, sob iluminação por 15 minutos ou até aparecerem as bandas acromáticas. Para paralisar a reação o gel foi lavado e colocado na solução de ácido acético durante 10 minutos tanto para corar, quanto para descorar. O gel foi lavado e fixado em solução aquosa de glicerol a 10%. As composições das soluções utilizadas neste procedimento encontram-se nos quadros no anexo D.

5.5.3.3.2 Glutaciona Redutase (GR)

Nome sistemático: NAD(P)H glutaciona oxidada oxidoredutase EC 1.6.4.2.

A reação de identificação Figura 31, (Anexo C) se dá quando GSH juntamente com o Ditiobis, que é um reagente apreciado para tióis; reagem e produzem GS-S-Ar e HSAr (ALFENAS, 2006). A revelação desta enzima ocorre utilizando a solução A, composta de tampão Tris 0,2M, pH 8,0; Na₂EDTA; Ditiobis; GSSG e NADPH. Os três primeiros reagentes foram misturados e aquecidos até que todo o soluto fosse dissolvido, em seguida a temperatura foi diminuída para 45 °C ± 2 e adicionado os dois últimos reagentes, e a solução B composta de suspensão de Agar e água destilada que também foi aquecida até o ponto de fervura, para que também todo o soluto fosse dissolvido, e em seguida esta teve a sua temperatura diminuída para 45 °C ± 2. O gel foi embebido nestas soluções e incubado ao abrigo da luz. As bandas aparecem num espaço de tempo variando de 1 (uma) a 2 (duas) horas.

5.5.3.3.2.3 Glutaciona Peroxidase (GPOX)

Nome sistemático: doador: peróxido de hidrogênio oxidorreductase EC 1.11.1.7

A reação ocorre quando o doador se junta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo um doador oxidado e duas moléculas de água ($2H_2O$) (ALFENAS, 2006).

A revelação Figura 32 (Anexo C) procedeu-se quando o doador Tetrametilbenzidina (TMBZ) reagiu com a solução denominada tampão acetato 0,1M, pH 4,5 e álcool metílico (MeOH), formando a solução A. Esta solução final foi aplicada ao gel da eletroforese, sendo em seguida incubado ao abrigo da luz, a temperatura de $30^\circ C \pm 1$, por 30 minutos. Após o período de incubação na solução A, foi adicionado ao gel à solução de peróxido de hidrogênio a 3% (H_2O_2 3%) denominada solução B, agitando bem, para homogeneização. As bandas apareceram em poucos minutos. Após o registro, o gel foi fixado em solução aquosa de glicerol 10%.

5.5.3.3.2.4 Catalase (CAT)

Nome sistemático: H_2O_2 : H_2O_2 oxidorreductase EC 1.11.1.6.

A revelação das bandas da catalase Figura 33, (Anexo C) ocorre em função da oxidação ou não do tiosulfato pelo peróxido de hidrogênio. Quando na ausência de catalase o tiosulfato é oxidado pelo H_2O_2 verificando-se, bandas incolores em fundo azul (coloração negativa). Na presença da catalase, o H_2O_2 é transformado enzimaticamente e o tiosulfato não será oxidado (ALFENAS, 2006). As composições das soluções utilizadas neste procedimento encontram-se nas tabelas no Anexo D.

Para a revelação da catalase foram preparadas duas soluções, A e B. A solução A continha tiosulfato de sódio 60 mM, e H_2O_2 a 3% e a solução B, foi preparada com iodeto de potássio 90 mM e ácido acético glacial. O gel foi incubado na solução A e permaneceu por 30 segundo, em seguida foi descartada esta solução e o gel embebido na solução B. A enzima catalase é uma enzima que por característica a sua revelação é fugaz.

5.5 ANÁLISES DOS DADOS

Após a finalização dos experimentos os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e regressão polinomial ao nível de probabilidade de 5%. Utilizou-se para este processamento de dados o programa SISVAR versão 5.0 (FERREIRA, 2000).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES

A caracterização do lote de sementes de *A. cearensis* foi realizada através de análises físico-químicas e ensaios fisiológicos. As sementes apresentaram 96% de germinabilidade, valor médio de 428,9g de peso em mil sementes e 9,23% de umidade. A umidade determinada para esta amostra foi superior ao encontrado por Mendes e colaboradores (2007) que foi de 7,45% quando analisadas sob as mesmas condições de trabalho.

A extração e quantificação dos lipídeos totais (27,4%) demonstraram valor inferior ao da semente de outras leguminosas em resultados obtidos por Abdalla e colaboradores (2008) tais como *Arachis hypogaea* (amendoim), que apresentou valor (49%) de lipídeos totais. As diferenças encontradas nos valores, além de outras pode estar relacionada com a metodologia utilizada em ambos os trabalhos.

Para complementar a caracterização do lote foi realizada a morfometria das sementes e os resultados obtidos, descritos na Tabela 5, estão de acordo com os resultados obtidos por Mendes e colaboradores (2007) que avaliaram as sementes de *A. cearensis* e descreveram médias de 14,4 mm para a altura, 10,4 mm para a largura e 4,7 mm de espessura. Cunha e colaboradores (2003), também encontraram valores semelhantes aos verificados neste trabalho para a altura, largura e espessura das sementes, que variaram entre 12,55mm a 17 mm altura, 10,50mm; 8,35mm a 11,50mm largura, e ainda 1,25 mm a 3,10mm espessura, respectivamente.

Tabela 5 - Análise biométrica das sementes de *Amburana cearensis*.

	Altura	Largura	Espessura
Valor médio (mm)	14,41 ± 0,07	10,23 ± 0,09	4,63 ± 0,05
Coefficiente de variação (%)	9,36	8,16	8,93

Os resultados dos ensaios fisiológicos, realizados com o lote das sementes de *A. cearensis* indicaram sementes adequadas à realização dos experimentos, com 96% de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) de 5,17 sementes. dia^{-1} e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de 1,8 dias $^{-2}$, obtendo-se um lote com boa viabilidade, quando comparados aos dados obtidos por Guedes et al., (2008), quando avaliaram o índice de velocidade de germinação das sementes de *A. cearensis* submetidas a diferentes substratos, nos quais foram registrados valores entre 0,00 a 1,55 sementes. dia^{-1} nas mesmas condições.

6.2 CURVA DE EMBEBIÇÃO

Verificou-se diferença entre as curvas para as sementes submetidas a embebição em água e em polietilenoglicol 8000 nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa. Analisando-se a curva de embebição em água das sementes verificou-se o padrão trifásico de acordo com o modelo proposto por Bewley e Black (1994). Para estas sementes de *A. cearensis* a Fase I foi registrada entre os períodos de 0 a 48 horas, tendo as sementes aumentadas em 62,31% do seu peso inicial. Esta Fase é caracterizada pela rápida absorção de água, e ocorre como consequência do potencial matricial dos vários tecidos da semente, resultando em um significativo aumento no peso das mesmas (Figura 17). A curva de embebição foi realizada, no intuito de se obter os períodos para a realização das coletas, que seriam utilizadas para as análises bioquímicas.

Albuquerque e colaboradores (2009), estudando a atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Bowdichia virgilioides* puderam verificar que Fase I do processo de embebição ocorreu nas primeiras 20 horas. Se comparada à curva de embebição desta espécie também pertencente à família leguminosae como a *A. cearensis*, é possível afirmar que a Fase I para as sementes analisadas foi

relativamente longa. No entanto, este resultado pode ser atribuído à forma pela qual as sementes de ambas as espécies passaram pelo processo de escarificação. As sementes de *B. virgilioides* sofreram escarificação química com ácido sulfúrico, tendo toda a camada superficial do seu tegumento retirada, já as sementes de *A. cearensis* analisadas sofreram desponte ao lado oposto do hilo. Portanto, estas diferenças na velocidade de embebição podem ser atribuídas ao fato de serem espécies distintas, porém da mesma família, como também ao tamanho da superfície de contato entre as sementes e o substrato, como descrito por Carvalho e Nakagawa, (2000).

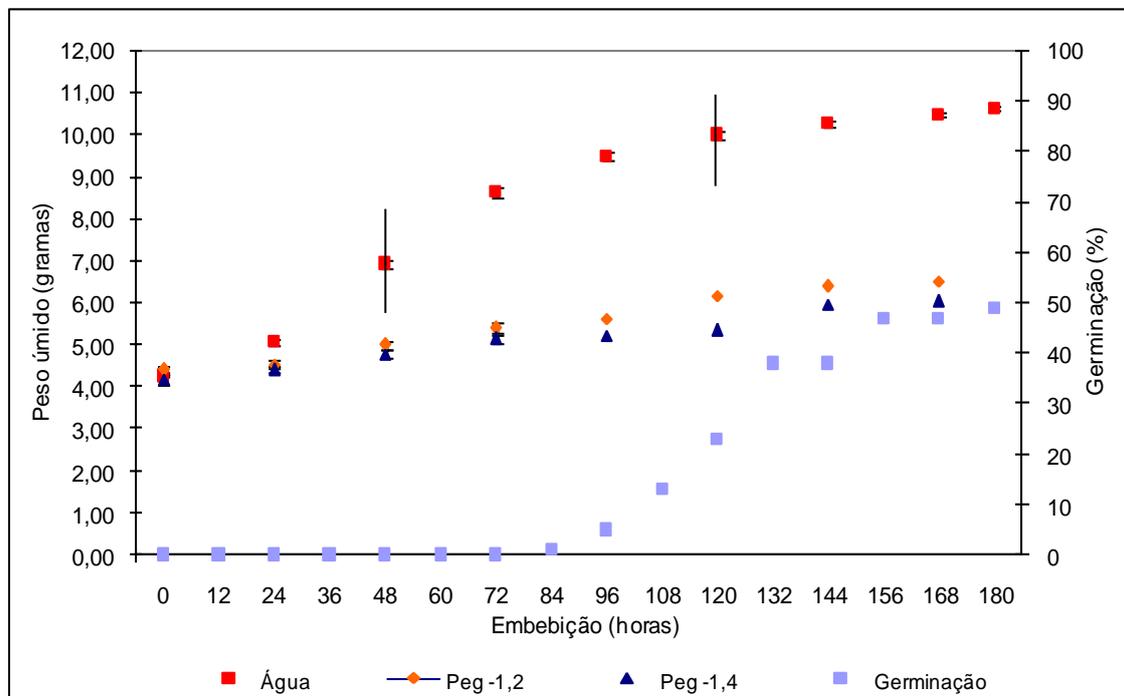


Figura 17 - Curva de embebição e germinação de sementes de *Amburana cearensis*.

De acordo com Seiffert (2003), este rápido ganho de umidade verificado na Fase I em relação às outras Fases se deve, provavelmente, à presença de matrizes hidrofílicas, como proteínas. Marcos Filho (2005) descreveu que, nessa Fase surgem os primeiros sinais da reativação do metabolismo, com aumento acentuado da atividade respiratória, liberação de energia para a germinação e ativação de enzimas.

No período compreendido entre 48 a 96 horas verificou-se a Fase II, na qual a absorção de água se deu mais lentamente, com um pequeno aumento no peso das sementes (Figura 17A). De acordo com Bewley e Black (1994), é necessária

uma diminuição da absorção de água para a mobilização das substâncias que foram metabolizadas na Fase I da região de reserva para os tecidos meristemáticos.

