

INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA ATIVIDADE OXIDATIVA E FOSFORILANTE DE
MITOCÔNDRIAS DE *Vigna sinensis* (L.) SAVI cv. PITIÚBA

HELENA MARIA CAMPOS REINALDO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários
à obtenção do grau de
MESTRE EM BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CEARÁ

1978

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos ne
cessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica outorgado pela Uni
versidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados
na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta dissertação é permi
tida, desde que se faça a citação apropriada.

HELENA MARIA CAMPOS REINALDO

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

MARIA DA GUIA SILVA LIMA
Orientador da Dissertação

13/x1/78

Data

✓ JOSÉ TARQUÍNIO PRISCO

13/11/78

Data

LUIZ GONZAGA REBOUÇAS FERREIRA

13/11/78

Data

A meus pais,
irmãos

e

em memória de HELOÍSA e HELONEIDA

iii

AGRADECIMENTOS

A autora, torna público os seus melhores agradecimentos às seguintes pessoas e instituições, cuja colaboração foi imprescindível à realização deste trabalho:

- (1) Professores JOSÉ TARQUÍNIO PRISCO e MARIA DA GUIA SILVA LIMA, pela segura e permanente orientação, em todas as fases do trabalho;
- (2) Professores LUIZ GONZAGA REBOUÇAS FERREIRA e NANCY DERRICK DENSLOW, pelas oportunas sugestões e colaboração na fase experimental;
- (3) Todos os docentes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo apoio e estímulo dispensados;
- (4) Ao Sr. CARLOS ALBERTO PONTES, pela revisão do texto;
- (5) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Banco do Nordeste do Brasil S/A. (BNB), pela ajuda financeira traduzida na concessão de bolsas.

C O N T E Ú D O

	<u>Página</u>
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS	xii
REAGENTES	xiii
RESUMO	xiv
INTRODUÇÃO	1
Salinidade e a Produção Agrícola	1
Salinidade e a Germinação de Sementes	2
Importância de Pesquisas em Fisiologia e Bioquímica do "Stress" Salino	3
Germinação e Sistema Produtor de Energia	3
Cadeia Respiratória	5
Acoplamento entre Respiração e Fosforilação: Controle Respiratório	5
Controle do Metabolismo Energético e a Salinidade.	7
Salinidade e Atividade Enzimática	8
Salinidade e Membrana Mitocondrial	10
Salinidade e Nível de Nucleotídeos de Adenina ...	11
Objetivos do Presente Trabalho	11

C O N T E Ú D O (continuação)

	<u>Página</u>
MATERIAL E MÉTODOS	12
Sementes e Condições de Germinação	12
Preparação Mitocondrial	13
Dosagem de Proteínas	15
Determinação do Consumo de Oxigênio	16
Cálculo da Relação ADP/O	20
Efeitos da Salinidade <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u>	20
Análise Estatística	20
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÕES	87
LITERATURA CITADA	88

LISTA DE TABELAS

<u>TABELA</u>		<u>Página</u>
I	Efeito do NaCl <u>in vivo</u> sobre o consumo de O_2 , o C.R. e relação ADP/O em presença de succinato...	22
II	Efeito do NaCl <u>in vivo</u> sobre o consumo de O_2 , o C.R. e a relação ADP/O em presença de L-malato..	23

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		<u>Página</u>
1	Cadeia respiratória de mitocôndrias vegetais	6
2	Esquema de centrifugação diferencial	14
3	Traçado polarográfico do teor de oxigênio contido em solução de NaCl, KCl e Na ₂ SO ₄	18
4	Traçado polarográfico mostrando o efeito do NaCl <u>in vivo</u> sobre a respiração mitocondrial	24
5	Traçado polarográfico mostrando o efeito do NaCl, KCl e Na ₂ SO ₄ <u>in vitro</u> em mitocôndrias oxidando succinato	26
6	Efeito do NaCl <u>in vitro</u> na velocidade do consumo de O ₂ em mitocôndrias oxidando succinato	29
7	Efeito do NaCl <u>in vitro</u> na velocidade do consumo de O ₂ no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O em presença de succinato	31
8	Efeito do KCl <u>in vitro</u> na velocidade do consumo de O ₂ em mitocôndrias oxidando succinato	33
9	Efeito do KCl <u>in vitro</u> na velocidade do consumo de O ₂ no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O em presença de succinato	36
10	Efeito do Na ₂ SO ₄ <u>in vitro</u> na velocidade do consumo de O ₂ em mitocôndrias oxidando succinato	38

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

FIGURA		<u>Página</u>
11	Efeito do Na_2SO_4 <u>in vitro</u> na velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O de mitocôndrias em presença de succinato	40
12	Traçado polarográfico mostrando o efeito de NaCl, KCl e Na_2SO_4 colocados diretamente em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M	43
13	Efeito do NaCl na velocidade do consumo de O_2 quando colocado diretamente em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M	45
14	Efeito do NaCl na velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M	47
15	Efeito do KCl na velocidade do consumo de O_2 quando colocado diretamente em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M	50
16	Efeito do KCl na velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M	52
17	Efeito do Na_2SO_4 na velocidade do consumo de O_2 quando colocado diretamente em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M ..	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

FIGURA		<u>Página</u>
18	Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O quando colocado diretamente em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M	57
19	Efeito do NaCl sobre a velocidade do consumo de O_2 nos 1º e 2º estados 4 da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	59
20	Efeito do NaCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no estado 3-4 e C.R. da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	61
21	Efeito do NaCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no 1º estado 3 e na relação ADP/O da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	64
22	Efeito do KCl sobre a velocidade de consumo de O_2 nos 1º e 2º estados 4 da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	66
23	Efeito do KCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no estado 3-4 e C.R. da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	68

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (continuação)

FIGURA		<u>Página</u>
24	Efeito do KCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no 1º estado 3 e na relação ADP/O da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	70
25	Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade de consumo de O_2 nos 1º e 2º estados 4 da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	72
26	Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade de consumo de O_2 no estado 3-4 e C.R. da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol	74
27	Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade de consumo de O_2 no 1º estado 3 e na relação ADP/O da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao manitol,	77

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina -5'- difosfato
ADP/O	- Relação entre o número de moléculas de fosfato inorgânico (P_i) incorporadas por fosforilação ao ADP, por átomo de oxigênio consumido.
ATP	- Adenosina -5'- trifosfato
BSA	- Albumina sérica bovina
Carbowax 1540	- Polietilenoglicol, com peso molecular 1540
Cit	- Citocromo
CoQ	- Coenzima Q
C.R.	- Controle Respiratório: relação entre a velocidade de respiração das mitocôndrias, na presença de ADP, e a velocidade de respiração na ausência de ADP.
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
Estado 4	- Consumo de oxigênio por uma preparação mitocondrial em presença de substrato e ausência de ADP
Estado 3	- Consumo de oxigênio por uma preparação mitocondrial em presença de substrato oxidável e excesso de ADP
FAD	- Flavina adenina dinucleotídeo
Fe.S	- Proteína ferro-enxofre
FPha	- Flavoproteína de alta absorbância ("high absorbance")
KCl	- Cloreto de potássio
KH_2PO_4	- Fosfatomonobásico de potássio
K_2SO_4	- Sulfato de potássio
NaCl	- Cloreto de sódio
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
Na_2SO_4	- Sulfato de sódio
P_i	- Fosfato inorgânico

REAGENTES

Foram utilizados os reagentes abaixo relacionados com as respectivas procedências:

E. Merk Ag. Darmsdat

Ácido succínico

EDTA

KH_2PO_4

NBCo. (Nutritional Biochemical Corporation)

Ácido cólico

Ácido L-málico

Carlo Erba

L-(+)-Cisteína

Manitol

NaCl

KCl

Na_2SO_4

Sigma Chemical Company

ADP

BSA

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito da salinidade na atividade oxidativa e fosforilante de mitocôndrias isoladas de hipocótilos de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L.) Savi). Os parâmetros utilizados para fazer uma estimativa da atividade mitocondrial foram os valores dos estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, os valores do controle respiratório e a relação ADP/O, usando-se succinato e L-malato como substratos oxidáveis.

A influência da salinidade nos sistemas mitocondriais foi verificada através da análise do efeito dos sais em mitocôndrias isoladas de hipocótilos de sementes germinadas em meio salino (efeito in vivo), e do efeito dos sais presentes no meio de fosforilação da preparação mitocondrial (efeito in vitro).

Em face dos resultados encontrados, o efeito dos sais no metabolismo energético é supostamente explicado como uma ação ao nível de enzimas ligadas à cadeia transportadora de elétrons e ao nível do mecanismo de controle da fosforilação oxidativa. Ao ser estudado um possível desenvolvimento de mecanismo de defesa ao sal ("hardening"), verificou-se, no que diz respeito à fosforilação de ADP em ATP, que a relação ADP/O se manteve inalterada em presença de NaCl, KCl ou Na₂SO₄, sugerindo uma possível compartimentalização do sal pelas mitocôndrias ou uma modificação de arquitetura da membrana mitocondrial no curso da germinação em condição de "stress" salino. Além disso, foram feitas tentativas de separar a ação osmótica dos sais de sua ação iônica, tendo-se concluído que o potencial hídrico do meio não parece ser o único responsável pela inibição da atividade respiratória, quando o soluto se encontra em altas concentrações.

INTRODUÇÃO

Salinidade e a Produção Agrícola

Os nutrientes normalmente disponíveis para as plantas estão sob a forma de sais solúveis existentes no solo. Todavia, se há excesso de sais solúveis, o crescimento e a produtividade das plantas são afetados e o solo, neste caso, é denominado salino. Este tipo de solo é mais frequentemente encontrado em regiões de clima árido e semi-árido, onde baixas precipitações pluviárias, associadas à elevadas taxas de evaporação, tendem a concentrar sais nas camadas superficiais. Os solos salinos possuem em abundância, principalmente, os cátions sódio, cálcio e magnésio, e os ânions cloreto, sulfato, carbonato e bicarbonato (RICHARDS, 1954).

A salinidade dos solos tem constituído um dos mais sérios problemas para a agricultura. Estimativas recentes indicam a existência de, pelo menos, 4 milhões de km² de solos salinizados, excluindo-se a área dos grandes desertos (FLOWERS et al., 1977). A União Soviética, por exemplo, possui 10% de sua área agricultável constituída de solos salinos (KOVDA, 1937, citado por STROGONOV, 1964), enquanto que nos Estados Unidos e na Índia, 25% da área irrigada encontra-se comprometida por problema de salinização (BLACK, 1968 & FLOWERS et al., 1977). No Brasil, o problema de salinização dos solos se apresenta de forma grave, principalmente na região Nordeste. Em janeiro de 1977, o Departamento de Agricultura e Abastecimento, da Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE), apresentou relatório sobre a salinização e os problemas de drenagem em áreas irrigadas, concluindo que cerca de 25% da área irrigada está salinizada (GOES, 1977).

Salinidade e a Germinação de Sementes

Os trabalhos de SCHIMPER (1898) identificaram os efeitos da salinidade sobre a germinação de sementes como provocados pela diminuição do potencial osmótico do solo, decorrente do acúmulo de sais solúveis, que acarretariam uma redução no gradiente de potencial hídrico entre o solo e a semente. Como resultado, menor seria a quantidade de água absorvida pela semente e, em consequência, o processo germinativo seria inibido. Posteriormente, foi demonstrado que as plantas são capazes de se ajustarem osmoticamente (BERNSTEIN, 1961 e 1963), e a teoria da "seca fisiológica" de SCHIMPER (1898) foi questionada. Além disso, surgiram experimentos demonstrando que os sais podiam também exercer efeitos tóxicos sobre as plantas, e que a toxidez destas estava diretamente relacionada com seu efeito de presença nos tecidos proporcionada pela permeabilidade específica dos mesmos (BERNSTEIN & HAYWARD, 1958; STROGONOV, 1964). Do ponto de vista da metodologia analítica, a separação entre os efeitos tóxicos e osmóticos é muito difícil, porque as sementes respondem a ambos, simultaneamente. Contudo, algumas tentativas foram feitas no sentido de resolver este problema, sendo uma das primeiras a de UHVITS (1946). Ela comparou os efeitos de um eletrólito (NaCl) com os de um não eletrólito (manitol) em diferentes potenciais osmóticos e encontrou que ambos inibiam o processo germinativo, quando em altas concentrações, sendo que a inibição provocada pelo NaCl foi mais acentuada indicando um efeito tóxico deste sal. PRISCO & O'LEARY (1970a) conseguiram separar tais efeitos, usando soluções de NaCl e de "Carbowax 1540" de diferentes potenciais hídricos. Eles verificaram que os efeitos do NaCl sobre a germinação de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram principalmente osmóticos para potenciais hídricos entre 0 e -8 bar, enquanto que em baixos potenciais hídricos a inibição da germinação foi devida aos efeitos tóxico e osmótico do NaCl.

Importância de Pesquisas em Fisiologia e Bioquímica do "Stress" Salino

Com o advento da irrigação, o problema da salinidade foi agravado, podendo a reutilização do solo salinizado ser considerada sob um triplice aspecto:

- (a) recuperação dos solos afetados pela salinidade;
- (b) utilização de plantas resistentes ou tolerantes à salinidade;
- (c) estabelecimento de melhor manejo do solo, da água e das culturas a serem implantadas em áreas salinizadas.

A primeira alternativa, apesar de tecnicamente viável, é, na maioria dos casos, inexecutável do ponto de vista econômico. Para a consecução das duas últimas, precisa-se conhecer as alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem em plantas submetidas à salinidade.

O interesse na obtenção de plantas tolerantes a sais e o conhecimento de adaptações à salinidade justificam a investigação direta dos mecanismos de ação dos sais no sistema produtor de energia dos vegetais.

Germinação e Sistema Produtor de Energia

Mesmo as espécies consideradas como resistentes à salinidade apresentam susceptibilidade a sais durante a germinação e primeiros estágios de desenvolvimento. Por essa razão, os estudos dos efeitos da salinidade nesta etapa do desenvolvimento é de fundamental importância.

O processo germinativo é o resultado do crescimento do eixo embrionário que, rompendo o tegumento da semente, provoca a emergência da radícula e desencadeia os demais processos morfo-fisiológicos, que culminarão com o estabelecimento da plântula. Quando a semente germina em condições normais, observa-se um aumento na atividade respiratória, que coincide com um período de intensa divisão e alongamento celulares (WALTON, 1966). Este fenômeno é explicável, pois para que haja crescimento do eixo embrionário, as células deste órgão necessitam da energia metabólica liberada durante a respiração celular, acoplada ao processo fosforilativo de ADP. Por outro lado, quando a semente germina sob condições de "stress" salino, observa-se uma inibição acentuada do crescimento do eixo embrionário (PRISCO & O'LEARY, 1970a). Portanto, pode-se acreditar que uma inibição no crescimento do eixo embrionário implica em um comprometimento do sistema produtor de energia.

As mitocôndrias são reconhecidas há bastante tempo como o centro da respiração celular em organismos animais e vegetais (LEHNINGER, 1970). A respiração pode ser definida como o processo pelo qual pares de elétrons, derivados de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxílico e de outros substratos provenientes de diferentes rotas metabólicas, fluem através da cadeia respiratória até o oxigênio molecular. Ela está no centro das atividades celulares, uma vez que põe em disponibilidade grande quantidade de energia livre, utilizada para a realização de trabalho biológico, sendo uma parte conservada na forma de ligação fosfato (ATP) no processo de fosforilação oxidativa. Acoplado à respiração, o fenômeno da fosforilação oxidativa influi ativamente em todos os aspectos da vida celular dos organismos aeróbicos, porquanto torna possível o fornecimento da energia oriunda dos processos catabólicos que recupera sob forma de ATP.

O estudo do comprometimento do sistema mitocondrial, produtor de energia pela salinidade, implica mais seriamente em uma exploração do funcionamento da cadeia de transportadores de elétrons e de seus diferentes estados metabólicos, dos níveis do controle respiratório e do grau de acoplamento de tal sistema, submetido a "stress" salino.

Cadeia Respiratoria

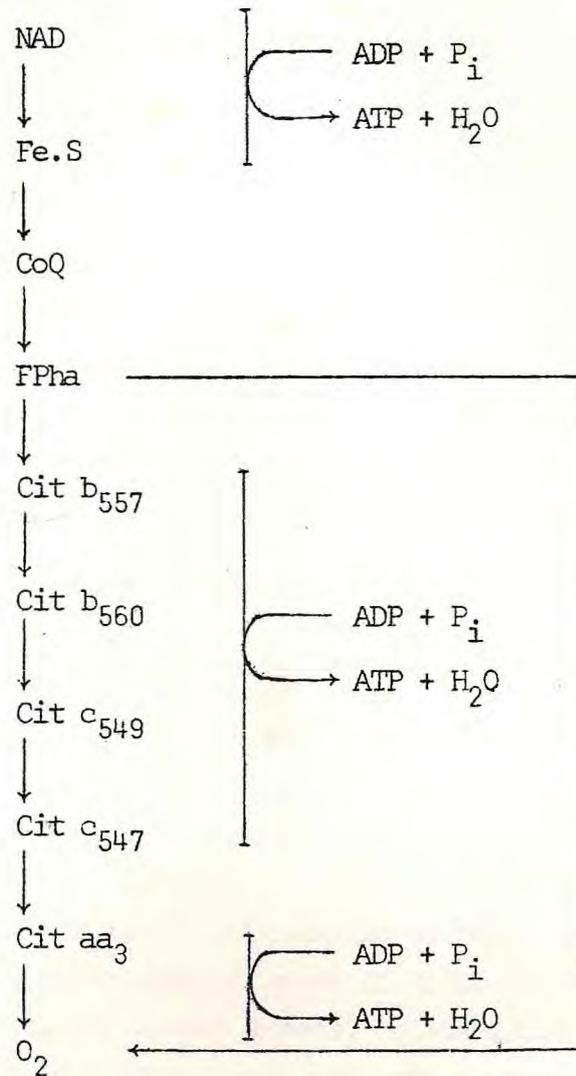
O estudo do funcionamento da cadeia respiratória clássica dos vegetais tem se apresentado como um problema mais complexo do que em mitocôndrias animais. Através de métodos espectrofotométricos sensíveis, foi possível determinar a sequência dos diferentes transportadores da cadeia respiratória e mostrar, em particular, que eles estão associados linearmente em uma ordem que corresponde aos valores crescentes de potencial de óxido-redução.

Embora a cadeia principal de transportadores de elétrons dos vegetais se assemelhe à dos mamíferos, no que diz respeito a composição e ordem dos componentes, ela apresenta algumas peculiaridades, principalmente no tocante à composição de citocromos (PALMER, 1976). Além disso, os vegetais possuem, em grau variável, uma via alternativa para o transporte de elétrons, ou seja, uma bifurcação na via clássica. Esta ocorre ao nível da flavoproteína (FPha) e é resistente ao cianeto (HENRY & NYNS, 1975). Desta maneira, a cadeia respiratória das mitocôndrias vegetais pode ser expressa conforme mostra a FIGURA 01.

Acoplamento entre Respiração e Fosforilação: Controle Respiratório

As evidências experimentais de que o transporte de elétrons do NADH para o oxigênio é a fonte direta da energia usada para a fosforilação acoplada ao ADP foram fornecidas em 1951, por LEHNINGER (LEHNINGER, 1975).

Através da determinação dos valores da energia liberada na cadeia respiratória, três sítios mostraram-se suficientemente exergônicos, para que se processasse a fosforilação do ADP em ATP. Estes foram designados por sítio I (o segmento entre o NADH e CoQ), sítio II (o segmento entre o cit b e o cit c) e sítio III (entre o cit aa₃ e o oxigênio). A fosforilação acoplada a esses três sítios conserva 42% da energia livre total posta em disponibilidade durante o transporte de um par de elétrons do NADH ao oxigênio.



Via alternativa,
cianeto resis-
tente.

FIGURA 1 - Cadeia respiratória de mitocôndrias vegetais segundo PALMER (1976).

No estudo da atividade mitocondrial, cinco estados respiratórios podem ser caracterizados em função das concentrações de ADP, substrato oxidável e oxigênio (CHANCE & WILLIAMS, 1956). Para a determinação do controle respiratório, somente dois destes cinco estados são usados: o estado 3 (estado ativo) e o estado 4 (respiração de repouso).

Valores altos de controle respiratório, de dez ou mais, em mitocôndrias animais (LEHNINGER, 1975), e três a seis em mitocôndrias vegetais (IKUMA, 1970), são indicativos da integridade bioquímica e funcional da preparação. Além disso, as transições entre os estados 3 e 4 refletem alterações no volume e na configuração do compartimento interno da membrana e da matriz mitocondrial, sendo por conseguinte um parâmetro indispensável na exploração da atividade mitocondrial.

Controle do Metabolismo Energético e a Salinidade

Sabe-se que existem diferentes fatores capazes de limitar ou aumentar os diversos tipos de atividades fisiológicas das mitocôndrias, conforme as necessidades da célula e do organismo. Assim, para que se processe a fosforilação oxidativa, há necessidade de que estejam presentes determinadas substâncias ao nível das mitocôndrias: oxigênio, ADP, P_i , substratos oriundos do ciclo de Krebs ou de outras origens (ácido pirúvico, ácidos graxos, aminoácidos). A concentração dessas substâncias é um fator limitante, mas elas devem estar presentes em quantidades suficiente para que se produzam as reações, sem as quais a fosforilação oxidativa não se realiza.

O mecanismo de regulação do controle do metabolismo energético se processa:

- (1) através dos níveis de substratos, provenientes, principalmente, da glicólise, do ciclo do ácido tricarbóxico, e, secundariamente, de outras vias metabólicas;

- (2) através dos efeitos conhecidos como efeito Pasteur (diminuição do consumo de glicose em condições aeróbicas) e efeito Crabtree (diminuição da atividade respiratória em presença de intensa atividade glicolítica) (BERKALOFF et al., 1972).

Do exposto, pode-se concluir sobre a multiplicidade de fatores que atuam no metabolismo energético e admitir que a salinidade tem possibilidades vastas de atuar em diferentes etapas deste processo.

Existem vários registros na literatura, no que tange às alterações sofridas pelos vegetais em nível mitocondrial, sob condições de "stress" hídrico e salino (PORATH & POLJAKOFF-MAYBER, 1964, 1968, 1969; WEIMBERG, 1967, 1970; LIVNE & LEVIN, 1967; BELL, et al., 1971; GREENWAY & OSMOND, 1972; KALIR & POLJAKOFF-MAYBER, 1975). Contudo, a explicação de tal fato ainda é controvertida, uma vez que segundo PORATH & POLJAKOFF-MAYBER (1964, 1968, 1969), os sais provocavam alterações na atividade enzimática. Já LIVNE & LEVIN (1967) acham que eles acarretavam uma alteração ao nível de nucleotídeos de adenina. Por outro lado, em condições de "stress" hídrico, BELL et al., (1971) demonstraram que havia alterações na membrana mitocondrial.

Salinidade e Atividade Enzimática

Algumas rotas metabólicas foram analisadas com respeito à salinidade, porquanto se acredita que a inibição do crescimento das plantas é devida aos efeitos dos sais sobre os diferentes sistemas enzimáticos, provocando modificações no metabolismo vegetal (BERNSTEIN & HAYWARD, 1958). Os efeitos do NaCl e Na₂SO₄ na respiração dos tecidos de extremidades de raízes de ervilha foram estudados por PORATH & POLJAKOFF-MAYBER (1964). Usando glicose marcada nos carbonos C₁ e C₆, estes autores encontraram que a salinidade diminuía o consumo de glicose exógena, além de reduzir a relação entre carbonos marcados (C₆/C₁), que

são liberados para o meio sob a forma de $^{14}\text{CO}_2$. Foi constatado, também, que altas concentrações de NaCl, in vivo, provocavam um estímulo na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e inibição da enzima desidrogenase málica. Estes fatos levaram à suposição de que a salinidade inibe a atividade do ciclo de Krebs e estimula a via da pentose fosfato. Além disso, quando as enzimas da sequência glicolítica foram estudadas, todas elas tiveram suas atividades inibidas pelo sal, à exceção da glicose-fosfato-isomerase.

Resultados diferentes daqueles encontrados por PORATH & POLJAKOFF-MAYBER (1964; 1968; 1969) foram obtidos por WEIMBERG (1970), ao estudar as atividades de dezoito enzimas (inclusive desidrogenase málica) extraídas de raízes de plântulas de ervilha cultivadas em meio fortemente salino. Embora o desenvolvimento das plântulas tenha sido prejudicado pela salinidade (NaCl, Na_2SO_4 , KCl ou K_2SO_4), as atividades específicas das enzimas testadas não foram modificadas. Esta discrepância em resultados pode ser devida a dois fatos:

- (1) os dados de PORATH & POLJAKOFF-MAYBER (1964; 1968; 1969) foram obtidos a partir de extratos provenientes de extremidades de raízes, enquanto que os extratos de WEIMBERG (1970) provinham da homogeneização do sistema radicular inteiro;
- (2) a cultivar estudada por este último autor era diferente da utilizada por PORATH & POLJAKOFF-MAYBER (1964; 1968; 1969).

Vários autores estudaram os efeitos dos sais, in vitro, na atividade de diversas enzimas (WEIMBERG, 1967; GREENWAY & OSMOND, 1972; FLOWERS, 1972a e 1972b; BOUCAUD, 1972; KALIR & POLJAKOFF-MAYBER, 1975; AUSTENFELD, 1976). Iniciando tais estudos, EVANS & SORGER (1966) mostraram que íons monovalentes afetavam as atividades de diversas enzimas. WEIMBERG (1967), ao estudar os efeitos do NaCl, in vitro, na atividade da desidrogenase málica extraída de sementes de ervilha,

observou que a atividade desta enzima, na conversão do ácido oxaloacético a ácido málico, aumentava à medida que a concentração do sal crescia até 0,02M. Todavia, para valores superiores a este, a enzima tinha a sua atividade inibida. Estes resultados, obtidos in vitro, nem sempre correspondem aos observados in vivo. Um exemplo disto foi apresentado por OSMOND & GREENWAY (1972), ao estudarem os efeitos do NaCl in vitro na atividade da enzima fosfoenolpiruvatocarboxilase. Eles encontraram que a enzima obtida de *Atriplex spongiosa*, uma espécie resistente a sal, era mais sensível aos efeitos do NaCl do que a mesma enzima extraída de *Zea mays*, uma das espécies mais sensíveis à salinidade.

Pelo exposto, verifica-se que existem indícios da influência da salinidade sobre as atividades enzimáticas ligadas à respiração e à fosforilação oxidativa, sem que, contudo, tal explicação possa ser única ou livre de controvérsias.

Salinidade e Membrana Mitocondrial

JOHNSON & LARDY (1958) observaram, em mitocôndrias de fígado de rato, que em condições de hiperosmolaridade e em presença de diferentes substratos oxidáveis, produzia-se uma inibição da respiração em grau variável. Tais resultados foram interpretados como sendo devidos a mudança na permeabilidade seletiva das mitocôndrias. Contudo, ATSMON & DAVIS (1967), usando o mesmo sistema, demonstraram que os resultados obtidos eram devidos, não a alteração de permeabilidade, e sim à mudanças na arquitetura das membranas mitocondriais, acarretando uma diminuição na acessibilidade dos substratos às desidrogenases apropriadas.

Existem poucos registros na literatura sobre os efeitos da salinidade na membrana mitocondrial de vegetais. Todavia, BELL et al. (1971) submeteram plântulas de milho a diferentes potenciais hídricos e sugeriram que um aumento no "stress" hídrico afetava a membrana mitocondrial, onde se processa a respiração celular e a fosfo-

riliação oxidativa. Estudando os efeitos do KCl, sacarose, manitol e glicose em um sistema animal CAMPBELL, RAISON & BRADY (1975) obtiveram resultados que confirmavam os de BELL et al. (1971), com uma possível alteração na membrana mitocondrial, afirmando, ainda, que a inibição poderia ser sobre a fosforilação ou sobre o sistema transportador de elétrons.

Salinidade e Nível de Nucleotídeos de Adenina

No intuito também de encontrar uma fundamentação para as alterações ocorridas no sistema produtor de energia, provocadas pela salinidade, LIVNE & LEVIN (1967), utilizando mitocôndrias da parte aérea ("plant tops") de plantas de ervilha, cultivadas em presença de NaCl, verificaram um estímulo nos parâmetros respiratórios e fosforilativos. Contudo, quando presente na mistura de reação o NaCl (in vitro), não provocava modificações em ambos os parâmetros. Eles interpretaram os resultados como decorrentes de uma alteração a nível de nucleotídeos de adenina, que provocava uma desordem nas rotas metabólicas normais, afetando, por conseguinte, a respiração e a fosforilação oxidativa.

Objetivos do Presente Trabalho

De acordo com o exposto, admitiu-se que uma possível explicação para a inibição do processo germinativo pela salinidade estaria relacionada com o sistema produtor de energia do eixo embrionário. Portanto, para testar referida hipótese, estudou-se a influência do "stress" salino durante a germinação e sua repercussão na atividade mitocondrial (efeitos da salinidade in vivo). Além disso, tentou-se correlacionar os efeitos da salinidade diretamente sobre as mitocôndrias (efeitos in vitro) com aqueles observados in vivo. Finalmente, procurou-se dissociar os efeitos osmóticos e iônicos de diferentes sais, bem como investigar uma possível indução de resistência à salinidade ("hardening") em mitocôndrias que foram isoladas de plântulas germinadas em meio salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes e Condições de Germinação

Sementes de feijão de corda (*Vigna sinensis* (L.) Savi cv. Pitiúba), provenientes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, após uma rápida limpeza, foram acondicionadas em frascos de vidro contendo sílica gel e armazenadas a uma temperatura de aproximadamente 10°C.

As sementes foram selecionadas para germinação e depois tratadas durante 10 minutos com solução de hipoclorito de sódio, contendo 5,2% de cloro ativo, sendo desprezadas as que flutuaram na referida solução. Em seguida, elas foram lavadas com água destilada, para retirar o excesso de cloro, e semeadas em papel de filtro ou vermiculite.

Para a semeadura, elas foram colocadas entre duas folhas de papel de filtro de 30 cm x 30 cm (papel Mata Borrão Filtro, 80g x m⁻², Companhia Fabricadora de Papel, São Paulo, SP), devidamente esterilizadas em autoclave a 121°C durante 20 minutos, e umedecidas com água destilada ou com uma solução de NaCl 0,1M. Esta concentração de NaCl foi escolhida porque estudos anteriores (GOMES FILHO, 1976) demonstraram que ela provocava a inibição de 50% da germinação das sementes. Uma única fileira de 10 sementes foi semeada a aproximadamente 2,5 cm da borda superior do papel. Após a semeadura, cinco conjuntos de folhas de papel de filtro, contendo 10 sementes cada, foram enrolados e dispostos verticalmente dentro de depósitos de plástico. Em cada um desses depósitos adicionou-se 20 ml da mesma solução usada para umedecer o papel. Os depósitos plásticos, contendo as sementes, foram colocados dentro de cubas de vidro e estas mantidas na obscuridade. A temperatura e a umidade relativa registradas no interior das cubas, durante o período experimental, foram 25 ± 1,5°C e 100%, respectivamente.

Para a semeadura em vermiculite, as sementes selecionadas e esterilizadas da maneira acima descrita, foram germinadas em depósitos plásticos contendo vermiculite e água na proporção de 1:3 (v:v), e a germinação foi feita no escuro, a uma temperatura de aproximadamente 26-28°C. Antes de ser usada como substrato para a germinação, a vermiculite foi aquecida em estufa a 120°C por 12 horas.

Preparação Mitocondrial

Para o isolamento das mitocôndrias, utilizou-se a técnica de IKUMA (1970), com as modificações introduzidas na separação de mitocôndrias de *Vigna sinensis* (L.) Savi cv. seridô (SILVA LIMA, 1977).

O tecido vegetal utilizado para o isolamento da fração mitocondrial foi o hipocótilo proveniente de plântulas colhidas após 7 dias da semeadura. Todas as etapas envolvidas no isolamento da preparação mitocondrial foram realizadas em câmara fria, à uma temperatura de 6°C, usando-se material e meios previamente resfriados.

Os hipocótilos (200 gramas) foram cortados em seções de, aproximadamente, 3 cm de comprimento, lavados duas vezes em água destilada e uma vez com o meio de homogeneização. Em seguida, foram macerados com meio de homogeneização na proporção de 1:1 (p:v) em gral de porcelana. Deve-se ressaltar que esta etapa é crítica, tendo-se evitado a maceração demorada, mesmo em prejuízo do rendimento, para obtenção de uma fração mitocondrial íntegra.