As sementes submetidas à embebição em PEG 8000 apresentaram um retardamento no processo de embebição, no entanto, pela quantidade de água absorvida pelas mesmas, durante todo o processo, pode-se concluir que não atingiram a Fase II do processo de embebição, portanto, a solução de Polietilenoglicol 8000, nas concentrações utilizadas (potenciais de -1,2 e -1,4 MPa) promoveram uma severa restrição hídrica e estresse as sementes de *A. cearensis*.

Para atingir o início da Fase II (48 horas de embebição) as sementes de *A. cearensis* embebidas em água aumentaram 62,31% do seu peso inicial, já as sementes submetidas à restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa atingiram respectivamente 47,54% e 44,03 % do seu peso inicial ao final das 180 horas de embebição sendo, portanto, impedidas de continuarem o processo germinativo.

Já a Fase III, na qual ocorre a protrusão da raiz primária, foi verificada a partir das 96 horas de embebição, caracterizando-se assim a germinação das sementes de *A. cearensis*, apesar destas sementes terem iniciado a sua germinação a partir das 96 horas de embebição, neste período apresentaram somente 5% de germinação.

Assim é possível confirmar que a água é um fator limitante de maior significância para sobrevivência e crescimento inicial de plantas e que neste caso, os potenciais utilizados afetaram a germinação provocando atraso no início do processo e restrição hídrica.

6.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

6.3.1 Atividade antioxidante – Método sequestro do radical DPPH

Para a análise da atividade antioxidante utilizou-se a capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila (DPPH), esta técnica foi escolhida por se tratar de uma metodologia simples, rápida e sensível. Na Figura 18 está demonstrando a reação que ocorreu durante o processo,

na figura da esquerda se tem a estrutura do radical DPPH antes de reagir com antioxidante e na direita depois da reação do radical com antioxidante.

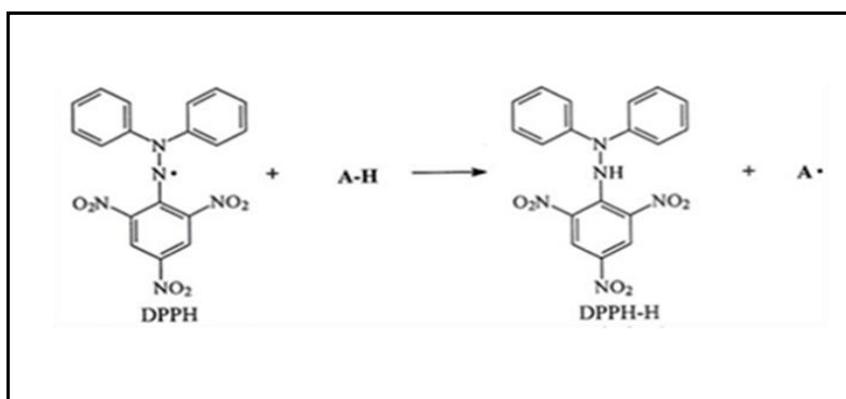


Figura 18 - Estrutura do DPPH antes e depois da reação com o antioxidante (AH) Fonte: grupiv. wordpress.com (2009)

Ao determinar a atividade antioxidante das sementes de *A. cearensis* após a embebição em água e em polietilenoglicol nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa, através do método de sequestro do radical DPPH, verificou-se, que a concentração de $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extrato, foi a mais adequada para análise da atividade antioxidante da espécie em estudo tendo em vista os valores de atividade antioxidante apresentados pelas sementes secas, durante a germinação e quando da embebição nos dois potenciais de Polietilenoglicol utilizados (Figura 19). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante, pois não foi possível realizar o cálculo do EC_{50} que corresponde à quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

Estudos realizados por Sousa e colaboradores (2007), em cascas e folhas de cinco plantas medicinais (*Terminalia brasiliensis* Camb. *Terminalia fagifolia* Mart. Et Zucc, *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var *acuminata* Teles Freire, *Qualea grandiflora* Mart. e *Copernicia prunifera* (Miller) H.E.Moore a quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial do DPPH variou de $27,59$ a $111,14\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, diferiu do valor utilizado neste trabalho. Os valores de atividade antioxidante (Figura 19) variou entre 6,21% (semente seca) a 10,02 % (96 horas em PEG -1,2 MPa), diminuindo para 7,49 e 2,99%, no período de 96 horas em PEG -1,4 MPa e durante a germinação em água.

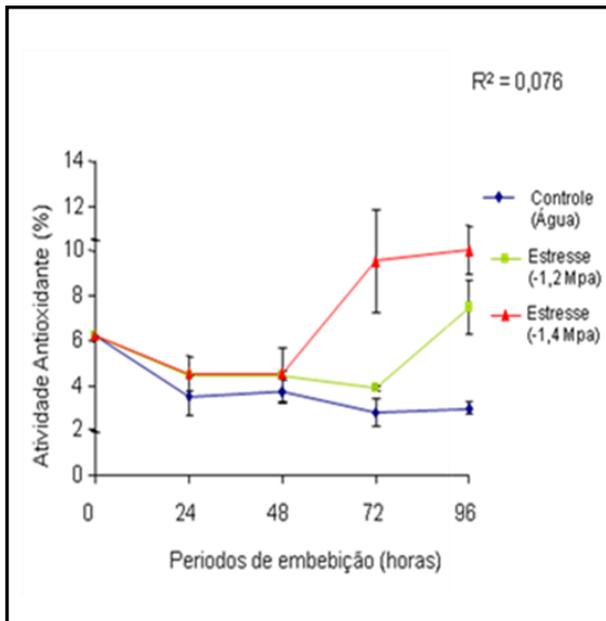


Figura 19 - Atividade antioxidante em sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.

Sousa e colaboradores (2007) descreveram que a atividade antioxidante das cascas e folhas analisadas variou de 27,59 a 111,14 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Estes resultados diferem dos obtidos no presente trabalho, pois, as análises realizadas pelos autores, apresentaram um $\text{EC}_{50} > 50\%$, enquanto que, neste estudo, o EC_{50} não pode ser calculado devido à baixa atividade antioxidante apresentada pelas sementes de *A. cearensis* e quando as sementes foram embebidas em água a atividade antioxidante diminuiu de 6,21%, (sementes secas), para 3,51 e 2,81 % nos períodos de 24 a 48 horas respectivamente sendo este valor reduzido ainda mais nos períodos de 72 e um discreto aumento em 96 horas para 2, 81 e 2,99%. Porém ressalta-se que as condições analisadas nos dois experimentos são diferenciadas, desde a utilização do solvente de extração, as partes botânicas analisadas.

No tratamento em PEG 8000 a -1,2 MPa a relação estabelecida entre as sementes embebidas e as sementes sem embeber foi menor, tendo diminuído de 6,21%, nas sementes sem embeber, para 4,40 e 4,54 % nos períodos de 24 e 48 horas; o valor reduziu para 3,87% em 72 horas e voltou a aumentar em 96 horas para 7,49% de atividade antioxidante. Nestes resultados observa-se que o estresse hídrico provocado por este potencial, promoveu também um estresse oxidativo e que nesta espécie pode ser combatido através do aumento na biossíntese de

biomoléculas com potencial antioxidante que atuaram assim, na diminuição deste tipo de estresse.

Contudo, foi possível verificar no tratamento onde as sementes foram embebidas em PEG 8000 a -1,4 MPa que a atividade antioxidante das sementes sem embeber, reduziu de 6,21 para 4,52 % em 24 horas e para 4,48% em 48 horas de embebição, enquanto que em 72 horas e 96 horas a atividade antioxidante voltou a aumentar para 9,53 e 10,02 % respectivamente.

Essas alterações de valores podem estar relacionadas a diversos fatores influenciadores desta atividade nas sementes de *A. cearensis*. Um deles pode ser devido à espécie em estudo ser uma espécie florestal. O outro pode ser o descrito por López - Amorós e colaboradores (2007), para outra espécie, onde relataram que após um período de germinação de quatro e seis dias, sementes de feijão apresentaram maior atividade antioxidante do que as sementes antes da germinação, como os resultados obtidos para *A. cearensis*.

Fatores como o tempo e luz parecem influenciar a produção de compostos com atividade antioxidante e nestes estudos verificou-se que os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos após seis dias de embebição e na ausência de luz. Analisado os resultados obtidos para as ervilhas, o aumento da germinação, aumentou a ação antioxidante desde o início da embebição, sendo que este aumento foi mais significativo após quatro dias de embebição e na presença da luz, resultados diferentes dos obtidos com *A. cearensis* quando da germinação em água.

Estes autores também demonstraram que a germinação modificou a capacidade antioxidante de lentilhas em um sentido negativo, uma vez que as sementes de lentilha antes da germinação apresentaram maiores valores de atividade antioxidante do que quando submetidas ao processo de germinação. Resultados semelhantes aos obtidos com *A. cearensis*, pois se pode verificar que durante a germinação há uma diminuição da atividade antioxidante em mais de 50%, entretanto, com a restrição hídrica houve um aumento desta atividade de 6,21% para 7,49% e 10,02% quando da embebição em PEG -1,2 e -1,4 MPa respectivamente. Isto ocorreu, pois nestes potenciais não houve germinação e as sementes não passaram da Fase I da curva de embebição, apesar do aumento da atividade antioxidante.

Oliveira e colaboradores (2009) apresentaram uma ampla revisão bibliográfica da capacidade antioxidante de vários produtos, inclusive de sementes,

demonstrando que as mesmas são fontes alternativas naturais de antioxidantes, como as sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-fradinho), onde todos os extratos estudados apresentaram atividade antioxidante, superiores ao do presente estudo, variando de 74,3 a 84,6%.

Bulbovas e colaboradores (2005) avaliando a variação sazonal de antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* (pau brasil) encontraram atividade antioxidante elevada. Os autores verificaram ainda que as variações nos valores de atividade antioxidante nessa planta ocorreram em resposta às variações sazonais nos fatores do ambiente monitorado.

6.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Ao analisar a Figura 20, verifica-se que há uma maior concentração de fenóis totais nas sementes que não passaram pelo processo de embebição devido ao estresse hídrico, com um ligeiro decréscimo entre 24 e 48 horas, e um aumento mínimo em 72 e 96 horas de embebição, quando comparado com as sementes secas. Entretanto, a análise dos resultados permite inferir, que não há diferença significativa $p < 5\%$, entre os teores de fenóis totais durante a germinação em água e em sementes secas da *A. cearensis*.

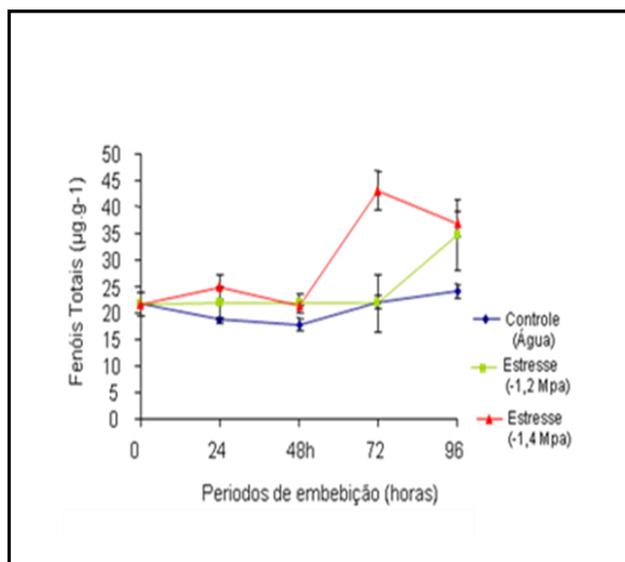


Figura 20 - Análise do conteúdo de fenóis totais nas sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.