A composição do meio de homogeneização foi: manitol 0,3 M, EDTA 1 mM, BSA 0,1%, cisteína 4 mM, tampão fosfato 10 mM em pH final 8,0. Em seguida, o pH do homogenato foi ajustado a 7,4 com KOH 6 N e filtrado em tela de nylon, sendo posteriormente submetido a centrifugação diferencial em centrífuga refrigerada IEC (International Equipment Company - Modelo HR-1), segundo esquema exposto na FIGURA 02. O homogenato foi centrifugado a 500 x g durante 10 minutos, sedimentando núcleos e restos celulares. O sobrenadante, contendo a fração mito

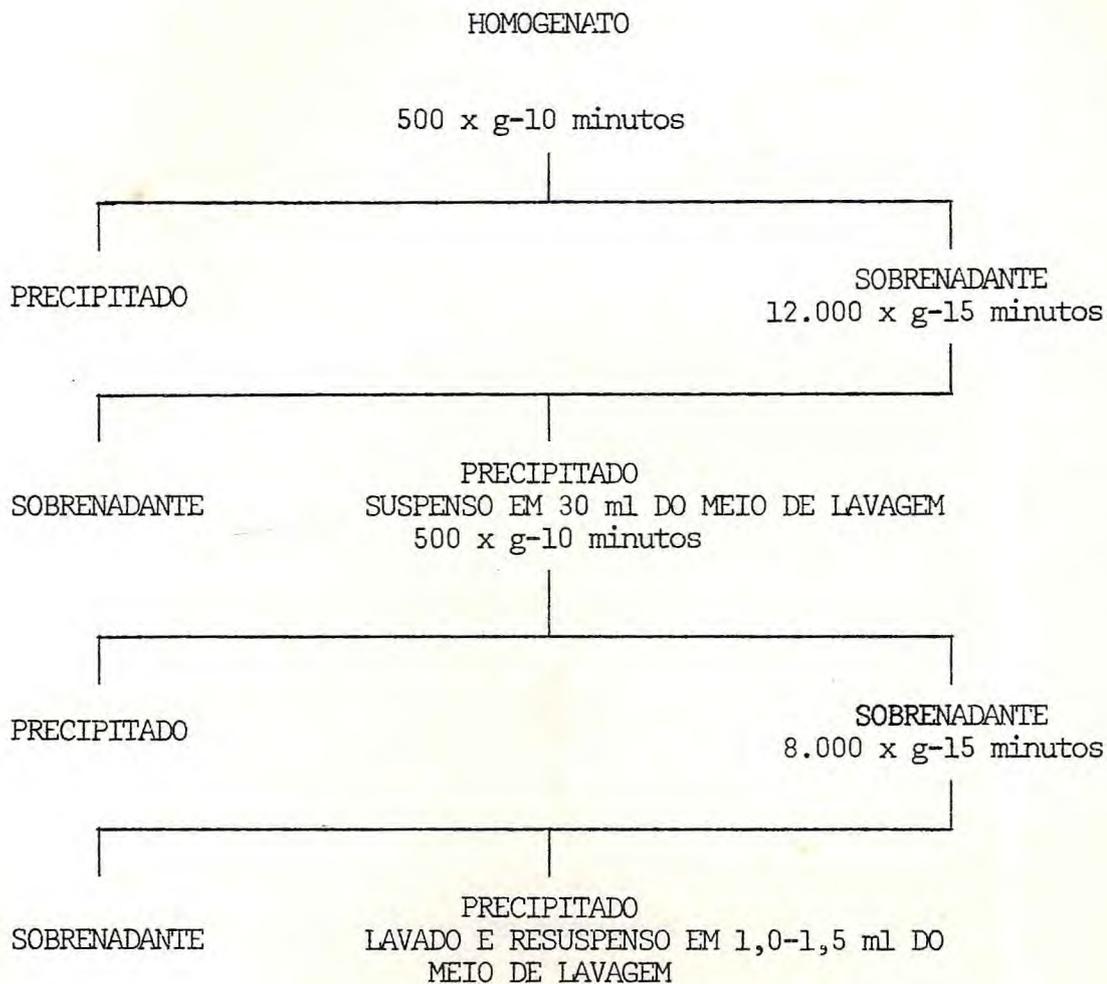


FIGURA 2 - Esquema de centrifugação diferencial para o isolamento de mitocôndria de hipocótilos de *Vigna sinensis* (L.) Savi.

condrial, foi submetido a uma centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos, provocando a sedimentação das mitocôndrias. O precipitado mitocondrial foi suspenso em um meio de lavagem, composto de: manitol 0,3M, BSA 0,1% e tampão fosfato 10 mM, pH 7,6. A suspensão mitocondrial foi homogeneizada manualmente, em homogeneizador de Potter Elvehjem, e centrifugada a 500 x g por 10 minutos, com a finalidade de eliminar possíveis contaminações de amido ou restos celulares remanescentes. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 8.000 x g durante 15 minutos, obtendo-se um precipitado mitocondrial, firmemente aderido ao tubo, e uma camada frouxa de cor amarela que foi despreendida por um pequeno volume de meio de lavagem, adicionado com auxílio de pipeta na parede do tubo e aspirado posteriormente. Finalmente, o precipitado mitocondrial foi suspenso em 1,5 ml do meio de lavagem, permanecendo no gelo ao longo da experiência.

Dosagem de Proteínas

A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pelo método do biureto modificado por GORNALL (GORNALL *et al.*, 1949). A modificação consistiu na adição de colato de sódio, com o objetivo de solubilizar as proteínas das membranas.

A ordem de adição dos reagentes foi a seguinte: colato de sódio em concentração final de 0,26%, alíquota da preparação mitocondrial, NaOH em concentração final de 8% e sulfato de cobre a 0,1%, em um volume de 3,0 ml. Decorridos 15 minutos para o desenvolvimento da coloração característica do biureto, mediu-se a absorbância a 540 nm em um espectrofotômetro Beckman DU. Uma padronização prévia foi feita através de concentrações conhecidas de BSA, na qual foi determinada que 1 mg de proteína tinha uma absorbância de 0,081.

Determinação do Consumo de Oxigênio

As determinações polarográficas do consumo de oxigênio, decorrentes da atividade respiratória mitocondrial, foram obtidas em Oxígrafo Gilson Modelo K-1C polarizado a 0,8 V, usando-se um eletrodo de Clark à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Na câmara de reação foram feitas as seguintes adições: 1,4 ml do meio fosforilante (manitol 0,3 M, tampão fosfato 10 mM, pH 7,2, KCl 10 mM, MgCl_2 6 mM) e succinato 13 mM ou L-malato 33 mM como substrato. A reação foi iniciada pela adição da suspensão mitocondrial, seguida das demais adições que estão indicadas nos traçados polarográficos correspondentes.

Quando o efeito in vitro dos diferentes sais (NaCl, KCl e Na_2SO_4) foi testado, cada um deles substituiu o manitol 0,3 M no meio de reação ou então foi adicionado cumulativamente com o mesmo. Os demais componentes do meio fosforilante (tampão fosfato 10 mM, pH 7,2, KCl 10 mM, MgCl_2 6 mM) foram mantidos.

A concentração de ADP foi determinada espectrofotometricamente tendo como base o seu coeficiente de extinção milimolar de $15,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 260 nm (IKUMA, 1970).

Para o cálculo do consumo de oxigênio pela preparação mitocondrial, determinou-se, previamente, a solubilidade do mesmo em solução de manitol de diferentes concentrações, uma vez que o meio de fosforilação era basicamente constituído de manitol 0,3 M.

Como se sabe, a solubilidade do oxigênio depende da natureza do líquido e dos solutos que neles se encontram. Através destes dados, verificou-se que a concentração de oxigênio no meio de reação era $222 \mu\text{M}$, havendo, por conseguinte, $333 \text{ nmoles}/1,5 \text{ ml}$, ou seja, 666 na noátomos/ $1,5 \text{ ml}$ do mesmo meio. Sabendo-se que a altura do papel mili-

metrado é de 185 mm, calculou-se que cada milímetro corresponde a 1,8 nmoles de oxigênio ou 3,6 nanoátomos de oxigênio/1,5 ml. A velocidade de desenrolamento do papel foi fixada em 12 mm x min⁻¹ e a velocidade de consumo de oxigênio foi calculada a partir da expressão:

$$V = C \times h \times t^{-1}, \text{ onde:}$$

V = velocidade de consumo de oxigênio em nmoles x min⁻¹ x 1,5 ml⁻¹;

C = constante, indicando que a altura de 1 mm percorrido no papel corresponde a 1,8 nmoles de oxigênio;

h = altura em mm percorridos no papel; e

t = 1 min.

Uma vez que o consumo de oxigênio, medido polarograficamente, também foi feito em meio contendo concentrações salinas variáveis (estudos dos efeitos dos sais in vitro), determinou-se previamente o conteúdo de oxigênio de 1,5 ml de meio de reação em presença das diferentes concentrações salinas, tomando-se como termo de comparação o teor de oxigênio contido em 1,5 ml de manitol 0,3M, como foi indicado anteriormente.

Na FIGURA 03 vemos que o uso de concentrações salinas diferentes não acarretou mudanças no teor de oxigênio das soluções salinas, comparadas à solução de manitol 0,3M, sendo o mesmo, por conseguinte, calculado conforme o descrito anteriormente.

O controle respiratório foi calculado segundo CHANCE & WILLIAMS (1956), através da expressão abaixo:

$$C.R. = V_3/V_4, \text{ onde:}$$

V₃ = consumo de oxigênio no estado 3, em presença de substrato e ADP;

V₄ = consumo de oxigênio no estado 4, em presença de substrato.

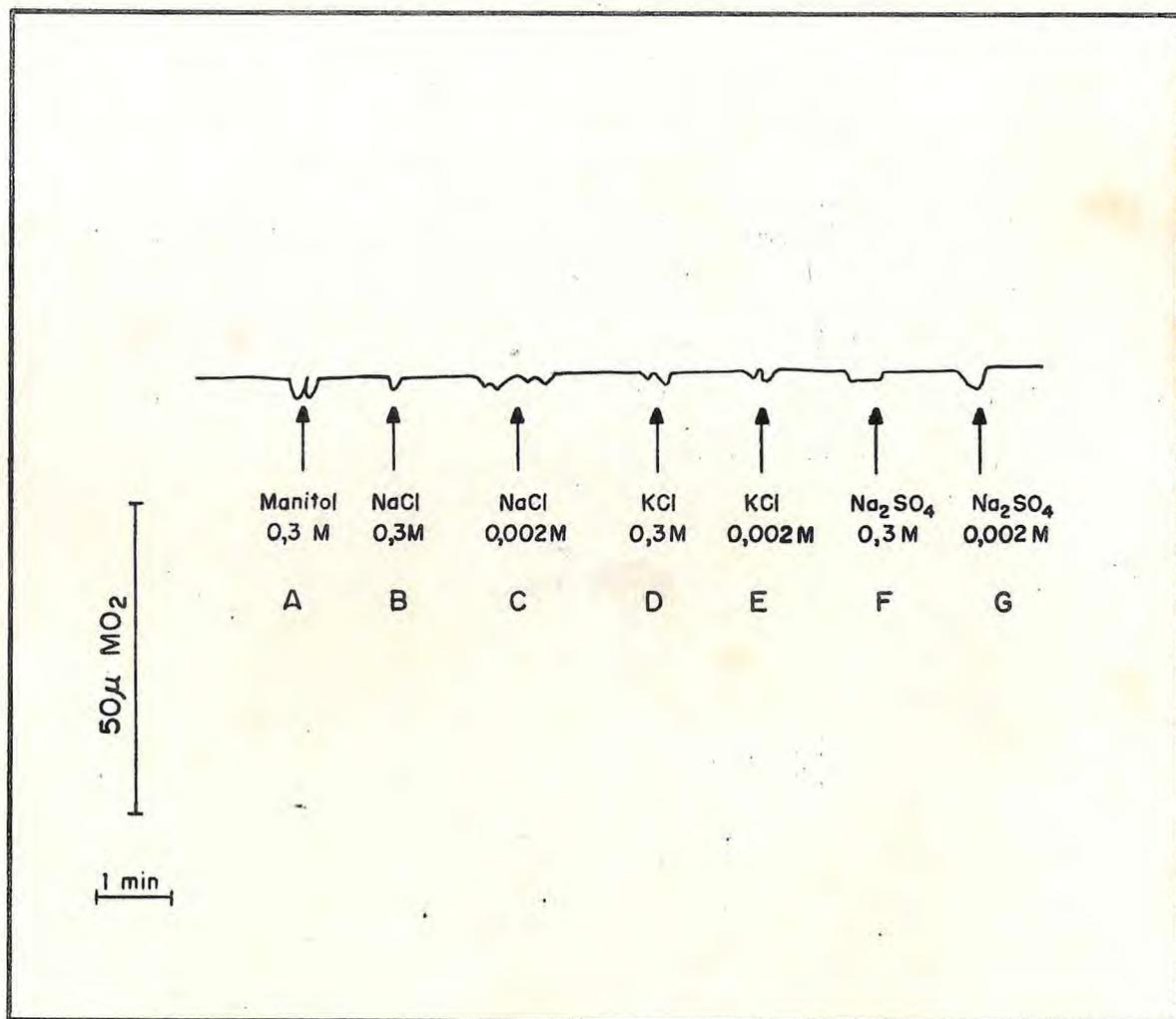


FIGURA 3 - Traçado polarográfico do teor de oxigênio contido em solução de NaCl, KCl e Na₂SO₄ em diferentes molaridades, quando comparado ao de uma solução de manitol 0,3M que fora previamente padronizada como está descrito em MATERIAL E MÉTODOS. Em (A), vemos o registro apresentado por 1,5ml de solução de manitol 0,3M; em (B), 1,5ml de NaCl 0,3M; em (C), 1,5ml de NaCl 0,002M; em (D), 1,5ml de KCl 0,3M; em (E) 1,5ml de KCl 0,002M; em (F), 1,5ml de Na₂SO₄ 0,3M e em (G), 1,5ml de Na₂SO₄ 0,002M.

Cálculo da Relação ADP/O

A relação ADP/O foi determinada segundo o método de CHANCE & WILLIAMS (1956), & HAGIARA (1961), e calculada através da seguinte expressão:

$$\text{ADP/O} = \text{ADP} \times (\text{h} \times \text{C})^{-1}, \text{ onde}$$

ADP = nmoles de ADP adicionado ao meio de reação;

h = altura em mm percorridos no papel, em presença de ADP;

C = constante que indica a altura de 1mm correspondente a 3,6 nanoátomos de oxigênio.

Efeitos da Salinidade in vivo e in vitro

A diferença de comportamento entre mitocôndrias isoladas de hipocótilos provenientes de plântulas germinadas em água e daquelas germinadas em NaCl atribuiu-se a efeitos da salinidade in vivo.

As alterações sofridas quando o meio de reação que foi usado para medir as atividades oxidativas e fosforilantes da referida fração continha diferentes concentrações de NaCl, KCl ou Na₂SO₄ foram atribuídas aos efeitos da salinidade in vitro.

Análise Estatística

No estudo dos efeitos do NaCl in vivo (TABELAS I e II), os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística (teste t), e na discussão dos resultados foram consideradas as diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% (LISON, 1958).

RESULTADOS

Nos experimentos em que se estudou os efeitos do NaCl in vivo, encontrou-se que as velocidades do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, nos primeiros estados 3 e 4 oxidando succinato (TABELA I) e L-malato (TABELA II), decresciam quando estas organelas eram provenientes de hipocôtilos de sementes germinadas em NaCl 0,1M. Já o 2º estado 4, em presença de succinato, continuou inibido, enquanto que em presença de L-malato a salinidade determinou um aumento no seu consumo de oxigênio. Ainda nas mitocôndrias oriundas de hipocôtilos de plântulas desenvolvidas em meio salino, observou-se não só uma inibição do estado 3 - estado 4, como também uma redução no controle respiratório em relação às mitocôndrias isoladas de plântulas do tratamento controle. No tocante a relação ADP/O, verificou-se um aumento da mesma quando o succinato era oxidado pelas mitocôndrias. Quando L-malato foi o substrato oxidável, a relação ADP/O apresentou uma diferença estatisticamente não significativa. A FIGURA 4 mostra traçados polarográficos de dois experimentos, representativos que foram utilizados para o cálculo dos dados constantes das TABELAS I e II.

Usando-se o succinato como substrato (FIGURA 5) obteve-se os perfis representativos do consumo de oxigênio, de valores de controle respiratório e da relação ADP/O de mitocôndrias oriundas de hipocôtilos de sementes germinadas em água e submetidas à ação de NaCl (FIGURA 5B), KCl (FIGURA 5C) e Na₂SO₄ (FIGURA 5D) in vitro em mesma osmolaridade (600 mOsM). Quando tais parâmetros foram comparados aos de um controle (FIGURA 5A), observou-se que os diferentes sais acarretaram uma redução nos valores do consumo de oxigênio na presença e ausência de ADP (estados 3 e 4). O valor do controle respiratório mostrou-se inalterado em presença de NaCl (FIGURA 5B) e diminuiu em presença de KCl (FIGURA 5C) e Na₂SO₄ (FIGURA 5D), sendo que a inibição provocada pelo último foi mais acentuada. A relação ADP/O permaneceu inalterada em presença de NaCl (FIGURA 5B) e aumentou na presença de KCl (FIGURA 5C) e Na₂SO₄ (FIGURA 5D).