Os resultados obtidos com as amostras após os tratamentos em PEG -1,2 e PEG -1,4 MPa, pode-se verificar que o estresse hídrico induzido promove alteração na composição de compostos fenólicos, pois, os resultados foram aumentados frente à germinação em água. Em PEG -1,2 MPa há uma aumento significativo, no conteúdo de fenóis totais no período entre 72 horas e 96 horas ($34,75 \mu\text{g.g}^{-1}$), e para PEG -1,4 MPa o aumento foi de 48 para 72 horas ($43,03 \mu\text{g.g}^{-1}$), sendo que o teor de compostos fenólicos em 96 horas não difere significativamente nos dois potenciais com 5% de probabilidade. Entretanto, o comportamento para a atividade antioxidante é diferente nos dois potenciais, sendo que em PEG -1,2 MPa a tendência da curva se assemelha ao da germinação em água, pois a porcentagem de atividade antioxidante diminui de 0 a 24 horas, tendo um ligeiro aumento em 48 horas e diminuindo a partir deste período até 96 horas, onde pôde-se verificar uma média de variação de 6,21 para 2,99 % de atividade antioxidante.

Portanto, os resultados verificados quando do tratamento em PEG -1,4 MPa diferem dos resultados obtidos com PEG -1,2 MPa, sendo que em PEG -1,4 MPa o período no qual se verificou um aumento no teor de fenóis totais foi em 72 horas com $43,030 \mu\text{g.g}^{-1}$, diminuindo com 96 horas para valores muito próximos aos verificados com PEG -1,2 MPa, enquanto que para a atividade antioxidante, manteve o perfil semelhante ao tratamento com PEG -1,4 MPa, onde a porcentagem

de atividade antioxidante variou de 4,52 em 24 horas para 10,02 % em 96 horas. Assim a falta de água para que as sementes germinem promove um estresse oxidativo, e a partir deste são produzidas biomoléculas que não são compostos fenólicos para fazer frente a este estresse, principalmente na restrição hídrica como a verificada em PEG -1,4 MPa.

A análise estatística aplicada para a análise dos dados foi o teste ANAVA, onde este demonstrou que houve significância estatística com 5% de probabilidade, entre a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais, a depender dos tratamentos como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para análise da atividade antioxidante e do teor de fenóis totais entre os períodos de embebição das sementes de *A. cearensis* em água.

Períodos de embebição (Horas)	GL	Quadrado médio	
		Atividade Antioxidante	Compostos Fenólicos
0		0,000	0,000
24		0,906 ^{n.s}	29,431*
48	2	0,554 ^{n.s}	14,869*
72		39,107*	445,733 ^{ns}
96		37,966*	140,340 ^{ns}
Erro	6		

*significativo a 5%, ^{n.s} não significativo.

Verificou-se a ocorrência de uma correlação negativa $R^2 = -0,076$, com índice de confiança variando entre 0,90 a 0,86 entre a atividade antioxidante analisada e o teor de fenóis totais em *A. cearensis* nas primeiras 48 horas de embebição em água e uma correlação inversa (ou diferente) a partir deste período, pois, a concentração de compostos fenólicos aumentou, enquanto, quase não houve variação na porcentagem de atividade antioxidante neste tratamento (Figura 19).

Após a análise estatística de correlação entre os dados obtidos da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos, verificou-se que não há uma relação direta entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante durante a restrição hídrica em PEG -1,4 MPa.

Na Tabela 7, encontram-se os resultados obtidos quanto a atividade antioxidante quando comparada com o conteúdo de fenóis totais após a realização do teste estatístico ANAVA, para os tratamentos aos quais as sementes de *A. cearensis* foram submetidas. Verificou-se que nos tratamentos em água e em PEG -1,4 MPa, houve diferença significativa, enquanto que para o tratamento em PEG –

1,2 MPa, não foi verificada diferença estatística, para a atividade antioxidante em relação aos conteúdos de fenóis totais.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para atividade antioxidante e teor de fenóis totais dos cotilédones de sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.

Potencial osmótico (MPa)	GL	Quadrado médio	
		Atividade Antioxidante	Compostos Fenólicos
0,0		5.608 ^{ns}	20.019*
-1,2	4	6.805 ^{ns}	101.098 ^{ns}
-1,4		21.452 ^{ns}	288.767*
Erro	10		

*significativo a 5%, ^{ns} não significativo.

Os resultados deste estudo diferem dos dados apresentados por Sousa e colaboradores (2007), em ensaios com folhas de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae - Caesalpinioideae), onde encontraram valores para fenóis totais e atividade antioxidante de 66,14 mg.g (peso seco) e 78,45 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Isto pode ser explicado por se tratar de espécies e partes botânicas diferentes. Entretanto, é possível verificar a maior ação antioxidante demonstrada pela atividade captadora de radical verificada nesta amostra, sugerindo assim, que há uma relação direta entre fenóis totais e atividade antioxidante neste estudo, enquanto que no estudo realizado com *A. cearensis*, encontrou-se 21,61 mg.g (peso seco) e 6,21% para fenóis totais e atividade antioxidante respectivamente em sementes secas e submetidas a estresse hídrico. Portanto, é possível afirmar que em sementes de *A. cearensis*, a atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos não são elevados, mesmo quando as sementes são submetidas a estresse abiótico (hídrico), diferentemente do demonstrado em outros trabalhos, como os de Leal (2006), em que, foi verificada uma alta atividade antioxidante, a partir das cascas do caule da *A. cearensis*. Entretanto, ressalta-se que este resultado, quando comparado com o valor verificado nas sementes secas, é superior em mais de 50% com a restrição hídrica causada em PEG a -1,4 MPa e de 20% em PEG -1,2 MPa. Isto, realmente pode estar relacionado com estresse hídrico pelo qual as sementes de *A. cearensis* foram submetidas neste trabalho. Assim, pode-se afirmar ao analisar os dados, que quanto maior o estresse hídrico, maior será a o estresse oxidativo e assim maior será a atividade antioxidante em sementes de *A. cearensis*.

A relação entre o teor de fenóis totais e a capacidade de sequestrar radicais livres pode sim estar correlacionada, visto que na literatura encontra-se abundância

de trabalhos relatando essa discussão. Porém as informações são bastante contraditórias. A correlação entre fenóis totais e a capacidade antioxidante pode depender do método escolhido e também das características hidrofóbicas ou hidrofílicas do sistema teste e dos antioxidantes testados (ROESLER et al., 2007).

Segundo Roesler e colaboradores (2007), outros compostos como ácido ascórbico e carotenóides, mesmo quando não mensurados, podem estar presentes nos extratos estudados e contribuir para o potencial antioxidante dos extratos. Isto faz validar a suposição de que nem sempre o teor de fenóis totais esta relacionado com a atividade antioxidante. Esta resposta pode ser atestada por este trabalho, ao se analisar os valores expressos na Tabela 8.

Tabela 8 - Teor de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante (AA) dos cotilédones de sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000 em diferentes períodos de embebição (0, 24, 48, 72, 84 e 96 horas).

AMOSTRAS (horas)	FT (mg de EAG/g extrato MeOH ± DP)			Atividade Antioxidante (%)		
	Água	PEG -1,2	PEG -1,4	Água	PEG -1,2	PEG -1,4
0	21,61 ± 3,5	21,61 ± 3,5	21,61 ± 3,5	6,21 ± 7,5	6,21 ± 7,5	6,21 ± 7,5
24	18,59 ± 1,3	21,82 ± 5,2	24,85 ± 4,2	3,51 ± 1,6	4,40 ± 2,7	4,52 ± 1,3
48	17,78 ± 1,9	21,82 ± 3,0	21,41 ± 1,9	3,77 ± 1,0	4,54 ± 2,1	4,48 ± 0,4
72	22,02 ± 2,1	21,82 ± 9,5	43,03 ± 6,6	2,81 ± 1,1	3,87 ± 0,2	9,53 ± 4,1
96	24,04 ± 2,3	34,75 ± 11,4	36,77 ± 3,9	2,99 ± 0,5	7,49 ± 2,1	10,02 ± 1,9

6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Igualmente ao teste aplicado para análise dos compostos fenólicos e atividade antioxidante, para a análise das enzimas antioxidante utilizou-se o teste comparativo ANAVA, onde na Tabela 9, encontra-se o resumo da atividade das enzimas analisadas durante os períodos de embebição. Verificou-se que a partir de 48 horas as enzimas SOD e GR, apresentaram atividade enzimática significativa em relação à GPOX com 5% de probabilidade. Já com 72 horas, foi verificada uma atividade enzimática significativa da enzima SOD, em relação às enzimas GR e GPOX.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância quanto a atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD), Glutaciona Peroxidase (GPOX) e Glutaciona Redutase (GR) de cotilédones de sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água, em diferentes períodos de embebição (0, 24, 48, 72, 84 e 96 horas).

Períodos de	GL	Quadrado médio
-------------	----	----------------

embebição (Horas)		Enzimas		
		SOD	GPOX	GR
0		0, 000	0, 000	0, 000
24		8.162,029 ^{ns}	279.902.913,815 ^{ns}	7,105 ^{ns}
48	2	30.950,780*	399.238.685,311 ^{ns}	13, 779 *
72		649.275,420*	2,735E+0010 ^{ns}	19, 632 ^{ns}
96		769.689,244 ^{ns}	5,918E+0010 ^{ns}	2,087 ^{ns}
Erro	3			

*significativo a 5%, ^{ns} não significativo.

Analisando os tratamentos de embebição que as sementes foram submetidas, pode-se verificar que a atividade da enzima SOD, foi significativamente aumentada no tratamento em PEG -1,4 MPa; já o aumento da atividade da enzima GPOX foi significativa nos tratamentos em água e em PEG -1,4 MPa e por fim a enzima GR teve sua atividade aumentada nos potenciais em PEG -1,2 e -1,4 MPa. Estes resultados podem ser verificados na Tabela 10, no resumo da análise estatística realizada.

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para a atividade enzimática de Superóxido Dismutase (SOD), Glutaciona Peroxidase (GPOX) e Glutaciona Redutase (GR) dos cotilédones de sementes de *A. cearensis* durante a embebição em água e sob restrição hídrica nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa em PEG 8000.

Potencial osmótico (MPa)	GL	Quadrado médio		
		Enzimas		
		SOD	GPOX	GR
0,0		25.690,181 ^{ns}	145.504.831,901*	2.571 ^{ns}
-1,2	4	424.666,013 ^{ns}	4.622 E+0009 ^{ns}	23.874*
-1,4		642.818,013*	4.291 E+0010 *	33.828*
Erro	5			

*significativo a 5%, ^{ns} não significativo.

Algumas espécies de plantas são capazes de tolerar baixo teor de água nos tecidos da planta, apresentando crescimento e manutenção dos processos metabólicos, mesmo sob déficit hídrico celular (MCCANN; HUANG, 2008) enquanto outras não, como foi verificado nos experimentos realizados com as sementes de *A. cearensis*. As respostas das plantas ao estresse hídrico é altamente complexa, envolvendo alterações deletérias e/ou adaptativas. As primeiras respostas das plantas ao estresse hídrico geralmente ajudam a planta a sobreviver por algum tempo, enquanto a aclimação das plantas submetidas à seca é indicada pelo acúmulo de certos metabólitos novos associados com as capacidades estruturais

para melhorar o funcionamento das plantas sob estresse hídrico (REDDY et al., 2004).

Enzima Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase apresenta-se como a primeira enzima na linha de defesa contra EROS causadas por estresses ambientais como a seca. Com o aumento transitório na atividade da SOD verificou-se tolerância ao estresse (ZHANG et al, 2005; GRATÃO et al., 2005; FOYER; NOCTOR, 2000). No entanto, vários autores relataram atividade inalterada (LUNA et al, 1985; MORAN et al, 1994), um aumento, (LUNA et al., 1985; TEZARA; LAWLOR, 1995; ZHANG, H. et al., 2004) e diminuição (QUARTACCI; NAVARI-IZZO, 1992; ZHANG, H. et al., 2004) na atividade da SOD.

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da atividade da enzima superóxido dismutase em cotilédones de sementes submetidas aos tratamentos em água, PEG -1,2 e PEG -1,4 MPa (Figura 21), é possível verificar que há diferenças no perfil enzimático e na atividade enzimática frente a cada tratamento realizado. Os resultados da atividade da SOD em sementes de *A. cearensis*, sob estresse hídrico, diferem parcialmente do descrito por vários autores que afirmam que, a atividade desta enzima antioxidante aumenta nas células como resposta ao estresse abiótico, pois, as enzimas são muito importantes como mecanismo de defesa durante o estresse oxidativo (CAKMAK, 2000; FOYER, 2001; JIANG; HUANG, 2001; BLOKHINA et al., 2003; HABIBI et al., 2004). Apesar de haver uma ligeira diminuição da atividade enzimática entre as 24 e 48 horas nos tratamentos com restrição hídrica em PEG -1,2 MPa ($1.087,00 \pm 27,15$ unidades.mL⁻¹) quando comparado com a germinação em água ($1.007,90 \pm 265,44$ unidades.mL⁻¹) o mesmo não ocorre com o tratamento em PEG -1,4 MPa ($1.018,85 \pm 75,02$ unidades. mL⁻¹), que foi muito mais acentuado. Diante do exposto, nota-se a importância desta enzima no processo de defesa durante o estresse submetido, porém, não necessariamente, dando uma resposta somente de aumento e sim de diminuição como ocorreu entre 48 e 72 horas, sob restrição hídrica. Vê-se que, em algumas situações a enzima responde ao estresse de forma negativa, sendo contudo, benéfica ao processo que esta participando.

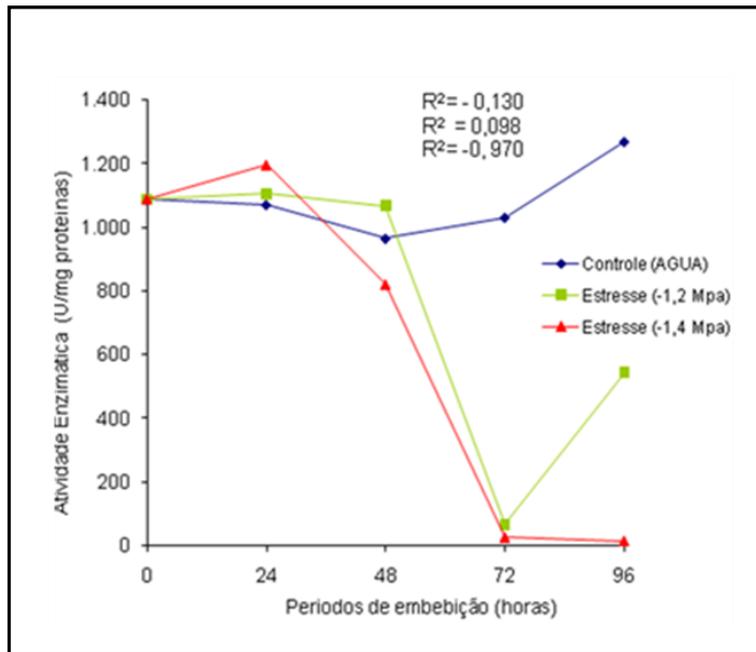


Figura 21 - Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) de cotilédones de sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica em PEG -1,2 e -1,4 MPa, em diferentes períodos de embebição (0, 24, 48, 72, 84 e 96 horas).

As análises estatísticas de correlação entre os tratamentos utilizados, demonstraram que somente o tratamento em PEG -1,4 MPa, apresentou uma diferença significativa quando comparada com embebição em água, com $p = 0,027$. Entretanto, verifica-se que até 48 horas fase correspondente a maior embebição de água, não há diferença significativa em termos de atividade enzimática para a germinação em água e PEG -1,2 MPa. Além disso, verificou-se diferenças entre os dois tratamentos de indução ao estresse hídrico. A atividade enzimática diminuiu em 72 e 96 horas quando do uso de PEG -1,4 MPa enquanto que, o potencial de -1,2 MPa, a atividade enzimática aumentou em 96 horas em valores muito inferiores quando comparado com o perfil de atividade enzimática durante a germinação em água. Sendo assim, esta enzima pode ser utilizada como um marcador bioquímico para avaliação de estresse hídrico e atividade antioxidante em sementes de *A. cearensis*.

Estes resultados também diferem parcialmente de Bailly e colaboradores (2000), que descreveram que a atividade de Superóxido Dismutase aumentou em sementes de girassol, outra espécie, submetidas a estresse.

No tratamento com as sementes de *A. cearensis* embebidas em água, verificou-se que a atividade da enzima foi elevada, entretanto, a diminuição da atividade não foi acentuada, apesar de haver uma alteração no período de 24 horas, reduzindo esta atividade até o período de 48 horas, fase em que a semente está em processo de embebição. Este aumento é retomado com 72 e 96 horas quando ocorre a reativação do metabolismo e aumento de radicais livre e peróxidos, em função da atividade e do metabolismo celular. No tratamento em que as sementes foram embebidas em PEG -1,2 MPa, e nas sementes não embebidas a atividade da enzima foi pouco afetada até o período de 48 horas, e foi nítida a redução da atividade até 72 horas, daí a atividade voltou a ter um leve aumento no período de 96 horas, demonstrando que está ocorrendo um estresse oxidativo e que o aumento da atividade da SOD, é para fazer frente a não absorção de água e as alterações no metabolismo normal. Comparando com o comportamento da enzima no tratamento com PEG -1,4 MPa, este foi semelhante, entretanto, os valores da atividade foram mais afetados, o que comprova o quanto a restrição hídrica afetou o metabolismo da semente e promoveu a diminuição da biossíntese e/ou da atividade desta enzima.

Ao analisar o perfil eletroforético da SOD em sementes embebidas em água verificou-se que nos cotilédones de semente de *A. cearensis* podem ser encontradas seis isoenzimas com pesos moleculares diferentes variando entre 26 KDa a aproximadamente 181,8 KDa (Figura 22), sendo que as concentrações destas isoenzimas variaram em função da fase de germinação em que a semente se encontrava. O mesmo pode ser analisado quando as sementes de *A. cearensis* foram submetidas a estresse hídrico em e em PEG -1,2 MPa.

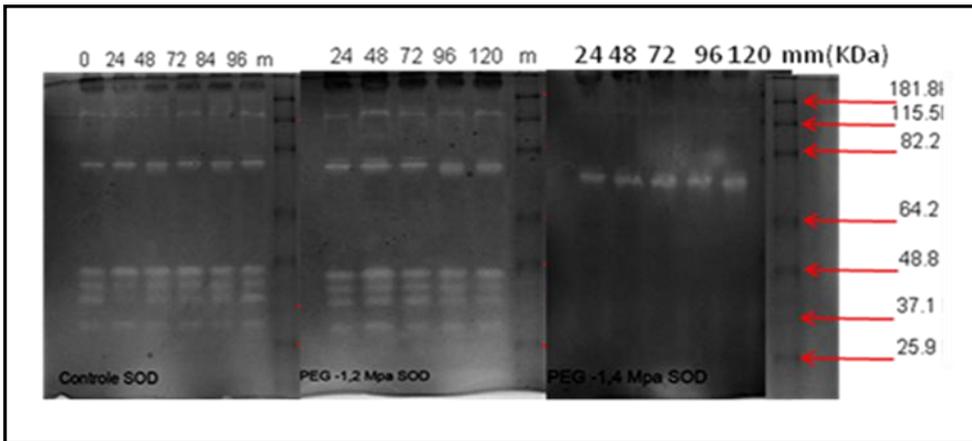


Figura 22 - Perfil eletroforético das isoenzimas Superóxido Dismutase (SOD) em cotilédones de sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica em PEG -1,2 e -1,4 MPa em diferentes períodos de embebição (0, 24, 48, 72, 84, 96 e 120 horas). Utilizou-se 30 $\mu\text{g/g}$ de proteínas.

Verificou-se que sob maior restrição hídrica, ou seja, tratamento em PEG -1,4 MPa houve uma alteração na biossíntese da SOD como evidenciado no perfil eletroforético (Figura 22) onde, ao utilizar a mesma concentração de proteínas ($30\mu\text{g.mL}^{-1}$), foi possível verificar, apenas a banda de uma das isoenzimas, enquanto que ao utilizar uma maior concentração protéica ($45\mu\text{g.mL}^{-1}$), a mesmas seis bandas correspondentes as isoenzimas com pesos moleculares diferentes foram evidenciadas. Este perfil eletroforético diferiu do perfil isoenzimático durante a germinação em água e em PEG -1,2 MPa, onde foi possível a identificação de seis bandas de proteínas, ou seja, isoenzimas com diferentes pesos moleculares, sendo a menor, de peso molecular com aproximadamente 30 KDa, três tipos de isoenzimas entre 37,1 a 48,8 KDa, uma em torno de 80 KDa e outra com aproximadamente 116 KDa.

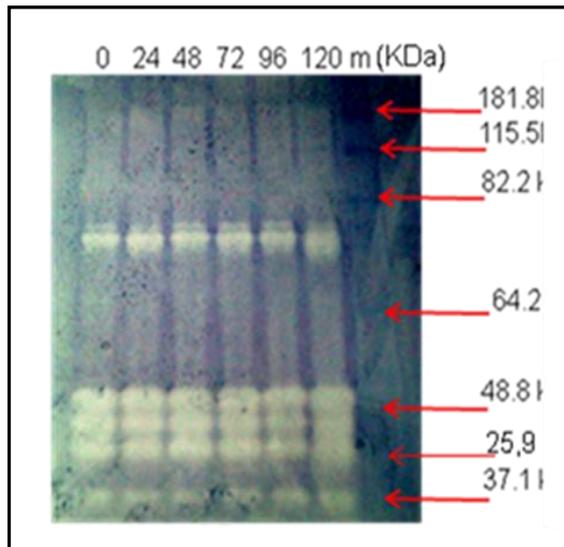


Figura 23 - Perfil eletroforético da isoenzima SOD em cotilédones de sementes de *A. cearensis* sob restrição hídrica em PEG -1,4 MPa em diferentes períodos de embebição (0,24,48,72, 84, 96 e 120 horas). Utilizou-se 45 µg/g de proteína.