TABELA I - Efeito do NaCl in vivo sobre o consumo de oxigênio, o controle respiratório e a relação ADP/O. O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente com eletrodo de Clark, em meio de reação contendo: Manitol 0,3M; KCl 10mM; MgCl₂ 6mM e Tampão Fosfato 10mM a pH 7,2 e succinato 13mM como substrato, em volume final de 1,5ml, a 26°C. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de experiências indicado entre parênteses.

	CONSUMO DE OXIGÊNIO nmoles O ₂ x min ⁻¹	
	Sementes germinadas em água	Sementes germinadas em NaCl (0,1M)
1º Estado 4	42,0 ± 10 (10)	29,0 ± 11 (11) *
1º Estado 3	83,0 ± 16 (10)	58,0 ± 28 (11) *
2º Estado 4	37,0 ± 10 (10)	33,0 ± 14 (11) *
Estado 3-4	46,0 ± 13 (10)	25,0 ± 17 (11) *
C.R.	2,4 ± 0,64 (10)	1,7 ± 0,44 (11) *
ADP/O	1,4 ± 0,29 (10)	1,7 ± 0,61 (11) *

(*) Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% em relação ao controle.

TABELA II - Efeito do NaCl in vivo sobre o consumo de oxigênio, o controle respiratório e a relação ADP/O. As condições experimentais são idênticas às descritas na legenda da TABELA I, tendo sido utilizado L-malato 33mM como substrato. Os resultados expressam a média e o desvio padrão do número de experiências indicado entre parênteses.

	CONSUMO DE OXIGÊNIO nmoles O ₂ x min ⁻¹	
	Sementes germinadas em água	Sementes germinadas em NaCl (0,1M)
1º Estado 4	22,0 ± 4 (3)	15,0 ± 5 (6) *
1º Estado 3	44,0 ± 11 (3)	35,0 ± 12 (6) *
2º Estado 4	12,0 ± 3 (3)	21,0 ± 10 (6) *
Estado 3-4	32,0 ± 12 (3)	14,0 ± 7 (6) *
C.R.	4,0 ± 2 (3)	1,7 ± 0,68 (6) *
ADP/O	2,1 ± 0,37 (3)	2,4 ± 0,75 (6) NS

(*) Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% em relação ao controle.

(NS) Diferença estatisticamente não significativa ao nível de 5% em relação ao controle.

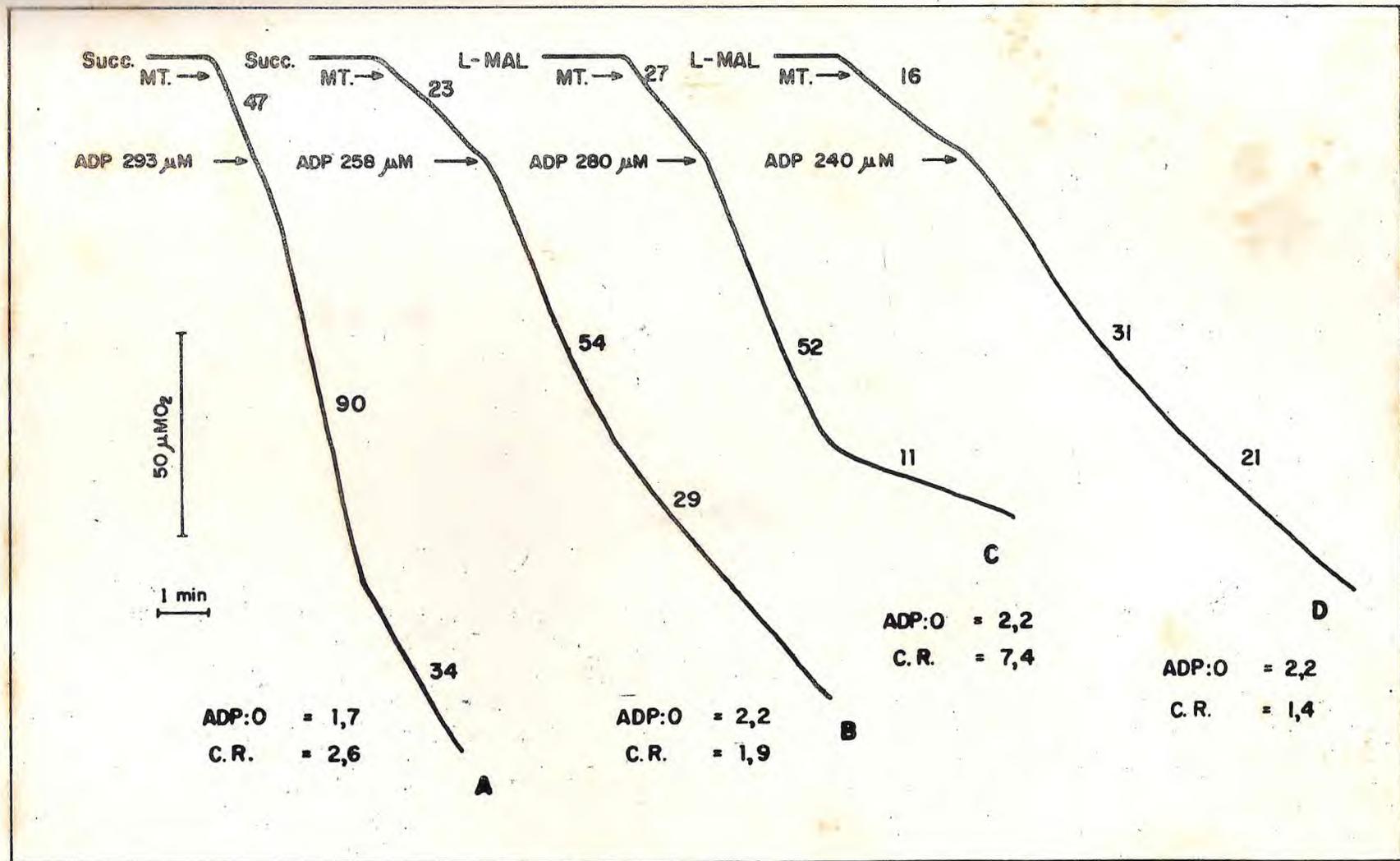


FIGURA 4 - Traçado polarográfico mostrando o efeito do NaCl in vivo sobre a respiração mitocondrial em (B) e (D) em relação ao controle de plântulas germinadas em água (A) e (C). Em (A) e (B) o substrato foi o succinato 13mM, e em (C) e (D) foi o L-malato 33mM. A reação foi iniciada pela adição da fração mitocondrial 1,8mg, seguida pela adição de ADP, conforme indicação da seta, e volume final de 1,5ml. Os números ao longo dos traçados expressam o valor do consumo de O_2 em nmoles de $O_2 \times \text{min}^{-1} \times 1,5\text{ml}^{-1}$. O isolamento das mitocôndrias está descrito em MATERIAL E MÉTODOS. O meio de reação e a medida de consumo de O_2 estão indicados na legenda da TABELA I.

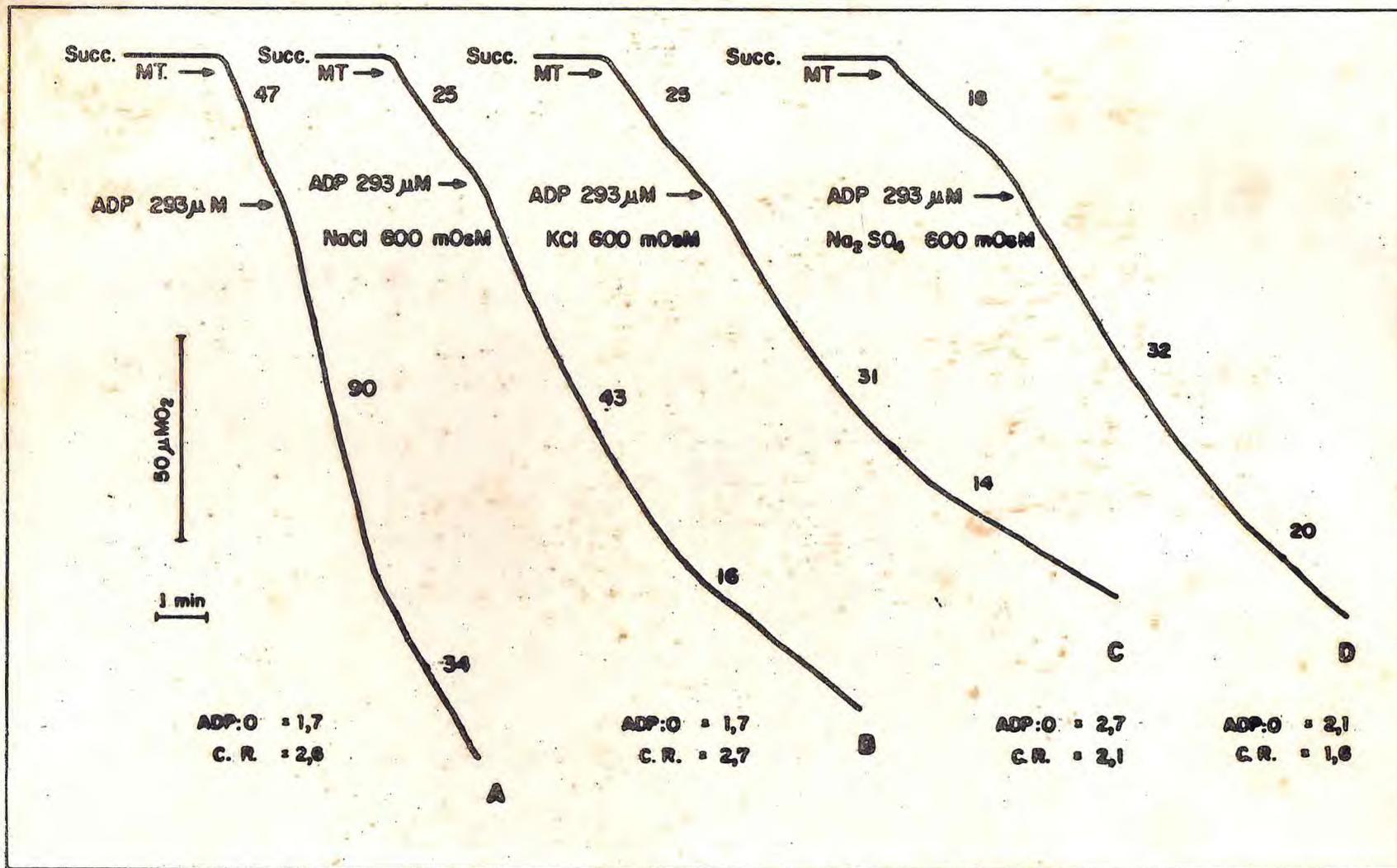


FIGURA 5 - Traçado polarográfico mostrando o efeito do NaCl *in vitro* (B), KCl (C) e Na₂SO₄ (D) em mitocôndrias oxidando succinato 13mM. No controle (A) o meio de reação foi composto de Manitol 0,3M; KCl 10mM; MgCl₂ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. O manitol foi substituído em (B) por NaCl 0,3M (600mOsM), em (C) por KCl 0,3M (600mOsM), e em (D) por Na₂SO₄ 0,2M (600mOsM). A concentração de proteína foi de 1,6mg. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e da FIGURA 4.

A FIGURA 6 mostra a ação do NaCl in vitro em diferentes osmolaridades nos consumos de oxigênio do 1º estado 4, 1º estado 3 e 2º estado 4, tendo o succinato como substrato. Em relação ao controle com manitol 0,3M, o 1º estado 4 apresentou-se inibido de modo constante em presença das diferentes osmolaridades. A velocidade de respiração no 2º estado 4 não sofreu inibição entre 0 e 200 mOsM de NaCl, mas acima deste valor observou-se inibição. Com relação ao 1º estado 3, verificou-se inibição pelo NaCl em todas as osmolaridades. Contudo, tal inibição não se mostrou uniforme. De 0 a 200 mOsM foi quase constante, e em concentrações superiores foi fortemente inibido.

A FIGURA 7 mostra o efeito do NaCl in vitro em diferentes osmolaridades no meio de reação sobre o consumo de oxigênio estimulado por ADP (1º estado 3 - 2º estado 4), sobre o controle respiratório e sobre a relação ADP/O. Tais valores foram obtidos usando-se succinato como substrato. O NaCl provocou, igualmente, inibição da respiração estimulada por ADP em todas as osmolaridades. Esta inibição foi quase constante na faixa compreendida entre 0 e 200 mOsM. Acima desta osmolaridade, o NaCl ocasionou uma forte inibição do 1º estado 3 - 2º estado 4. O controle respiratório apresentou-se também inibido pela salinidade, sendo que a inibição foi mais acentuada em baixas osmolaridades. No que tange a relação ADP/O, pode-se observar que se apresentou discretamente aumentada entre 0 e 300 mOsM de NaCl, e acima destes limites pareceu apresentar um estímulo no valor da referida relação, relativamente ao controle.

A ação do KCl em diferentes osmolaridades é ilustrada na FIGURA 8 (1º estado 4, 1º estado 3 e 2º estado 4) e na FIGURA 9 (estado 3 - 4, controle respiratório e relação ADP/O) em presença de succinato como substrato. A FIGURA 8 mostra que a velocidade de respiração no 1º estado 4 foi inibida pelo KCl, sendo tal inibição muito menor de 0 a 100 mOsM. O 1º estado 3 foi inibido pelo KCl em todas

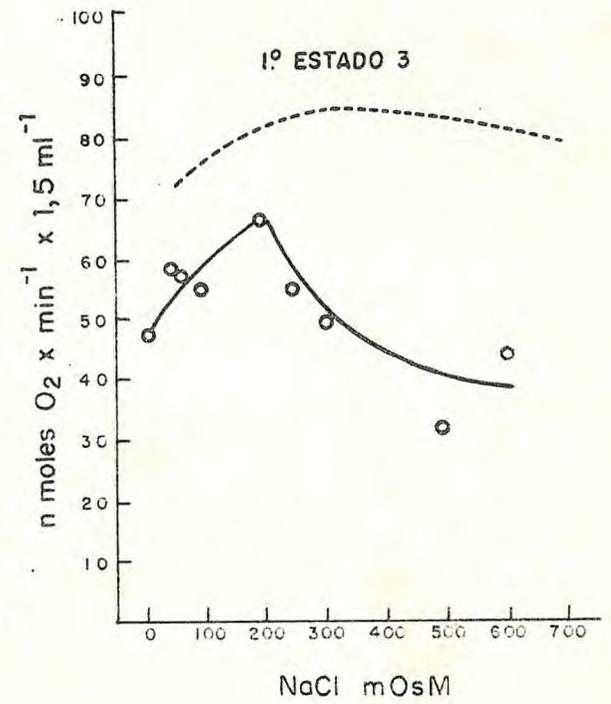
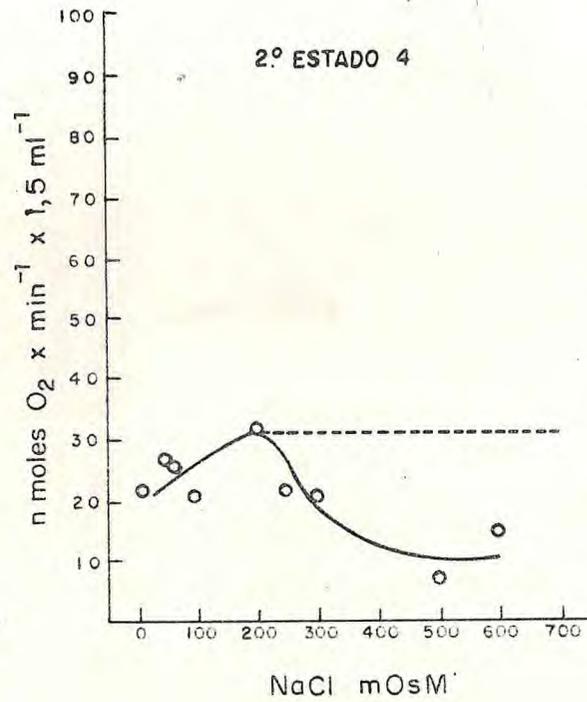
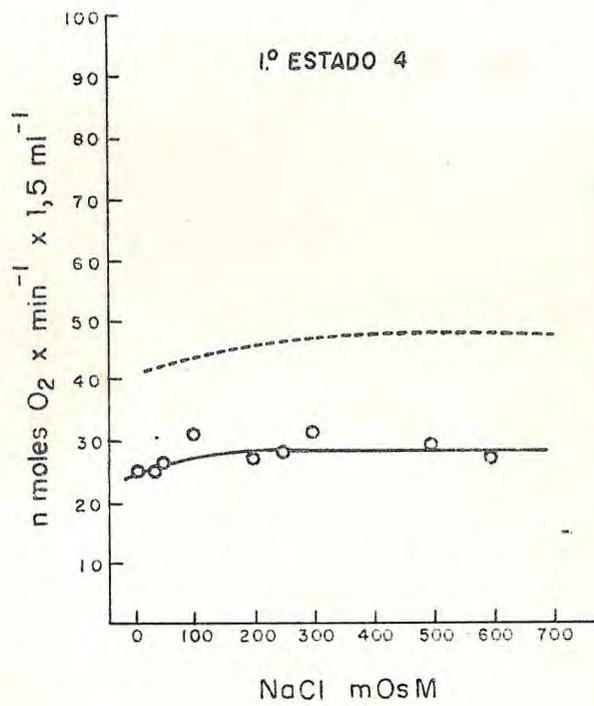


FIGURA 6 - Efeito do NaCl in vitro na velocidade do consumo de O_2 em mitocôndrias oxidando succinato 13 mM. A concentração de proteína foi de 1,2mg/1,5ml. A técnica de isolamento e a composição dos meios fosforilantes estão descritos em MATERIAL E MÉTODOS e legendas da TABELA I e da FIGURA 4. Os valores de consumo de O_2 , em presença de diferentes osmolaridades de manitol, foram normalizados para uma curva padrão, tomando-se como referência o valor da média dos controles específicos para o estudo do efeito do NaCl. Os valores do controle expressam uma média de 4 experiências (---).

Os valores do consumo de O_2 , em meio de reação onde o manitol foi substituído por NaCl. Os resultados expressam a média de 4 experiências (—).

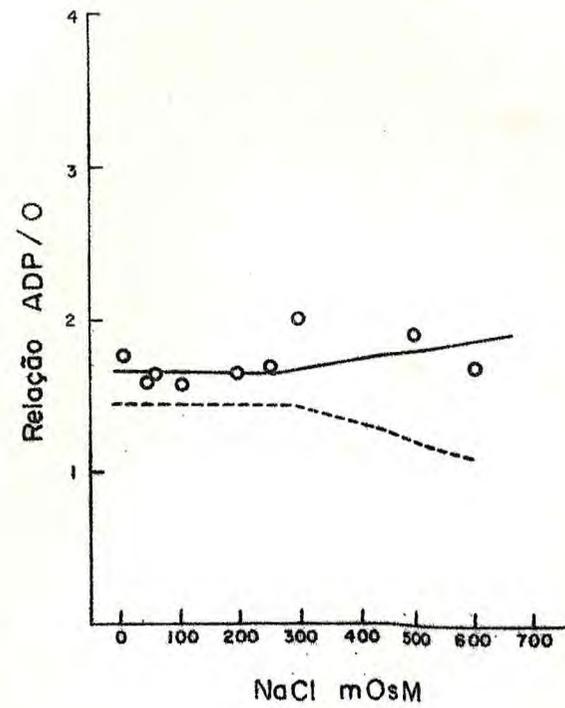
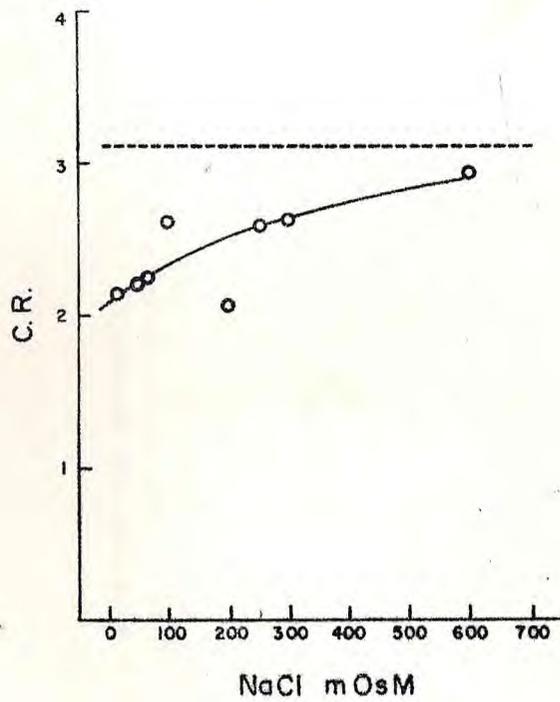
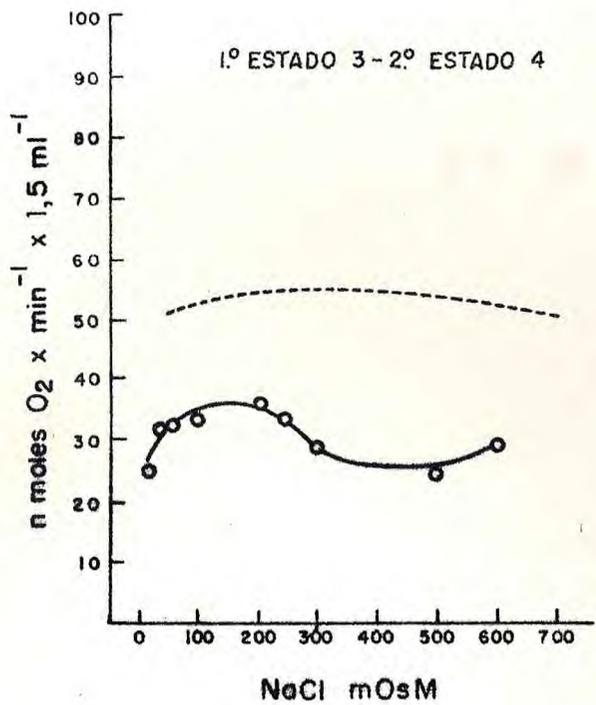


FIGURA 7 - Efeito do NaCl *in vitro* na velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no controle respiratório e na relação ADP/O de mitocôndrias em presença de succinato 13 mM. A concentração de proteína foi de 1,2mg/1,5ml. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores do consumo de O_2 , de controle respiratório e relação ADP/O do controle com manitol, normalizados segundo indicação da legenda da FIGURA 6. Os dados representam a média de 4 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 , de controle respiratório e relação ADP/O em meio de reação onde o manitol foi substituído por NaCl. Expressam uma média de 4 experiências (—).

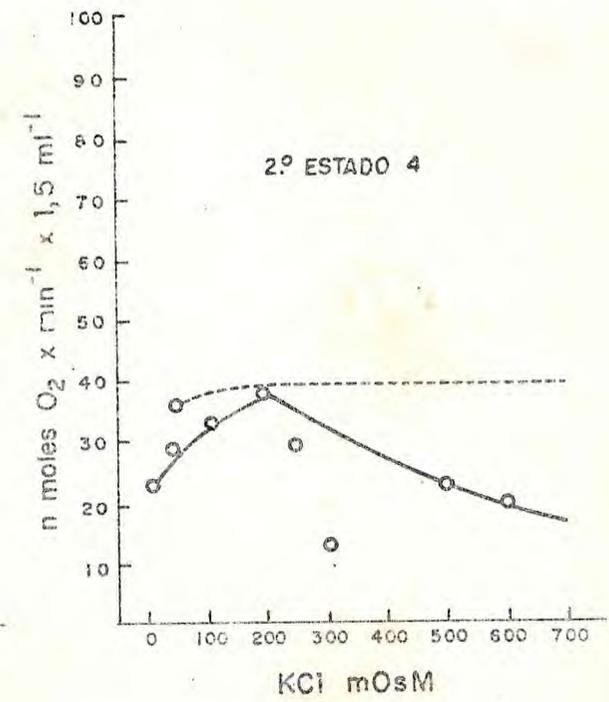
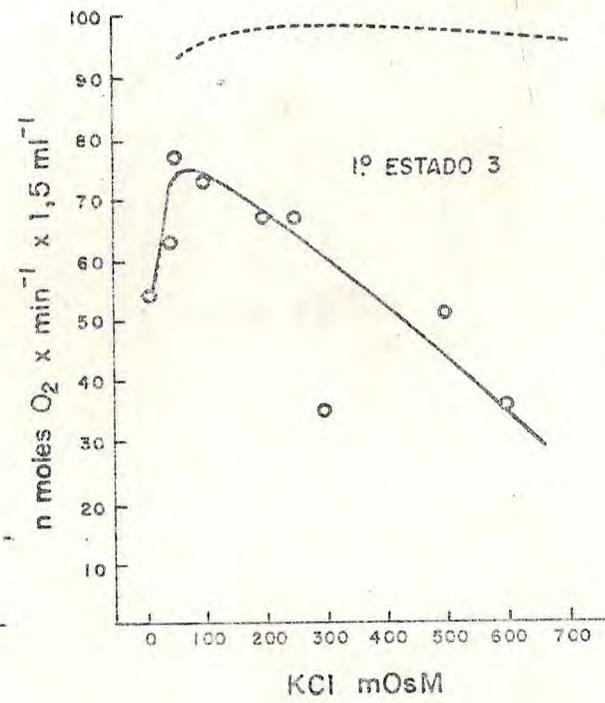
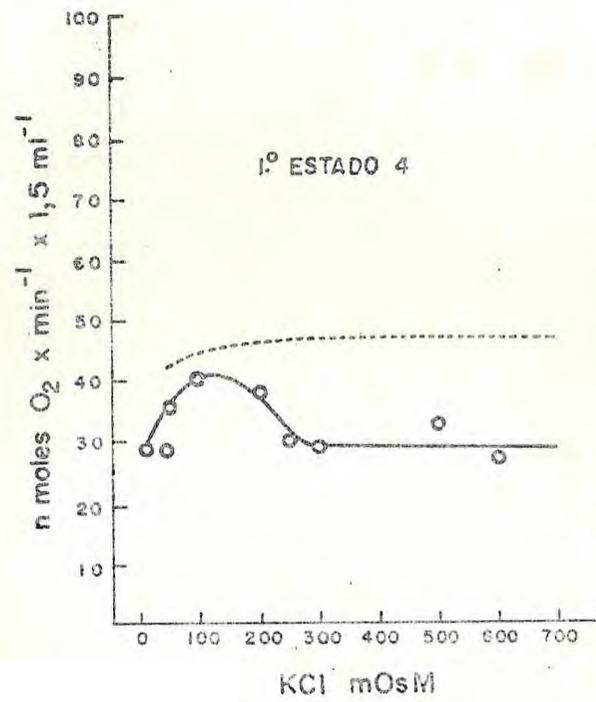


FIGURA 8 - Efeito do KCl in vitro na velocidade do consumo de O_2 em mitocôndrias oxidando succinato 13mM. A concentração de proteína foi de 1,2mg/1,5ml. A técnica de isolamento e a composição dos meios fosforilantes estão descritos em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores do consumo de O_2 , em presença de diferentes osmolaridades de manitol, foram normalizados para uma curva padrão, tomando-se como referência o valor da média dos controles específicos para o estudo do efeito do KCl. Os valores do controle expressam uma média de 3 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 , em meio de reação onde o manitol foi substituído por KCl. Os resultados expressam a média de 3 experiências (—).

as osmolaridades, porém esta inibição não foi uniforme. Na faixa de 50 a 100 mOsM verificou-se a menor inibição. Fora destes limites a inibição foi mais acentuada. No segundo estado 4, a velocidade de respiração foi ligeiramente inferior ao controle, na faixa de 0 a 200 mOsM, e acima desta osmolaridade foi fortemente inibida.

Verificou-se na FIGURA 9 que a respiração estimulada por ADP (estado 3-4), embora inibida em relação ao controle, aumentou em osmolaridades de KCl compreendidas entre 0 e 100 mOsM. Uma diminuição no consumo de oxigênio foi observada à proporção que a osmolaridade de KCl no meio de reação era aumentada. No tocante ao controle respiratório, ele se apresentou levemente inibido ao ser comparado ao controle, em toda a faixa de diferentes osmolaridades de KCl. A relação ADP/O apresentou-se ligeiramente superior ao controle, na faixa de 0 a 300 mOsM, acentuando-se a diferença acima desta osmolaridade.

Seguindo a mesma sequência de estudos feitos com NaCl e KCl, testou-se a ação do Na_2SO_4 em osmolaridade variável, no meio de reação. Como mostra a FIGURA 10, foram determinados os valores da respiração no 1º estado 4, no 1º estado 3 e no 2º estado 4, que decresceram à medida que a concentração do sal aumentava, relativamente ao controle, sendo mais evidente tal decrescimo nos valores do 1º estado 3.

A FIGURA 11 mostra que o Na_2SO_4 , quando comparado ao controle, acarretou uma inibição do consumo de oxigênio estimulado por ADP (1º estado 3 - 2º estado 4), nas diferentes osmolaridades utilizadas. No que se refere ao controle respiratório, a inibição foi evidenciada acima de 100 mOsM. No que tange a relação ADP/O, foi idêntica a do controle até 100 mOsM. Acima desta osmolaridade, foi progressivamente estimulada.

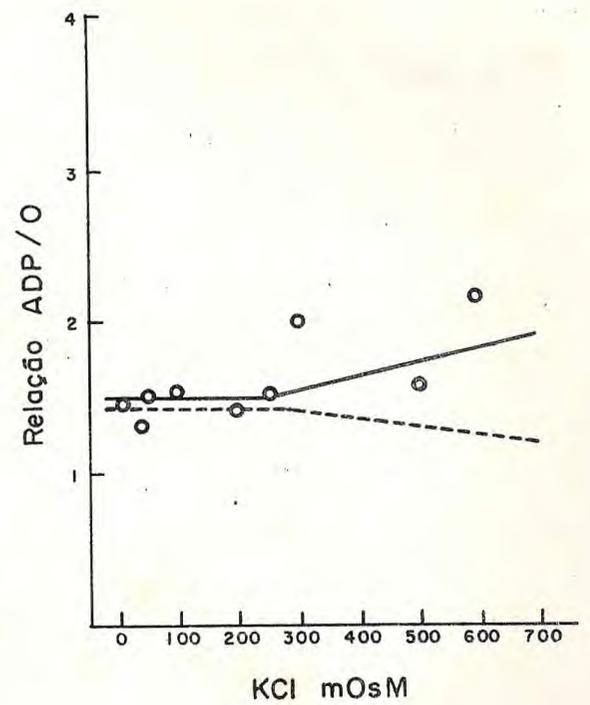
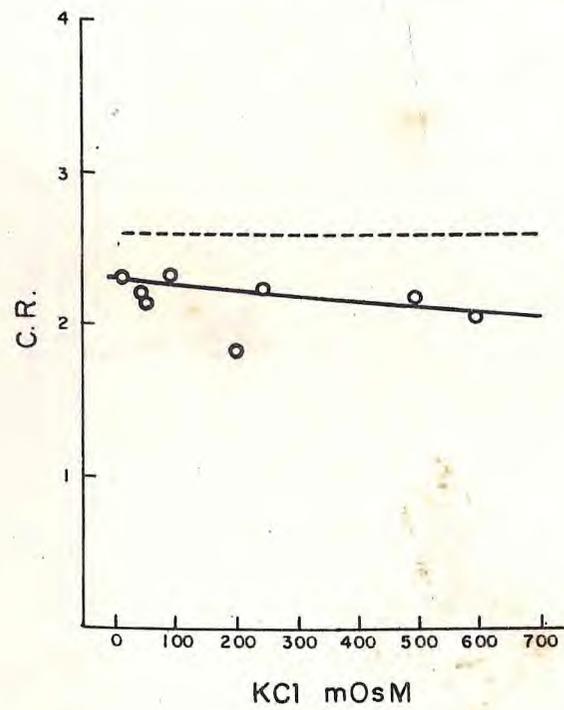
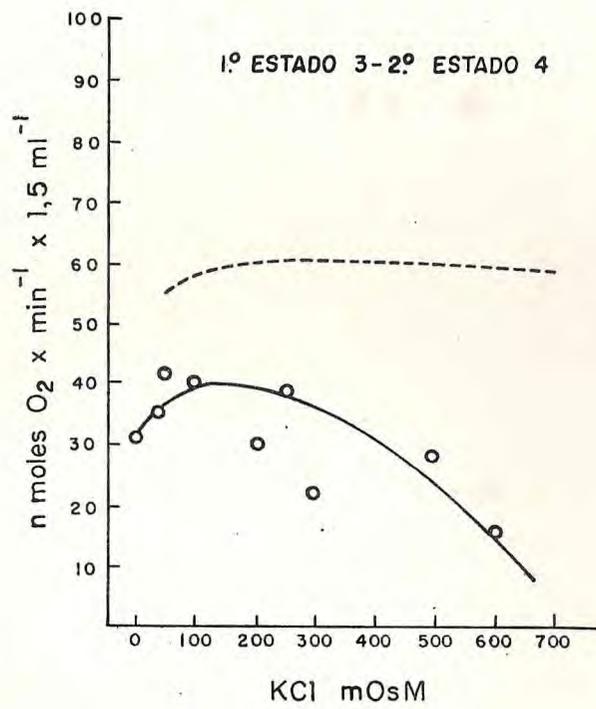


FIGURA 9 - Efeito do KCl in vitro na velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O de mitocôndrias em presença de succinato 13 mM. A concentração de proteína foi de 1,2mg/1,5ml. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O do controle com manitol, normalizados segundo indicação da legenda da FIGURA 8. Os dados representam a média de 3 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O em meio de reação onde o manitol foi substituído por KCl e expressam a média de 3 experiências (—).