Estudos realizados por Deuner e colaboradores (2008) em folhas de *Coffea arabica*, quando estas passaram por um processo de estresse abiótico induzido por pulverização com H_2O_2 , a enzima superóxido dismutase teve sua atividade aumentada na primeira hora de pulverização, por outro lado quando foi realizada pulverização com ácido ascórbico a atividade da enzima foi matida dentro dos padrões esperados quando comparado com o controle.

Gomes-Júnior (2006), relatou em seus estudos que uma vez que a ação da SOD resulta na formação de H_2O_2 , ela esta intimamente ligada com a atividade da catalase e peroxidase que convertem H_2O_2 mantendo, portanto uma interação com essas e outras enzimas antioxidantes para garantir um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos.

Enzima Glutationa Redutase (GR)

Com a análise dos resultados obtidos da atividade da enzima Glutationa Redutase (Figura 24) verificou-se, que não houve variação no perfil da atividade desta enzima quando da germinação em água e quando submetida ao estresse hídrico (PEG -1,2 MPa e -1,4 MPa). Entretanto, a atividade enzimática aumentou durante o estresse aplicado, excetuando em 48 horas de restrição hídrica em PEG -1,4 MPa, onde atividade diminuiu para $9,69 \text{ mU.mL}^{-1}$ enquanto que em água e PEG -1,2 MPa foi de $13,78$ e $14,58 \text{ mU.mL}^{-1}$, respectivamente.

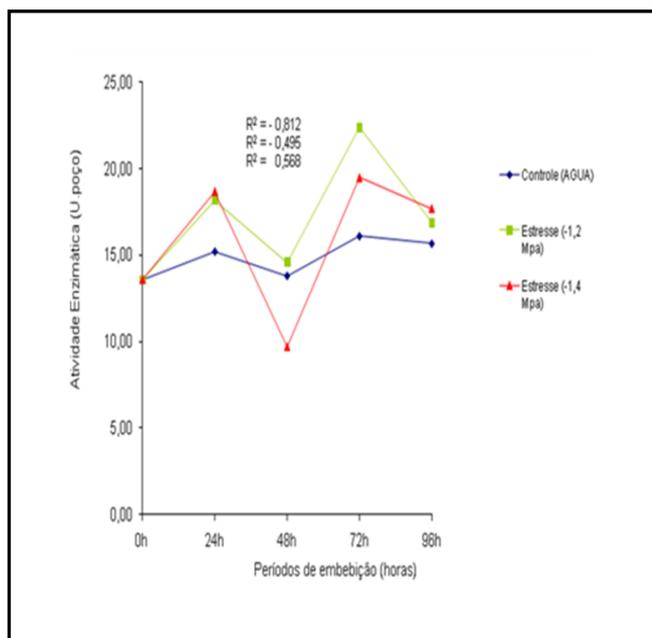


Figura 24 - Atividade da enzima GR de cotilédones de sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica em PEG -1,2 MPa e -1,4MPa em diferentes períodos de coleta (0,24,48,72,84 e 96 horas).

Portanto, o comportamento enzimático verificado para os tratamentos nos potenciais de -1,2 e -1,4 MPa mantiveram-se semelhantes ao comportamento durante a germinação em água, variações nas atividades enzimáticas podem ser analisadas de acordo com a Figura 24. Contudo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), quando se compara os resultados da atividade enzimática durante os dois tratamentos sob o estresse hídrico, através da análise de variância a 5% de probabilidade. .

A atividade desta enzima também aumenta com o estresse hídrico, como descrito por Bailly e colaboradores (2000) ao analisar a atividade da glutatona redutase em sementes de girassol sob estresse.

Neste estudo, ao analisar os períodos de 24 e 72 horas nos três tratamentos empregados nas sementes de *A. cearensis* a atividade da enzima GR aumentou, reforçando a participação dessa enzima como agente de proteção antioxidativo, através do aumento na razão glutatona reduzida/glutatona oxidada (GSH/GSSG) na fase de reativação do metabolismo durante a germinação. A GSH, como descrito por Felipe e colaboradores (2009) faz parte do ciclo ascorbato/glutatona, e é capaz de eliminar alguns EROS produzidos durante o estresse oxidativo.

Considerando os resultados presentes na Figura 24, a glutatona redutase pode ser considerada como um marcador bioquímico na avaliação de estresse

hídrico, pois, o seu perfil comportamental não modificou nos diferentes tratamentos, entretanto a atividade enzimática foi alterada em função do potencial osmótico usado, o tempo de restrição hídrica e o metabolismo da semente de *A. cearensis*.

Enzima Glutationa Peroxidase (GPOX)

Ao analisar os resultados obtidos para a enzima glutaciona peroxidase, no tratamento das sementes embebidas em água, verificou-se uma relação com o perfil demonstrado para glutaciona redutase durante a germinação das sementes (Figura 25). Em PEG -1,2 MPa e PEG -1,4 MPa houve uma acentuada variação da atividade enzimática, principalmente para o tratamento com maior restrição hídrica, cuja atividade da GPOX aumentou de 125.699,2 nmol/min/mg proteínas (semente seca) para 413.205,8 nmol/min/mg proteínas no período de 96 horas em PEG -1,4 MPa.

A análise dos resultados, utilizando análise de da análise de variância ($p < 0,05$), para a atividade da enzima glutaciona redutase, demonstrou que existiu uma diferença significativa entre os tratamentos em água e PEG -1,2 MPa, frente ao tratamento em PEG -1,4MPa com um $p = 0,006$. Verificou-se ainda que, não houve diferença significativa, entre a atividade enzimática da enzima GPOX, durante a germinação em água e o uso de PEG -1,2 MPa em 24 e 96 horas de tratamento, entretanto esta diferença foi significativa para 72 horas, com 5% de probabilidade.

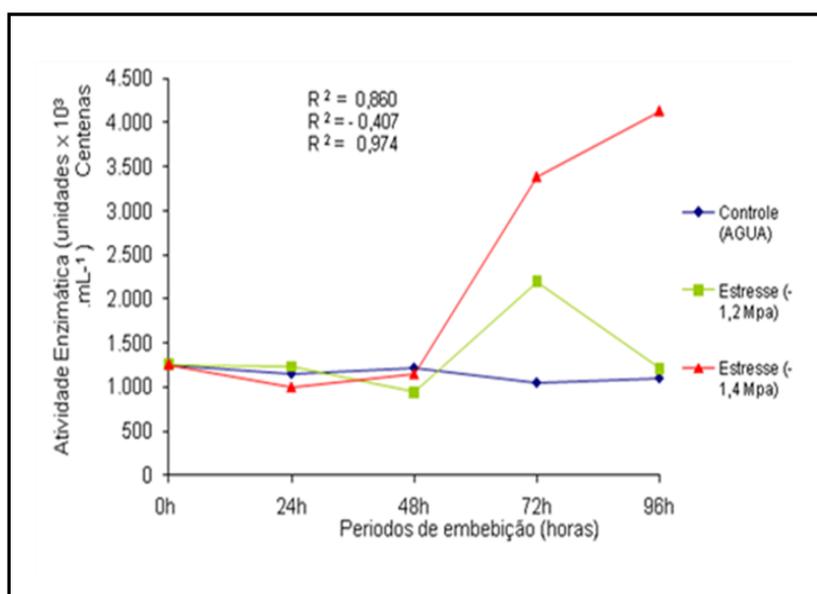


Figura 25 - Atividade da enzima Glutationa Peroxidase (GPOX,) de cotilédones de sementes de *Amburana cearensis* durante a germinação em água e sob restrição hídrica em PEG -1,2 MPa e -1,4 MPa em diferentes períodos de coleta (0,24,48,72,84, e 96 horas).

Felipe e colaboradores (2009) avaliaram a atividade enzimática da GPOX, e verificaram que em *C.spectabilis* a enzima teve sua atividade incrementada, principalmente nas raízes, e que *C. cajan* apresentou uma atividade reduzida desta enzima quando submetidas a maiores concentrações de arsênio.

Através da análise do perfil enzimático da glutathiona peroxidase evidenciou-se a presença de no mínimo, duas isoenzimas com pesos moleculares compreendidos entre 115,5 KDa e 181,8 KDa e outras isoenzimas entre 64,2 e 115,5 KDa. Verificou-se o aumento da atividade de GPOX quando do tratamento em PEG -1,2 MPa, porém, estas análises devem ser repetidas pois, ao avaliar o eletroferograma verifica-se que pode ter ocorrido desnaturação das proteínas que interferiram na revelação do gel e na identificação precisa das bandas.

Estes resultados estão de acordo com o descrito por Ribeiro e colaboradores (1995), que demonstrou o perfil eletroforético semelhante ao da atividade da peroxidase em cotilédones de feijão cultivados sob diferentes níveis de cádmio, durante 96 horas de coleta.

Segundo Siegel (1993) sob condições de estresse, as plantas tendem a aumentar a atividade da peroxidase e às vezes, é a primeira enzima a ter atividade alterada, independentemente do substrato utilizado ou do estresse aplicado. Portanto, a indução da atividade da peroxidase pode ser um mecanismo utilizado pelos vegetais para reduzir os níveis de H_2O_2 e peróxidos orgânicos formados sob diferentes condições de estresse.

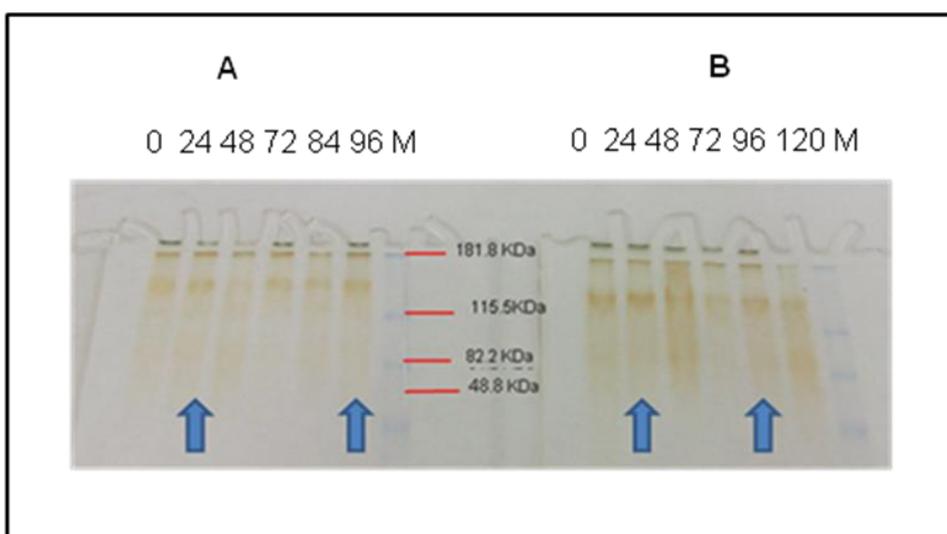


Figura 26 - Perfil eletroforético das isoenzimas Glutathiona Peroxidase (GPOX) em cotilédones de sementes de *Amburana cearensis*. (A) durante a germinação em água e (B) sob restrição hídrica em PEG -1,2 MPa em diferentes períodos de coleta (0,24,48,72,84,96 e 120 horas).