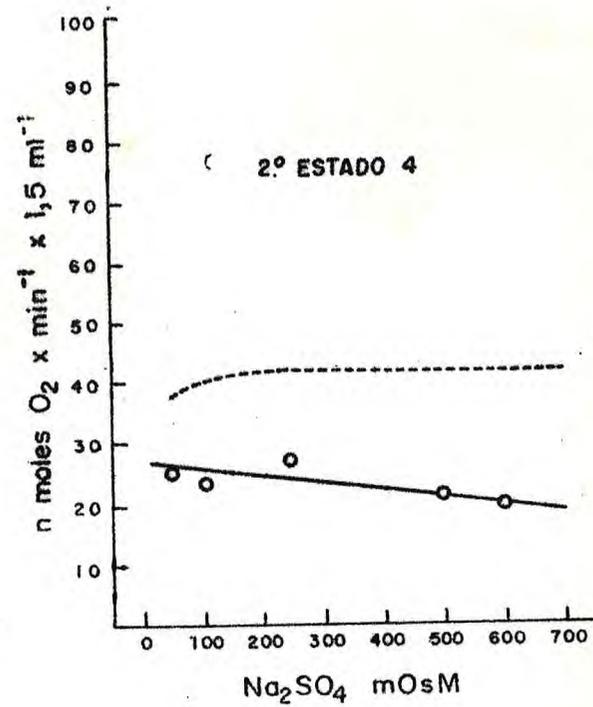
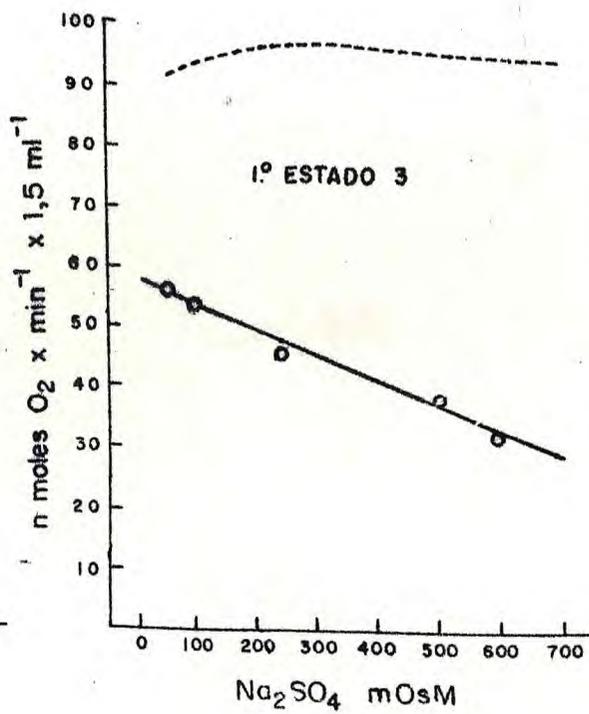
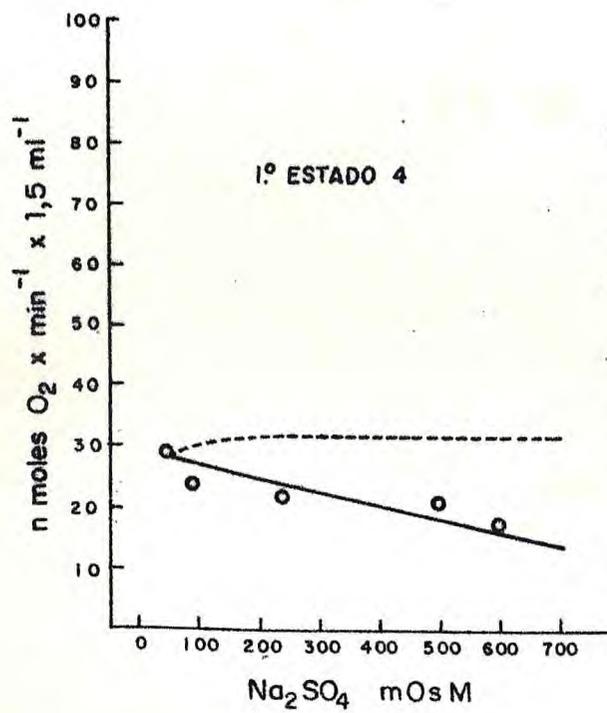


FIGURA 10 - Efeito do Na_2SO_4 in vitro na velocidade do consumo de O_2 em mitocôndrias oxidando succinato 13 mM. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml. A técnica de isolamento e a composição dos meios fosforilantes estão descritos em MATERIAL E MÉTODOS e legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores do consumo de O_2 , em presença de diferentes osmolaridades de manitol, normalizados para uma curva padrão, tomando-se como referência o valor da média dos controles específicos para o estudo do efeito do Na_2SO_4 . Expressam uma média de 3 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 em meio de reação onde o manitol foi substituído por Na_2SO_4 . Expressam a média de 3 experiências (—).

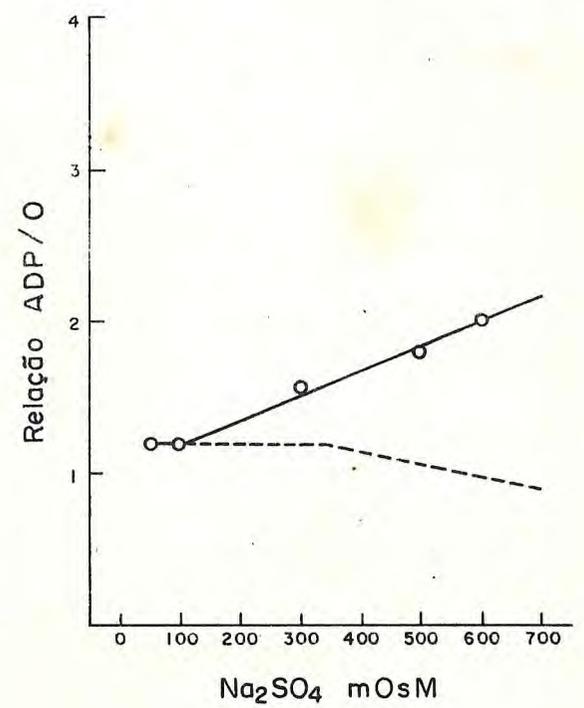
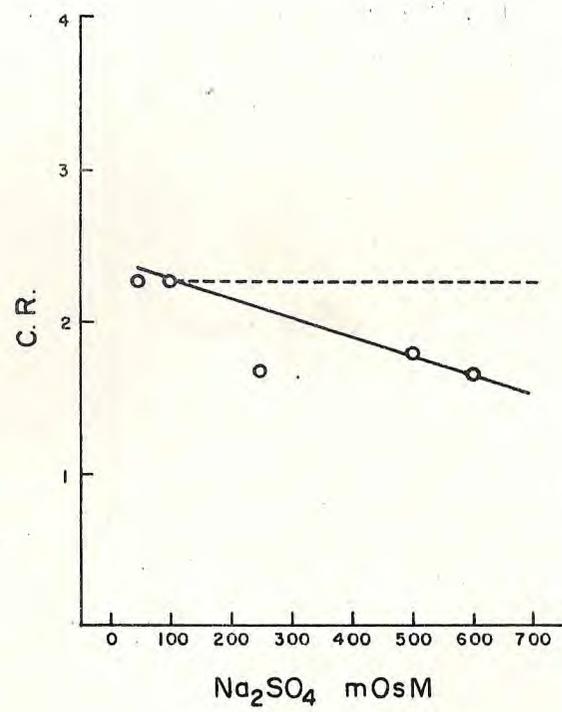
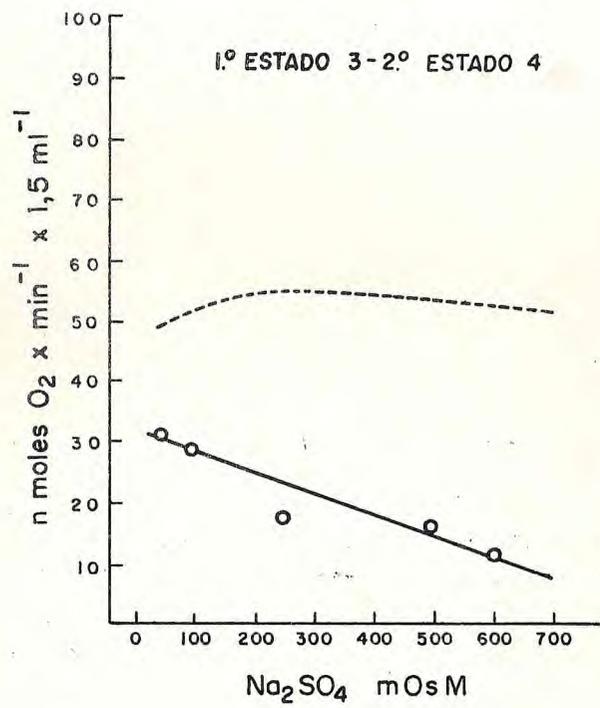


FIGURA 11 - Efeito do Na_2SO_4 in vitro na velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O de mitocôndrias em presença de succinato 13mM. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml. As condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O do controle com manitol, normalizados segundo indicação da legenda da FIGURA 10. Os dados representam a média de 3 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O em meio de reação onde o manitol foi substituído por Na_2SO_4 . Expressam a média de 3 experiências (—).

A FIGURA 12 ilustra a susceptibilidade à ação de NaCl (FIGURA 12B), KCl (FIGURA 12C) e Na_2SO_4 (FIGURA 12D) sobre os perfis representativos do consumo de oxigênio, de valores de controle respiratório e da relação ADP/O de mitocôndrias oriundas de hipocótilos de sementes germinadas em NaCl 0,1M, em presença de succinato como substrato. Verificou-se, através dos traçados polarográficos, que os diferentes sais provocaram uma diminuição nos valores do consumo de oxigênio na presença e ausência de ADP (estados 3 e 4) em relação ao controle, não exibindo, pois, maior resistência aos sais, pelo fato de as mitocôndrias serem isoladas de plântulas que se desenvolvem sob o "stress" salino. O controle respiratório apresentou-se inibido em presença de cada um dos sais utilizados, mas a relação ADP/O permaneceu constante.

A FIGURA 13 mostra a susceptibilidade à ação do NaCl, em diferentes osmolaridades, sobre os valores de 1º estado 4, 1º estado 3 e 2º estado 4 da respiração de mitocôndrias isoladas de plântulas desenvolvidas em meio salino, usando-se o succinato como substrato. A velocidade de respiração no 1º estado 4 foi levemente inibida pelo NaCl até 100 mOsM, tendo tal inibição se acentuado acima desta osmolaridade. A velocidade de respiração no 1º estado 3 foi inibida, relativamente ao controle, em todas as osmolaridades. Todavia, esta inibição foi mais acentuada abaixo de 100 mOsM e acima de 300 mOsM. No que tange ao 2º estado 4, apresentou-se inibida pela salinidade, acentuando-se esta inibição em valores de osmolaridades superiores a 300 mOsM.

A FIGURA 14 é indicativa da susceptibilidade ao NaCl, em diferentes osmolaridades, no consumo de oxigênio estimulado por ADP (1º estado 3 - 2º estado 4), no controle respiratório e na relação ADP/O pela fração mitocondrial nas mesmas condições da FIGURA 13 oxidando succinato. O NaCl provocou a inibição na velocidade respiratória estimulada por ADP nas diferentes osmolaridades, sendo esta inibição mais aparente em valores abaixo de 100 mOsM e acima de 300 mOsM,

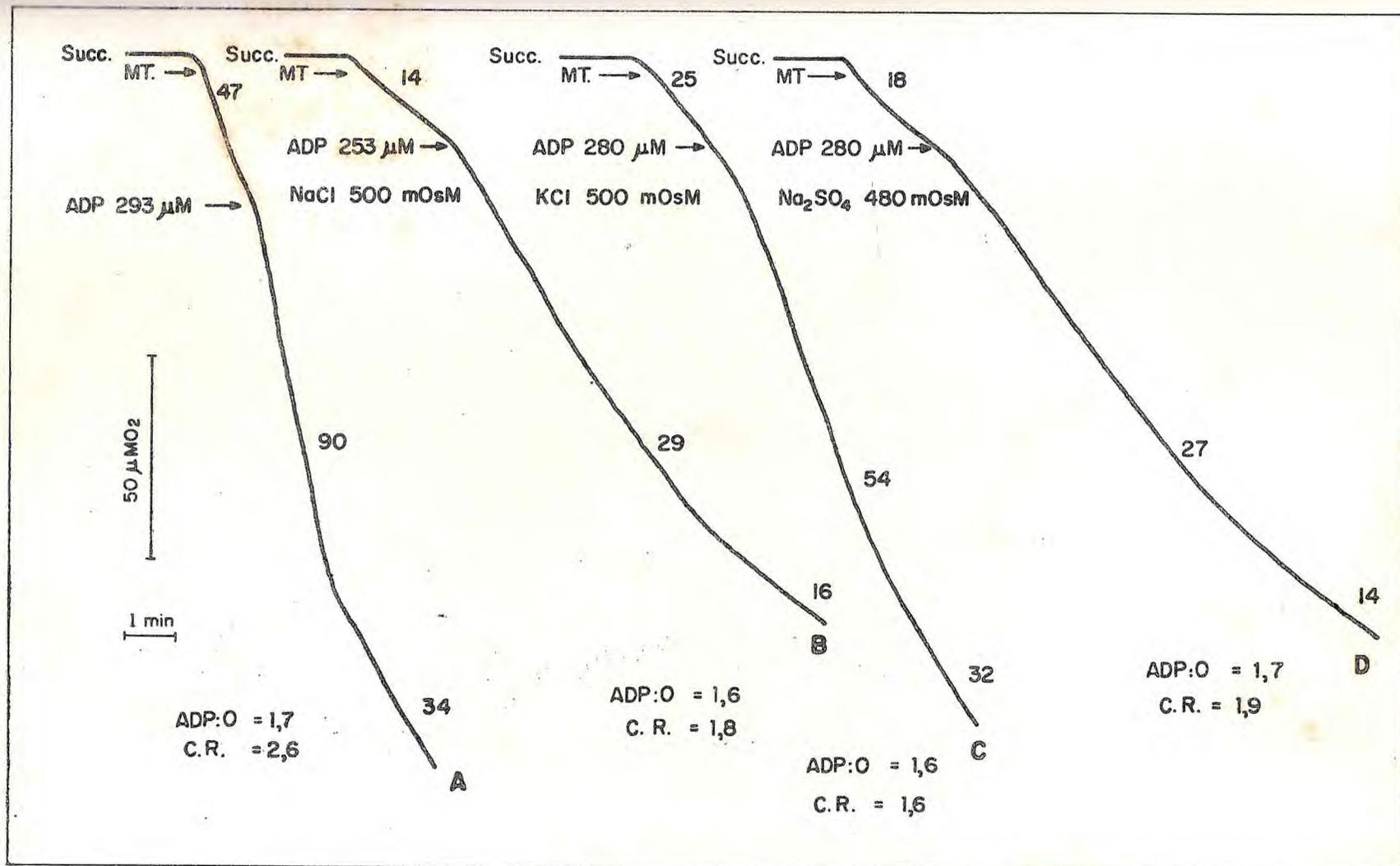


FIGURA 12 - Traçado polarográfico mostrando o efeito de NaCl, KCl e Na_2SO_4 , colocados diretamente em contacto com as mitocôndrias de plântulas germinadas em NaCl 0,1M. O meio de reação do controle (A) foi constituído de Manitol 0,3M; KCl 10mM; MgCl_2 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. O manitol foi substituído em (B) por NaCl 0,25M (500mOsM), em (C) por KCl 0,25M (500mOsM) e em (D) por Na_2SO_4 0,16M (480mOsM). A concentração de proteína foi de 1,3mg/1,5ml. O substrato utilizado foi o succinato 13mM e as condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e legendas da TABELA I e FIGURA 4.