Na Figura 26, pode ser verificado o perfil isoenzimático da enzima glutathione peroxidase, em sementes de *A. cearensis*. Ao analisar os dois perfis, aponta-se semelhanças na atividade desta enzima.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os analisados em estudos anteriores, em que a atividade da enzima GPOX, aumentou quando esta encontrava-se submetida a estresses. No trabalho em questão este período de estresse ficou evidenciando às 72 horas dos tratamentos em Polietilenoglicol 8000 nos potenciais -1,2 e -1,4 MPa.

Portanto, com base neste estudo sugere-se que a peroxidase é uma enzima para ser utilizada como um marcador bioquímico de estresse, resultante de fatores abióticos, concordando com o descrito por Lima e colaboradores (1999). Esta afirmação também está de acordo com o descrito por Gaspar (1986), onde para o autor, a peroxidase parece ser a molécula chave de adaptação das plantas, ou de algum de seus órgãos separadamente, às mudanças do meio ambiente. Neste estudo, confirmou-se, que a peroxidase funciona como um termômetro geral das atividades fisiológicas das plantas, pois, suas atividades são altamente influenciadas pelas condições externas, sendo um importante marcador bioquímico para avaliação de estresses abióticos, dentre esses, o estresse hídrico.

O aumento da atividade da peroxidase ocorre mais rapidamente em plantas que apresentam resistência ao agente causador do estresse comparativamente à planta mais suscetível, justificando deste modo o aumento da atividade da peroxidase nas sementes de *A. cearensis* quando submetida a estresse hídrico com PEG -1,2 MPa e em PEG -1,4 MPa.

Enzima Catalase (CAT)

De acordo com a análise nos perfis isoenzimáticos da enzima catalase (Figura 27) verificou-se que há expressão da enzima para os três tratamentos utilizados por este estudo, sendo que pela análise dos géis é possível afirmar que provavelmente houve maior concentração de catalase nas amostras provenientes dos tratamentos em PEG -1,2 e PEG -1,4 MPa, quando comparados com o tratamento das sementes embebidas em água. Porém, nos tratamentos das sementes em PEG -1,4 MPa no período entre 48 e 72 horas a atividade da enzima catalase foi mais acentuada, corroborando com os perfis das enzimas antioxidantes

citadas neste estudo. Salienta-se a necessidade de maiores investigações para confirmar o perfil da enzima catalase.

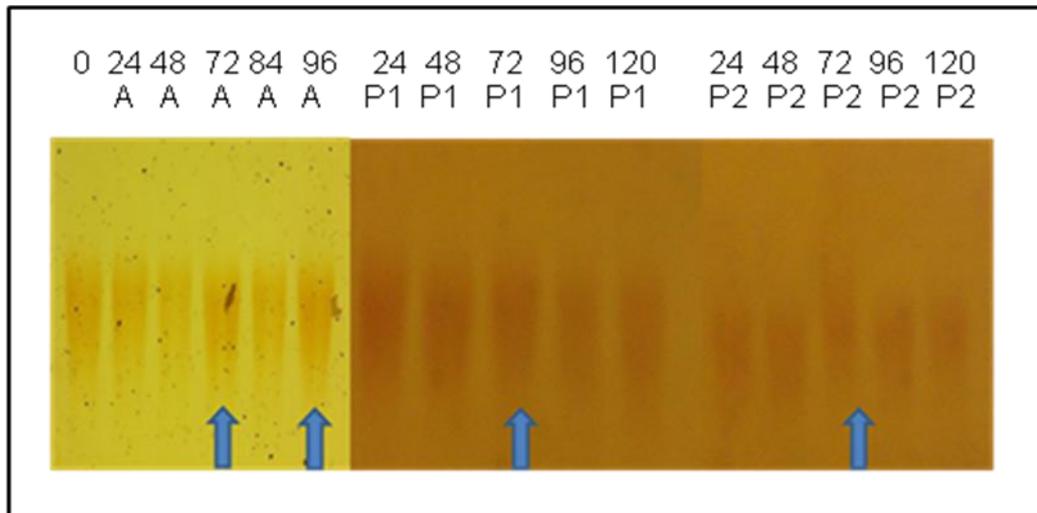


Figura 27 - Perfil eletroforético das isoenzimas Catalase (CAT) em sementes de *A. cearensis* durante a germinação em água (A) e sob restrição hídrica em PEG -1,2(P₁) e -1,4(P₂) MPa.

A atividade da catalase, responde ao estresse hídrico de várias maneiras, segundo vários autores pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada (SMIRNOFF, 1993, ZHANG; KIRKHAM, 1996; ZGALLAÏ et al, 2006). Portanto, é possível o uso de catalase como marcador bioquímico de estresse hídrico e oxidativo, pois, as catalases são muito eficientes na remoção bruta e no controle de níveis elevados de H₂O₂. Entretanto, são menos adequadas para um ajuste de sistemas redox sensíveis com baixas concentrações de H₂O₂.

Ressalta-se que a catalase não depende de nenhum redutor adicional para a eliminação de H₂O₂, o que representa uma grande vantagem desta enzima como marcador bioquímico do aumento de peróxido de hidrogênio em sistemas biológicos, confirmando o que foi descrito por Feierabend (2005).

A análise geral dos resultados alcançados, permitiu verificar a possibilidade de diferenciação da atividade antioxidante de *A. cearensis* por meio de padrões eletroforéticos e métodos colorimétricos, utilizados para análise de amostras de sementes, quando germinadas em água e sob restrição hídrica, confirmando estas enzimas como bons marcadores bioquímicos/moleculares, da avaliação de estresse hídrico e conseqüentemente estresse oxidativo.

Por fim, sugere-se que as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPOX) e glutathione reductase (GR) são eficientes marcadores bioquímicos para avaliação de como as plantas respondem ao estresse hídrico em função do seu estágio de desenvolvimento, bem como a gravidade e a duração do estresse. Confirmando o descrito por Reddy e colaboradores (2004), que afirmou que as células vegetais são protegidas por um sistema antioxidante complexo composto de antioxidantes não-enzimáticos, bem como enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

Essa estreita relação entre a atividade antioxidante e a tolerância ao estresse foi identificado em várias culturas (MALAN et al, 1990; PERL et al, 1993; ZHANG et al, 2003; ZHANG; ERVIN, 2004), evidenciando que qualquer ferramenta potencial disponível para melhorar o desempenho geral das sementes ou plantas, e qualidade durante a exposição ao estresse ambiental, é provavelmente uma adição bem-vinda a um programa de uso sustentável de espécies desse interesse.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

1. As amostras utilizadas apresentam 96% de germinação, demonstrando boa viabilidade e uniformidade do lote.
2. Os cotilédones de sementes de *A. cearensis* apresentaram baixa atividade antioxidante;
3. A atividade antioxidante em sementes de *A. cearensis* aumenta significativamente quando as sementes são submetidas a estresse hídrico;
4. Há uma direta relação entre a atividade antioxidante analisada e o conteúdo de fenóis totais em cotilédones de sementes de *A. cearensis*, nas primeiras 48 de embebição em água e uma relação inversa a partir deste período;
5. Não há uma relação direta entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante durante o estresse hídrico em -1,4 MPa com PEG 8000;
6. As enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPOX E GR) podem ser consideradas como os melhores biomarcadores bioquímico/moleculares para avaliação das respostas frente aos estresses hídricos ao qual foram submetidas às sementes de *A. cearensis*.
7. Faz-se necessário, aprofundar as pesquisas sobre as propriedades medicinais, especificamente, antioxidantes de sementes de *A. cearensis*, visando aumentar na contribuição científica desta planta com fins medicinais.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, suplemento especial, p. 260-258, 2008.

AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 111, p. 383-395 4 Maio, 2007.

_____. et al. Plantas medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba Parte I: subclasse Asteridae. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 3, p. 61-64, 1994.

ALBUQUERQUE, K. S. Condicionamento osmótico e geberelina na qualidade fisiológica de sementes de pimentão colhidas em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n.4, p. 100-109, 2009.

ALFARANO, C. The biomolecular Iteration Network Database and related tools 2005 update. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.33, 2005.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed.UFV, 2006.

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

ANDRADE, C. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn.ex G Don, Leguminosae- mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n.2, p. 231-235, abr. 2007.

ANTUNES-NETO, J. M. F. Biomarcadores de estresse oxidativo: novas possibilidades de monitoramento em treinamento físico. **Rev. Bras. Cienc. e Mov.** [S.l.], 2005.

APEL. K.; HIRT. H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, [S.l.], 2004.

AQUINO, F. W. B. et al.. Phenolic compounds in imburana (*Amburana cearensis*) powder extracts. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 221, p. 739-745, 2005.

BAILLY, C. et al.. Antioxydant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, [S.l.], v.10, p.35-42, 2000.

BANSAL, R.P.; BHATI, P.R.; SEN, D.N. Differential specificity in water inhibition of Indian arid zone. **Biologia Plantarum**, Praha, v.22, p.327-331, 1980.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1,p. 113-123, 2006.

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

BLAKE, T.J. Transplanting shock in white spruce: Effect of cold storage and root pruning on water relations and stomatal conditioning. **Plant Physiology**, Lancaster, v.57, p.210-216, 1993.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and Oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, [S.I.], v. 91, n.2, p. 179-194, 2003.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, [S.I.], v.28, p. 25-30, 1995.

BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, Y.; GALILI, G. (Ed.) **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995.

BRUNI, F.B.; LEOPOLD, A.C. Cytoplasmic glass formation in maize embryos. **Seed Science Research**, New York, v.2, n.4, p.251-253, 1992.

BRAVO, J.A. et al. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, [S.I.], 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ ACS, 2009.

_____. Ministério da Integração Nacional. Portaria Nº 89 de 18 de março de 2005. Semi-arido brasileiro. Brasília, 2005.

_____. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BREUSEGEM, F.V.; The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, [S.I.], v.161, 2001.

BULBOVAS, P. Variação Sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau- brasil). **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n.4, p.687-696, out. 2005.

CANUTO, K.M. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 18., 1994, Manaus, **Resumos...** Manaus: INPA, 2004, p.55.

_____.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, 2006.

_____. **Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A.C.Smith**: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008.

_____.; SILVEIRA, E. R. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de Cumaru (*Amburana cearensis* A.C.Smith). **Química Nova**, São Paulo, v.33, n. 3, p.662-666, 2010.

CAKMAK, I. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. **New phytologist**, [S.l.], v. 146, n. 2, p. 185-205, 2000.

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de La Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, Cordoba, v.2, n.2. mar. 2005. Disponível em: <<http://www.safv.com.ar/Carrillo%200305.pdf>> Acesso em: 21 set.2010.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: Funep, 2000, 588 p.

_____. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. Campinas, 1988.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI – ILIOU,R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n.9, p. 949-962, Sept.1999.

CHUN, S.S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* **Process. Biochemistry**, [S.l.], v.40, p. 809 - 816, 2005.

CHURIN, Y.; SCHILLING, S.; BÖRNER, T. A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 459, n.1, p. 33-38, oct. 1999.

COIMBRA-FILHO, Ademar F.. *Torresea* Fr. Allem. (Leguminoase Papilionoideae) – validade do nome genérico; considerações biogeográficas, econômicas, e conservacionistas. [S.l.], 2008. Disponível em:<http://adelmarcoimbra.blogspot.com/2008_12_01_archive.html>. Acesso em: 19 set.2010.