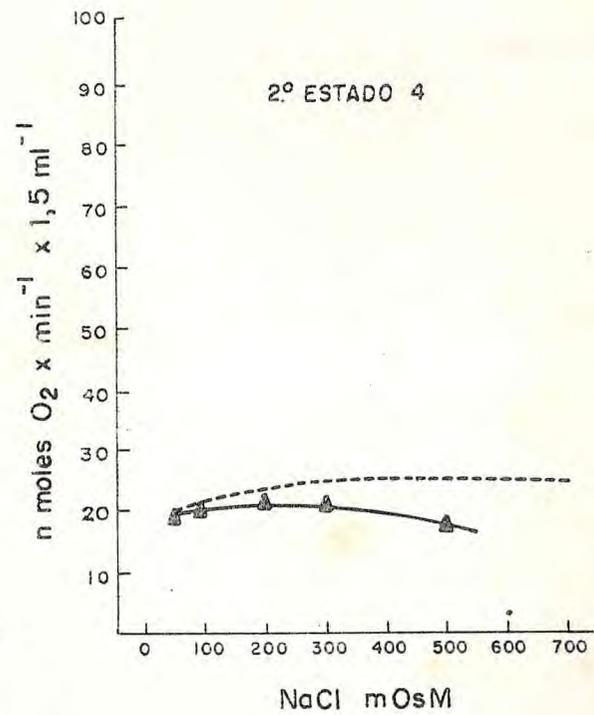
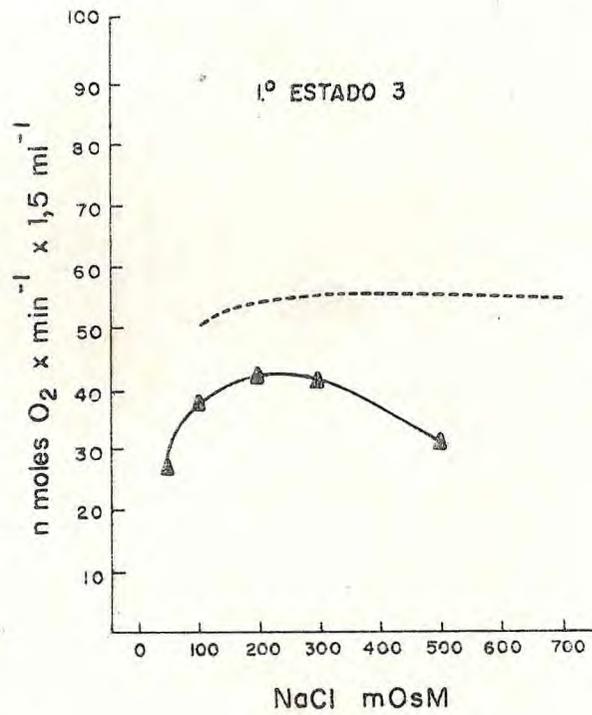
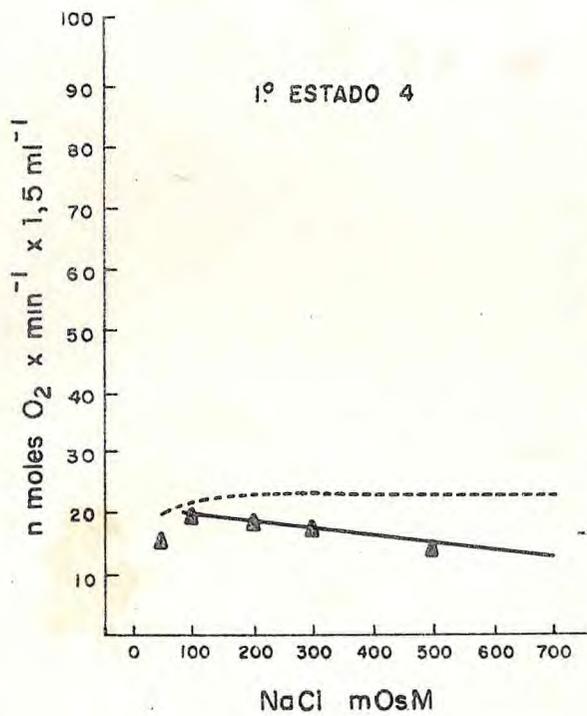


FIGURA 13 - Efeito do NaCl na velocidade do consumo de O_2 , quando colocado diretamente no meio de reação de uma preparação mitocondrial isolada de sementes germinadas em NaCl 0,1M. A concentração de proteína foi de 1,5mg/1,5ml e o substrato foi succinato 13mM. O meio de reação foi constituído de Manitol 0,3M; KCl 10mM; $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores do consumo de O_2 em presença de diferentes osmolaridades de manitol, que foram normalizados para uma curva padrão, tomando-se como referência o valor da média dos controles específicos para o estudo do efeito do NaCl. Os valores do controle expressam uma média de 2 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 em meio de reação onde o manitol foi substituído por NaCl. Os resultados expressam a média de 2 experiências (—).

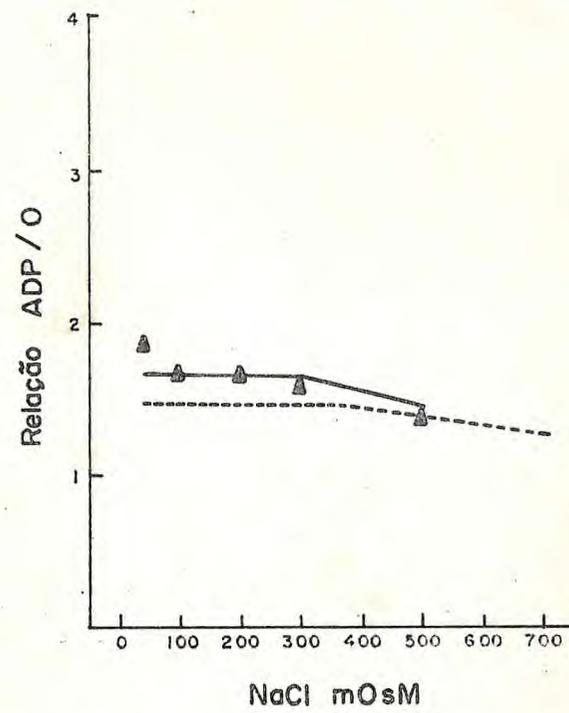
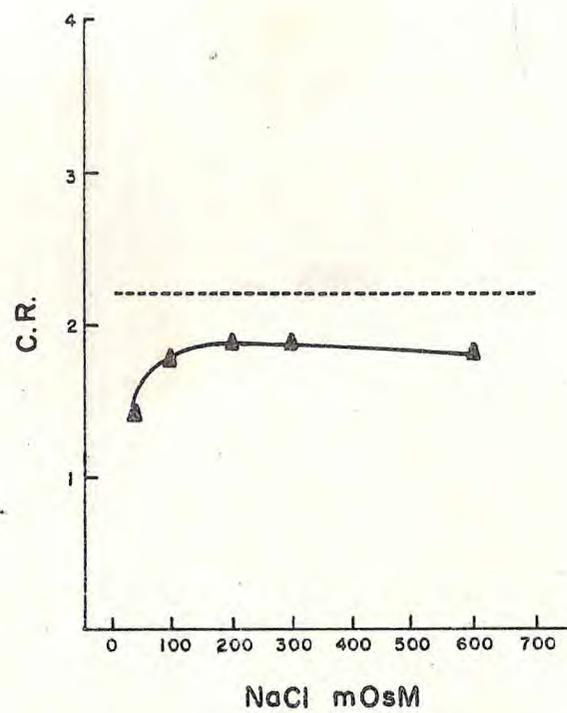
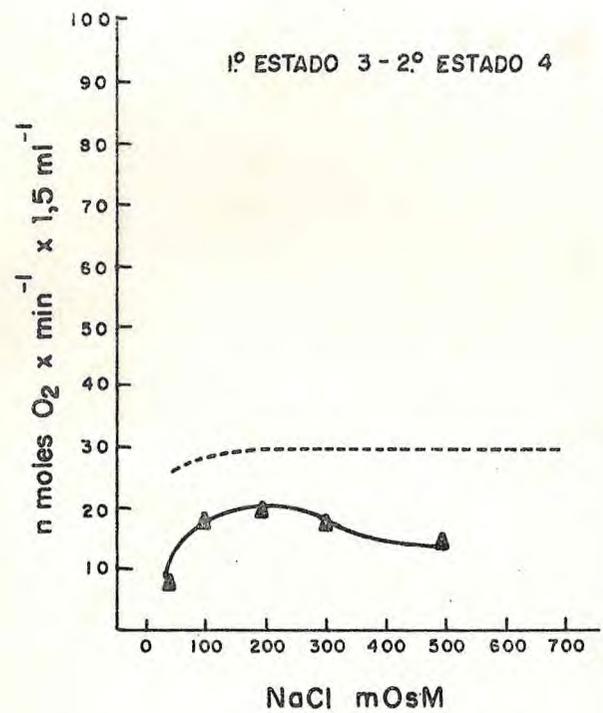


FIGURA 14 - Efeito do NaCl na velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O, quando colocado diretamente no meio de reação de uma preparação mitocondrial isolada de sementes germinadas em NaCl 0,1M. A concentração de proteína foi de 1,5mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13 mM. O meio de reação do controle foi constituído de Manitol 0,3M; KCl 10mM; $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores do consumo de O_2 , C.R. e relação ADP/O do controle com manitol, normalizados segundo indicação da legenda da FIGURA 13. Os valores do controle expressam uma média de 2 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 , C.R. e relação ADP/O em meio de reação onde o manitol foi substituído por NaCl. Os resultados expressam a média de 2 experiências (—).

relativamente aos valores do controle. Quanto ao controle respiratório, apresentou-se igualmente inibido pelas diferentes osmolaridades de NaCl, sendo que abaixo de 100 mOsM esta inibição foi mais acentuada em relação ao controle. A relação ADP/O foi ligeiramente superior ao controle até 300 mOsM. Acima desta osmolaridade, tendem a apresentar valores iguais ao controle.

Testou-se também o efeito de osmolaridade crescente de KCl sobre os parâmetros da atividade respiratória de mitocôndrias provenientes de plântulas germinadas em meio salino, utilizando succinato como substrato. A FIGURA 15 mostra que embora a fração mitocondrial apresentasse uma inibição na velocidade de respiração do 1º estado 4 em relação ao controle, esta inibição diminuía gradualmente com o aumento da osmolaridade, partindo de 100 mOsM até 300 mOsM de KCl, quando atingiu valores próximos aos do controle. Acima de 300 mOsM, aumentou a inibição da respiração neste estado. No 1º estado 3, o KCl provocou uma redução no consumo de oxigênio, comparado ao controle, havendo, entretanto, uma diminuição da inibição com o aumento da osmolaridade até 200 mOsM. Acima deste valor, a inibição foi mais pronunciada. A velocidade respiratória do 2º estado 4 mostrou-se também inibida ao ser comparada ao controle, sendo o aspecto geral da curva idêntico ao apresentado na vigência do 1º estado 3.

Através dos gráficos da FIGURA 16, verificou-se a influência do KCl em osmolaridades variáveis sobre a respiração estimulada por ADP, sobre o controle respiratório e sobre a relação ADP/O na fração mitocondrial em condições idênticas às da FIGURA 15. Usando-se o succinato como substrato oxidável, o consumo de oxigênio estimulado por ADP (estado 3 - estado 4) foi bastante inibido com relação ao controle, em todas as osmolaridades, sendo, contudo, a inibição menos acentuada no intervalo de 200 a 300 mOsM. O controle respiratório apresentou inibição que cresceu com o aumento da osmolaridade. A relação ADP/O permaneceu praticamente inalterada.

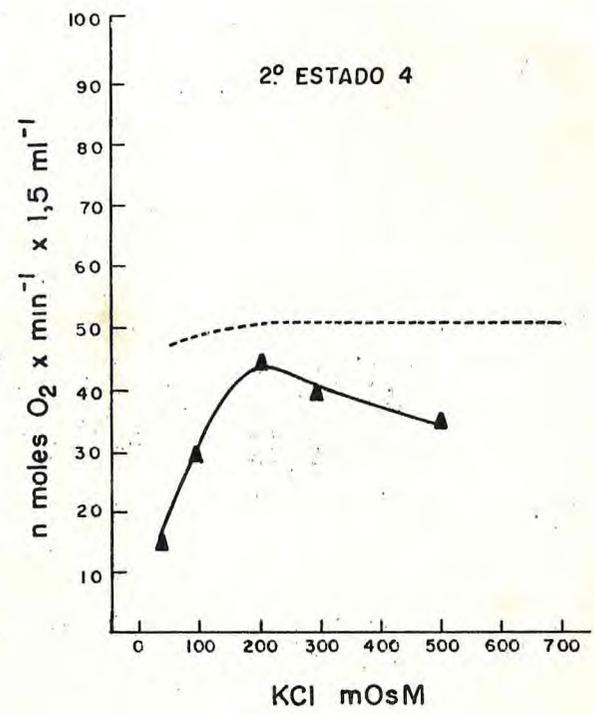
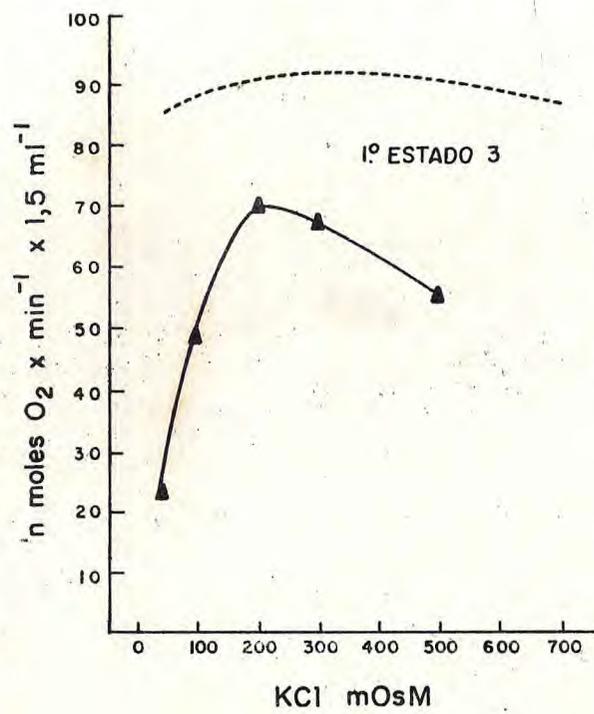
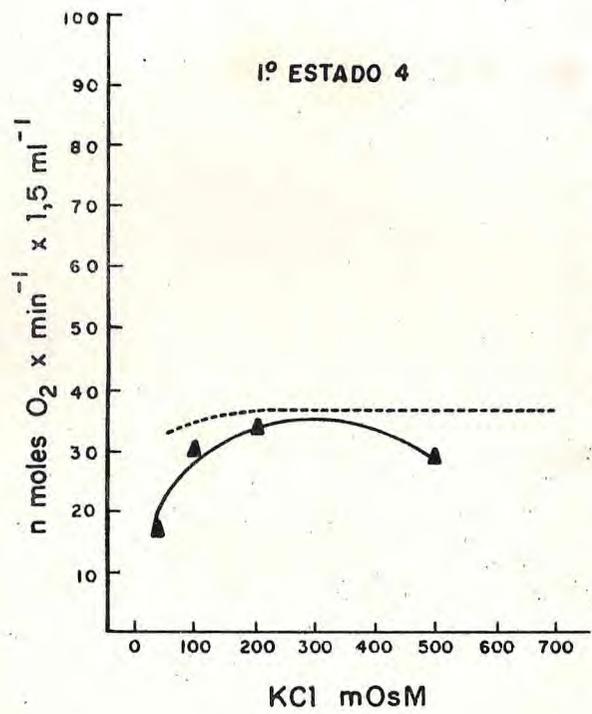


FIGURA 15 - Efeito do KCl na velocidade do consumo de O_2 , quando colocado diretamente no meio de reação de uma preparação mitocondrial isolada de sementes germinadas em NaCl 0,1M. A concentração de proteína foi de 1,0mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. O meio de reação do controle foi constituído de Manitol 0,3M; KCl 10mM; $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores de consumo de O_2 em presença de diferentes osmolaridades de manitol, que foram normalizados para uma curva padrão, tomando-se como referência o valor médio dos controles específicos para o estudo do efeito do KCl. Os valores do controle expressam uma média de 2 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 em meio de reação onde o manitol foi substituído por KCl. Os resultados expressam a média de 2 experiências (—).