COPELAND, L. O; McDONALD, M. B. **Principles of seed science and technology**. 3. ed. New York: Chapman & Hall, 1995.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

_____. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: IBDF, v.5, 1978.

COSTA, L. V. Antiproliferative Effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, Alemanha, v. 58c, n. 9/10, p. 675-680, 2003.

CUNHA, M.C.J.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C.Smith-Cumaru- Leguminosae Papilionoideae. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n.2, p.89-96, 2003.

DANTAS, B.F.; CORREIA, J.S.; ARAGÃO, C.A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Revista Brasileira de sementes**, Londrina, v.30, n.1, p.223, 2008.

DEUNER, S. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Revistas Ceres**, Viçosa, v. 55, n.2, p. 135-140, 2008.

DI STASI LC. **Plantas medicinais: arte e ciência**: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

DRUMOND, Marcos Antônio (Coord.) et al. Avaliação e identificação das ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. Petrolina, 2000. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/caatinga/relatorios/uso_sustentavel.pdf>. Acesso em: 19 set. 2010.

ELISABETSKY, E. Etonofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2000.

EMBRAPA. Semi-árido. Médias Anuais da Estação Agrometeorológica de Bebedouro. (Petrolina-PE 09o09'S, 40o22'W). Período 1975-2009. [S.I.], Embrapa. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/servicos/dadosmet/ceb-anual.html>>. Acesso em : 15 fev.2011.

EVANS, E.; RITCHIE,K. Dynamic Strength of molecular bonds. **Biophysical Journal**, [S.I.], v.72, p 1541-1555, Apr. 1997.

ESDHAT, Y. Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum**, [S.I.], v.100, p. 234–240, 1997.

FEIERABEND, J. Catalases in plants: Molecular and functional properties and role in stress defence. Online Library, [S.I.], 2005.

FELIPE, R. T. A.. Crescimento e respostas antioxidativas em espécies leguminosas submetidas ao arsênio. 2007. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

_____.; OLIVEIRA, J.A de; LEÃO,G.A. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**, Viçosa- MG, v.33, n.2, p. 245-254, 2009.

FENNEMA, O.W. **Química dos alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2000.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos...**, São Carlos, 2000.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FOLIN, O. C. V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 73, n.2, Apr. 1927.

FOYER, C.H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plants, Cell and Environment**, [S.l.], v. 17, p. 507-523, 1994.

_____.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.D.; NOCTOR, G. Low Ascorbic Acid in the *vtc-1* Mutant of Arabidopsis Is Associated with Decreased growth and intracellular redistribution of the Antioxidant System. **Plant Physiol**, [S.l.], v. 127, p. 426-435, oct. 2001.

GADJEV, I. Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 141, p. 436-445, 2006.

GASPAR, T. et al. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v.64, p.418-423, 1986.

GECHEV, T.S. et al. Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 141, p. 436-445, 2006.

GIULIETTI, A.M; QUEIROZ, L.P. de. **Diversidade e Caracterização das Fanerógamas do Semi-Árido Brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2006.

GOMES-JÚNIOR, R. A. Antioxidant metabolismo f coffe cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 1330-1337, 2006.

GRATÃO, P.L. Making the life of heavy metal-stressed plant a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria – Australia, v.32, n. 6, p. 481-495, 2005.

GUEDES, R. S. Potencial fisiológico de sementes armazenadas de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Smith. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 3. 2008 Fortaleza, 2008.

HABIBI, Y. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 339, p. 1119-1127, 2004.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, [S.l.], v.49, p. 1341-1348, 1995.

_____. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. **Rev. Nutr.** [S.l.], v. 57, p.104-113, 1999.

_____.; GUTTERIDGE, J.M.C.Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Met Enzimol.**[S.l.], v.186, p. 1-5, 1990.

_____. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.

_____. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 8, p.89-193,1985.

HAYAKAWA, T.; KANEMATSU,S.; ASADA, K. Ocurrence of Cu, Zn – Superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Planta and Cell Physiology**, Kyoto, v. 25,n.6, p.883-889,1994.

HASLAM, E.; Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **J. Nat. Prod.** [S.l.], v. 59, n. 2, p.205-215,1996.

HENRIQUES, A. P. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. **Agropecuária**, [S.l.], v.1, p.227-252, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades [S.l.], 2009. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=261110>>. Acesso em: 03 ago.2010.

_____. Malha Municipal Digital 2005. IBGE, 2005. Disponível em:< http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/default_prod.shtm>. Acesso em: 10 ago.2010.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTUDOS FLORESTAIS. **Identificação de espécies florestais**. Piracicaba. 2010. Disponível em:<<http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=53>>. Acesso em: 29 ago. 2010.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTUDOS FLORESTAIS – IPEF. Reflorestamento, Piracicaba –SP. 2008. Disponível em:<<http://www.ipef.br/>>. Acesso em: 6 ago. 2010.

JIANG, Y.; HUANG, B. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop science**, Madison, v. 41, n.2, p. 436-442, 2001.

JOURDHEUIL, D. Effect of nitric oxide on hematoxin – catalyzed oxidative reactions. **Nitric Oxide**, [S.l.], v.2, p.37-42, 1998.

KRISHNA, P. Binding of Immunophilins to the 90KDa heat shock protein (hsp90) via a Tetratricopeptide repeat domain is a conserved protein interaction in Plants. **Biochemistry**, [S.l.], v. 35, p. 15249-15255, 1996.

KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.l.], v., 79, p. 355-361, 1999.

KWAK, S. S. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, Oxford, v.43, n.3, p.565-568, oct.1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. aut. 1970 . v. 15;227 (5259): p. 680-685.

LEAL, L. K. A. M.; et al. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, Elmsford, v. 79, p. 98-104, 2006.

_____. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neurosci. Lett.** Limerick, v. 388, p. 86-90, 2005.

_____. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Research Phytotherapy**, [S.l.], v. 17, pg. 335-340, 2003.

_____. **Planta Med.** [S.l.], v.74, 2008.

_____. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol**, [S.l.], v.104, p. 198, 2009.

LEITE, E. J.. Stage-of-knowledge on *Amburana cearensis* for genetic conservation. **Brazil. Journal for Nature Conservation**, [S.l.], v. 13, p. 49-65, 2005.

LIMA, D. de A. Plantas da Caatinga. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, 1989.

LÓPEZ-AMORÓS, M.L.; HERNÁNDEZ, T.; ESTELLA, I. Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S.l.], v.19, p. 277-283, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

_____. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarium, 1992.

LOUREIRO, M. B. et al. Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de sementes e plântulas de *Amburana cearensis* (FR. ALL.) A.C. Smith (Leguminosae – Papilionoideae). **Revista Árvore**, Viçosa, 2008.

LOWRY, C.V.; ZITOMER, R.S. Oxygen regulation of anaerobic and aerobic genes mediated by a common factor in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v.81, p.6129-6133, 1984.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with Folin-phenol reagent. **Journal Biochemistry**, [S.I.], v. 193, p. 265-275, 1951.

LUNA-FERNANDEZ, J.L. et al. Complete Amino Acid Sequence of the *Aspergillus* Cytotoxin Mitogilin. **Biochemistry**, [S.I.], v. 24, p.861-867, 1985.

MACHADO NETO, N.B. et al. Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na germinação e vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.28, n.1, p.142-148, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z, p.413, 2004.

MALAN, C.; GREYLING, M.M.; GRESSEL, J. Correlation between Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. **Plant Science**, [S.I.], v.69, p.157-166, 1990.

MALLICK, N., MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algae cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, n. 2, p.183 – 193, aug, 2000.

MARCOS FILHO, J. Dormência de sementes. In: MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005.

MAYER, A. M.; POLJAKOFF - MAYBER, A. The germination of seeds. Oxford, etc.: 4th edn. Pergamon Press 270pp, mainly physiological. Wakehurst 581.142. Text. General article Review article, Seeds germination, Physiology, 1978.

McKENZIE, A. et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based Gene Deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast Functional Analysis Reports**, [s.I.], v.14, p. 953-961, 1998.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E.; Ann, **Rev. Biochem.** [S.I.], 1983.

MENDES, C. D. et al. Germinação e morfologia de sementes e plântulas de *Amburana cearensis* (FR.ALL) A.C. Smith (Leguminosae – Papilionoideae). In: SEMOC, 2007. **Resumo...** [S.I.], 2007.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, London, v.7, n .9, p.405-410, Sept. 2002.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium*

graminearum and induced resistance. **Plant Science**, Clare, v.162, n.4, p. 491-498, apr. 2002.

MOLLER, I.M; JENSEN,P.E; HANSSONS, A. Oxidative modifications to Cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** [S.I.], 58:459–81, feb.2007.

MORAN, J.F. et al. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, [S.I.], v. 194, p. 346-352, 1994.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A- Review**, [S.I.], n.1054, p.95-111, 2004.

NOCTOR, G. et al. Peroxide processing in photosynthesis antioxidant coupling and redox signalling. **Phil. Trans. R. Soc. Long. B.** [S.I.], v.355, p. 1465-1475, 2000.

NOGUEIRA, R.J.M.C. et al. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [S.I.], v. 13(1), p.75-87, 2001.

OLIVEIRA, A.C de.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica. 2.ed. São Paulo: Atheneu, p.67-139, 2000.

PAIVA, A.S. **Disponibilidade hídrica na germinação de sementes e no crescimento de plântulas da leguminosa forrageira *Macrotyloma axillare* (E.Mey) Verdc.cv. Java.** 2007 Tese (doutorado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Unesp. Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil, p 99, 2007.

PANDA, S.K.; KHAN, M.H. Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. **Braz.J. Plant Physiol.**[S.I.], v.16, n. 2, p. 115-118, 2004.

PEREIRA, L. R.; SILVA, A. L.; SOUSA, C. R. **Revista Química no Brasil**, Campinas, v. 2, p. 115, 2008.

PERL, A. et al. Enhanced oxidative stress defense in transgenic tobacco expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutase. **Theoretical and Applied Genetics**, [S.I.], v.85, p.568-576, 1993.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: I. R. LEAL, M. Tabarelli & J. M. C. SILVA (eds). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Universitária. Brasil, p 3-73, 2003.

PROTEIN DATA BANK. [20?]. Disponível em: <<http://www.pdb.org>>. Acesso em: 08 nov.2010.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, [S.I.], v. 9, p. 223-227, 1991.

QUARTACCI, M. F.; NAVARI-IZZO, F. Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings. **Journal of plant physiology**, [S.l.], v. 139, n. 5, p. 621-625, 1992.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v.161, p.1189-1202, 2004.

RENZ, S. V.; GONZÁLEZ, F. H. D.; SEMINÁRIO APRESENTADO NA DISCIPLINA BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, NO PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DA UFRGS, 2003. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R.; **Journal of biological chemistry**, University of Nevada, Reno. p. 38921-38925. 2003.

RIBEIRO, M.; SALOMÃO, T.M.F.; CAMBRAIA, J. Atividade de peroxidase como bioindicador da fitotoxicidade de cádmio em plantas aquáticas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., Lavras, 1995. **Resumos**. Lavras: SBFV/UFLA. p.253.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de Plantas Mediciniais. **Saúde e ambiente em revista**, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p.76-85, 2007.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROQUE, A. A. Potencial de uso dos recursos vegetais em uma comunidade rural do semiárido do Rio Grande do Norte. 2009. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v..24, n. 1, p.112-119, 2001.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico on line**. Fortaleza, Jul..2007.

SCANDALIOS, J.G; GUAN, L.; POLIDOROS, A.N. Catalases in Plants : gene structure, properties, regulation and expression. In: SCANDALIOS, J.G. (Ed.) **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

_____. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.l.], v. 38, p. 995-1014, 2005.

_____. S, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, [S.l.], v.101, p.7-12.1993.

_____. Regulation and properties of plants catalase. In: FOYER, C. H.; MULIUNEAUX, P. M. (Ed.) **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Ratón: CRC Press, 1994.

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

SEIFFERT, M. **Alguns aspectos fisiológicos e bioquímicos da germinação de sementes e anatomia foliar de *Protium widgrenii* Engler**. 2003. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic, 1995, 331 p. disponível em: <<http://nchuir.lib.nchu.edu.tw/ir/handle/309270000/35982>>. Acesso em: 21 set. 2010.

SHAIKH, M. B. and SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. **Brain Research**, [S.l.], v. 625, n. 2, p.283-294, 1993.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, [S.l.], v.12, p. 303-312, 1993.

SMIMOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, **New Phytol**, [S.l.], v. 125, p. 27-58, 1993.

SILVA, J.G da. O Estudo dos complexos Zn (II)-CAT e Cu(II) – CAT utilizando a voltametria cíclica e a de pulso diferencial. **Circular técnica** – Embrapa. Brasília, DF. Dezembro, 2008.

SIMÕES, R. C. **Aspectos fisiológicos e anatômicos de sementes de *Amburana cearensis* (FR. ALL.) A. C. SMITH (Leguminosae – Papilionoideae)**. 2008. Trabalho de conclusão de Curso (graduação) Universidade Católica do Salvador, Salvador, 2008.

SOARES, S.E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v.17, p.71-8,1 jan./abr. 2002.

SOUSA, C. M. M.. Fenóis totais e Atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30,n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, A.H.; MENEZES, H.C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, v.1, p.120 -128, 2004.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S.l.], v. 19, p. 531-537, 2006.

SYROS, T. et al. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.161, n.1, p.69-77, jan.2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p.719, 2004.

TELLES, C.A.S. et al. ASPECTOS fisiológicos e anatômicos de sementes de *Amburana cearensis* (Fr.ALL.) A.C.Smith (Leguminosae- papiliondeae). In: CONGRESSO DA SEMOC- SEMANA DE MOBILIZAÇÃO CIENTÍFICA, 2008. **Anais...** Salvador, 2008.

TEZARA, W.; LAWLOR, D. W. Effects of water stress on biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. In: MATHIS, P. (ed.): **Photosynthesis: from Light to Biophere**. London, v. 4, p. 625-628. [20-].

VAN DER MOEZEL, P.G.; BELL, D.T. The effect of salinity on the germination of some Western Australian *Eucalyptus* and *Melaleuca* species. **Seed Science & Technology**, Zürich, v.15, p.239-246, 1987.

VAN BREUSEGEM, F. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Clare, v.161, n.3, p.405-414, aug.2001.

WOODSTOCK, L.W.; TAO, K-L.J. (1981), Prevention of imbibition injury in lovv vigor soybean embryonic axes by osmotic control of water uptake. **Physiology Plantarum**, [S.I.], n.51, p.133-139, 1981.

WURGES, J. et al. structure of nickel containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, Washington, v.101, n.23, p. 8569-8574, Jun. 2004.

ZGALLAI, H.; STEPPE, K.; LEMEUR, R. Effects of different levels of water stress on leaf Water Potential, stomatal resistance, protein and chlorophyll content and certain antioxidative enzymes in tomato plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, [S.I.], v. 48, n.6, p. 679-685, 2006.

ZHANG, H. et al. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Plant Molecular biology**, [S.I.], v. 55, p. 825-834, 2004.

ZHANG_____. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Plant Molecular biology**, [S.I.], v. 55, p. 825-834, 2005.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. **New Phytologist**, [S.I.], v. 132, n.3, p. 361-373, 1996.

ZHANG, X.; ERVIN, E.H. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. **Crop Science**, [S.I.], v.44, p.1737-1745, 2004.

APÊNDICE A – CURVAS ANALITICAS

Curvas analíticas utilizadas no estudo.

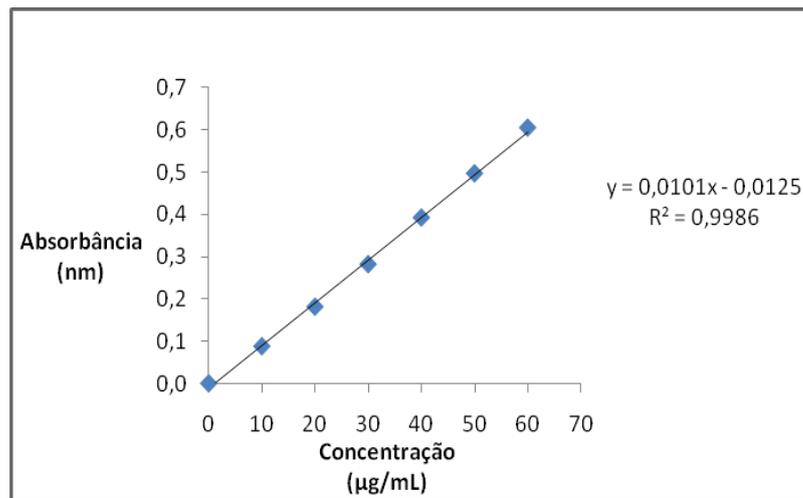


Figura 28 - Curva analítica para a realização das leituras espectrofotométricas da atividade antioxidante

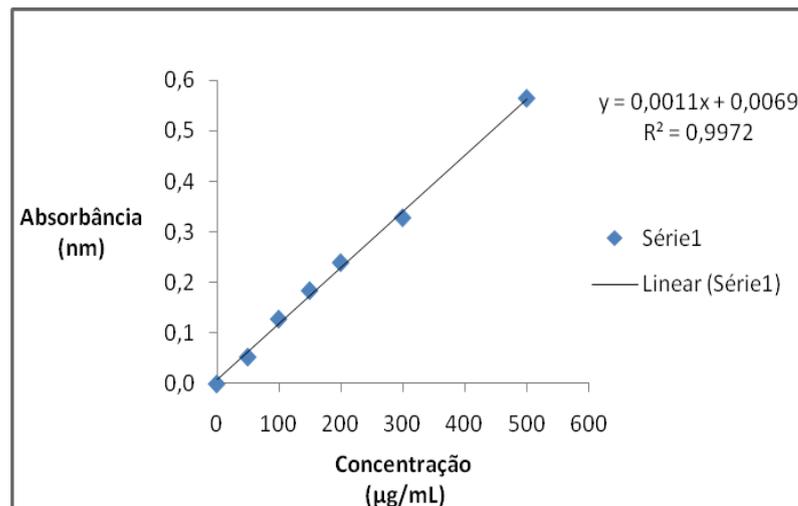


Figura 29 - Curva analítica para a realização das leituras espectrofotométricas dos fenóis totais.

ANEXO A - TABELAS E QUADROS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS APRESENTADOS NA DISSERTAÇÃO

Quadro 1 - Soluções utilizadas para extração de proteínas totais.

Solução	Concentração/20mL	
TRIS/HCl 1 M, pH 6.8	80 Mm	1.6 mL
Glicerol 87% (W/V)	12.5 % (P/V)	2.5 g = 2,87 mL
Ditiotreitol (DTT)	1.5 % (P/V)	300 mg = 0,3 g
Azul de Bromofenol*	0.01% (P/V)	»1 mg (» 0,1g)
Volume Total		20 mL

Tabela 11 - Diluição de BSA com água bidestilada para obtenção de diferentes concentrações e realização da curva analítica

Tubos Soluções (µL)	1	2	3	4	5	6	7	8
Padrão de Albumina	0	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Água miliQ	0	40	80	160	320	480	640	800
Tampão de Extração	800	760	720	640	480	320	160	0
Reagente Bio-Rad	200							
Volume final	1000							

ANEXO B - TABELAS E QUADROS UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS APRESENTADOS NA DISSERTAÇÃO

Quadro 2. Soluções utilizadas no preparo dos géis de eletroforese

GEL DE CORRIDA ("Running gel")		
ITEM	SOLUÇÕES	Volume (µL)
1	Solução estoque de acrilamida a 30%	6250
2	Tris- HCl 1,5M pH 8,8	3750
3	Água deionizada	4800
4	TEMED	22
5	APS	150
Volume final		1500 µL
GEL EMPILHADOR ("Stacking gel")		
ITEM	SOLUÇÕES	Volume (µL)
1	Solução estoque de acrilamida a 30%	670
2	Tris - HCl 0,5 M pH 6,8	1250
3	Água deionizada	3000
4	TEMED	70
5	APS	10
Volume final		5000 µL
Tampão da Cuba Tris- glicina ,pH 8,9		
ITEM	SOLUÇÕES	Volume
1	Tris Base	31,6 g
2	Glicina	19,95 g
3	H ₂ O	450 mL
Volume final		500 g/mL
Tampão da amostra		
ITEM	SOLUÇÕES	Volume
1	Glicina	5mL
2	Tris HCl 0,5 M pH 6,8	2,5mL
3	Azul- de- bromofenol	2,5mg
Volume final		25 mg/mL
ITEM	SOLUÇÕES	
1	Persulfato de amônio (APS) 10 %	0,05 g
2	Água desmineralizada	500 µL
Volume final		500 µL

ANEXO C - REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS

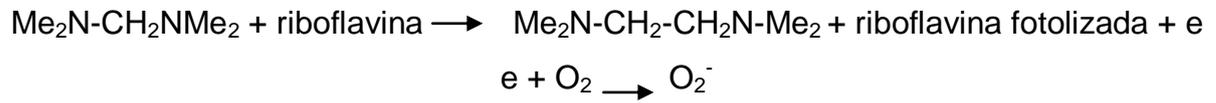


Figura 30: Reação de identificação da superóxido dismutase
Fonte: Alfenas, 2006.



Figura 31. Reação de identificação glutatona redutase
Fonte: Alfenas, 2006.

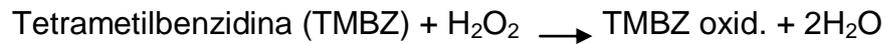


Figura 32. Reação de identificação glutatona peroxidase
Fonte: Alfenas, 2006.



Figura 33 - Reação de identificação catalase
Fonte: Alfenas, 2006.

ANEXO D - SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA A REVELAÇÃO ENZIMÁTICA

Soluções utilizadas para a revelação enzimática

Superóxido dismutase

Solução A

Tampão fosfato 50mM, pH 7,5	100mL
MTT	20mg
Volume final	100mL

Solução B

Tampão fosfato 50mM, pH 7,5	100mL
TEMED	0,4 mL
Riboflavina	1 mg
Volume final	100mL

Peroxidase

Solução A

Tampão acetato 0,1 M, pH 4,5	50mL
Metanol	50mL
TMBZ	50 mg
Volume final	100mL

Solução B

H ₂ O ₂ 3%	2 mL
----------------------------------	------

Catalase

Solução A

Tiosulfato de sódio 60Mm	30mL
H ₂ O ₂ 3%	70mL
Volume final	100mL

Solução B

Iodeto de potássio 90 mM	100mL
Ácido acético glacial	0,5mL
Volume final	100mL