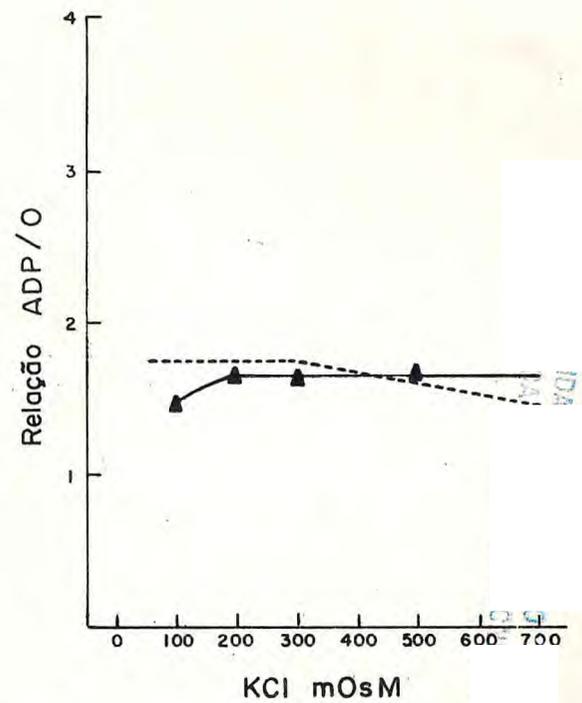
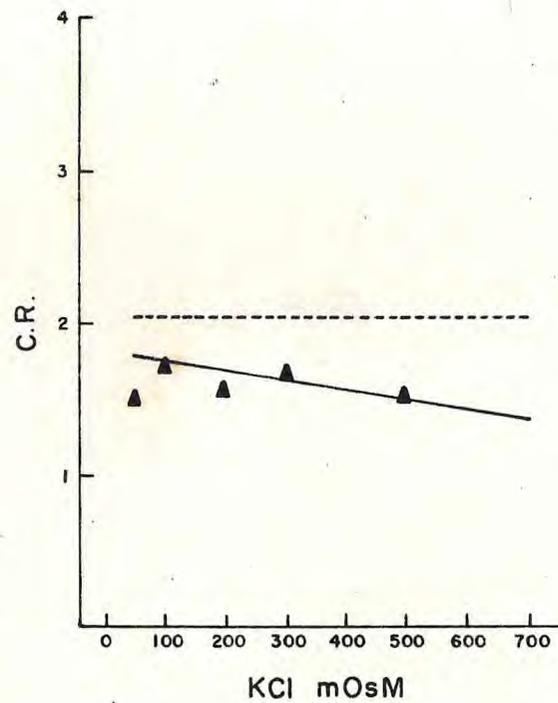
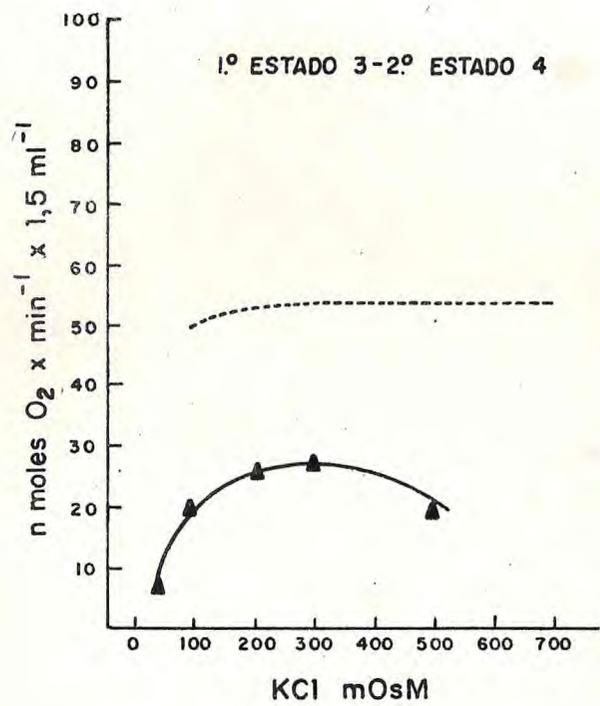


FIGURA 16 - Efeito do KCl sobre a velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O, quando colocado diretamente no meio de reação de uma preparação mitocondrial isolada de sementes germinadas em NaCl 0,1M. A concentração de proteína foi de 1,0mg/1,5ml e o substrato foi succinato 13 mM. O meio de reação do controle foi constituído de Manitol 0,3M; KCl 10mM; $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O do controle com manitol, normalizados segundo indicação da legenda da FIGURA 15. Os valores do controle expressam uma média de 2 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O em meio de reação onde o manitol foi substituído por KCl. Os resultados expressam a média de 2 experiências (—).

A FIGURA 17 expressa a susceptibilidade ao Na_2SO_4 do 1º estado 4, do 1º estado 3 e do 2º estado 4 de uma preparação mitocondrial isolada de plântulas provenientes de sementes germinadas em NaCl 0,1M, sendo o succinato utilizado como substrato. Os valores do consumo de oxigênio no 1º estado 4, no 1º estado 3 e no 2º estado 4 apresentaram-se inibidos com o aumento crescente da osmolaridade do Na_2SO_4 , em relação ao controle. A ação de osmolaridades crescentes do Na_2SO_4 sobre a respiração estimulada por ADP (estado 3-4), sobre o controle respiratório e sobre a relação ADP/O é mostrada na FIGURA 18, com a fração mitocondrial submetida às condições idênticas às da FIGURA 17, inclusive tendo o succinato como substrato. A respiração estimulada por ADP apresentou-se inibida, sendo porém menor a inibição no intervalo de 100 a 150 mOsM. O controle respiratório foi inibido pela osmolaridade crescente, relativamente ao controle, porém a inibição foi menos acentuada entre 100 e 300 mOsM. A relação ADP/O se manteve próxima ao controle, especialmente em osmolaridades superiores a 300 mOsM.

O estudo da dissociação dos efeitos osmóticos dos iônicos, dos diferentes sais, foi feito em mitocôndrias isoladas de hipocótilos de sementes germinadas em água, e o substrato utilizado foi o succinato. A fração mitocondrial foi mantida em condições isotônicas com manitol 0,3M e a esta preparação foram adicionados NaCl , KCl ou Na_2SO_4 . Quando a osmolaridade de NaCl era inferior a 20 mOsM, a fração mitocondrial exibia um leve aumento da respiração no 1º estado 4 (FIGURA 19), que diminuía em osmolaridades superiores, atingindo valores próximos aos do controle. No tocante ao 2º estado 4, (FIGURA 19) verificou-se um aumento do consumo de oxigênio em relação ao controle, até 35 mOsM de NaCl , e que se manteve constante até atingir 330 mOsM de NaCl . A respiração estimulada por ADP (estado 3-4) e o controle respiratório estão ilustrados na FIGURA 20. Verificou-se um aumento do controle respiratório e do consumo de oxigênio

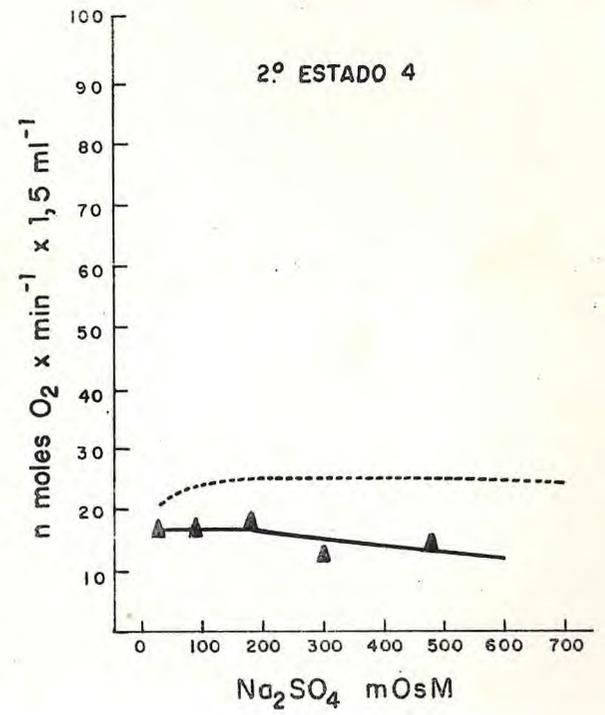
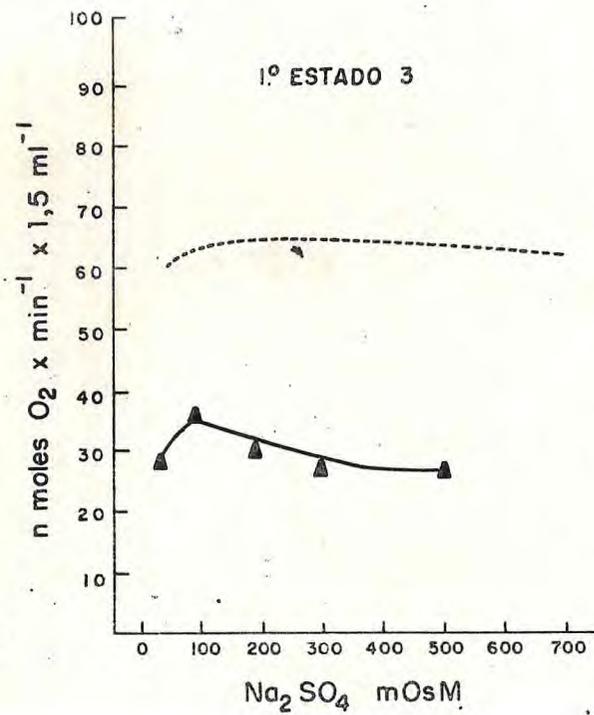
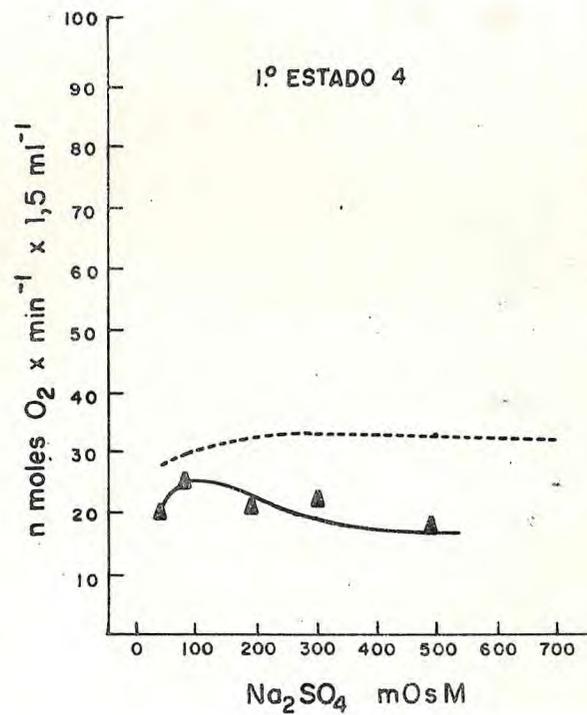


FIGURA 17 - Efeito do Na_2SO_4 na velocidade do consumo de O_2 , quando colocado diretamente no meio de reação de uma preparação mitocondrial isolada de sementes germinadas em NaCl 0,1M. A concentração de proteína foi de 1,0mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. O meio de reação do controle foi constituído de Manitol 0,3M; KCl 10mM; MgCl_2 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores de consumo de O_2 em presença de diferentes osmolaridades de manitol, que foram normalizados para uma curva padrão, tomando-se como referência o valor médio dos controles específicos para o estudo do efeito do Na_2SO_4 . Os valores do controle expressam uma média de 2 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 em meio de reação onde o manitol foi substituído por Na_2SO_4 . Os resultados expressam a média de 2 experiências (—).

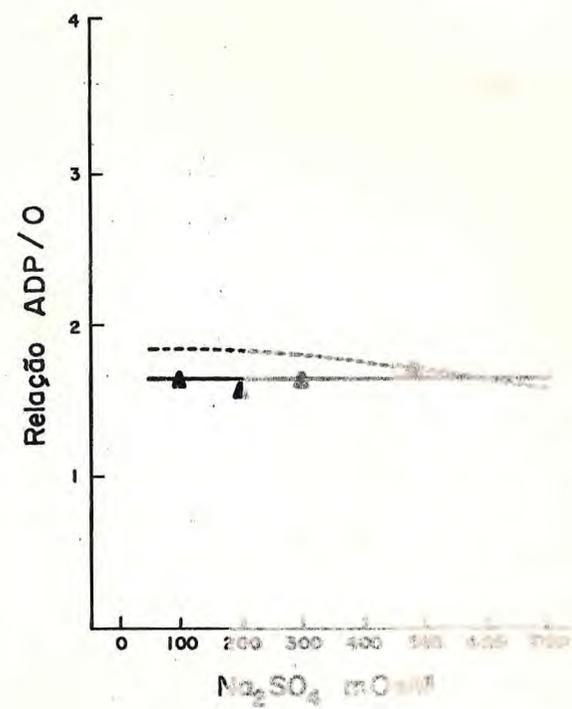
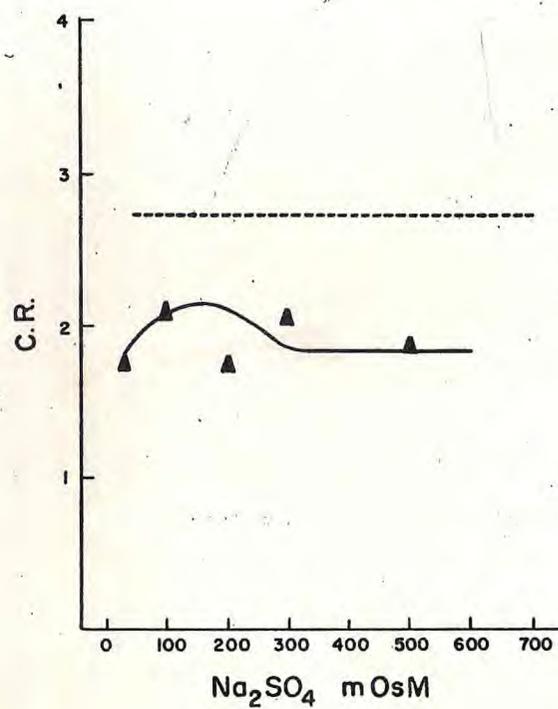
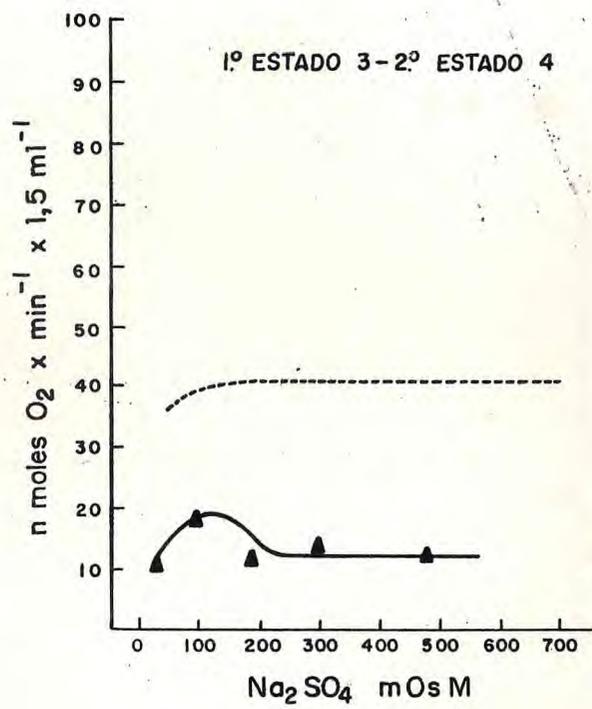


FIGURA 18 - Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade do consumo de O_2 no estado 3-4, no C.R. e na relação ADP/O quando colocado diretamente no meio de reação de uma preparação mitocondrial isolada de sementes germinadas em NaCl 0,1M. A concentração de proteína foi de 1,0mg/1,5ml e o substrato foi succinato 13mM. O meio de reação do controle foi constituído de Manitol 0,3M; KCl 10mM; MgCl_2 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. As demais condições experimentais estão descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O do controle com manitol, normalizados segundo indicação da legenda da FIGURA 17. Os valores do controle expressam a média de 2 experiências (---).

Valores de consumo de O_2 , de C.R. e relação ADP/O em meio de reação onde o manitol foi substituído por Na_2SO_4 . Os resultados expressam a média de 2 experiências (—).

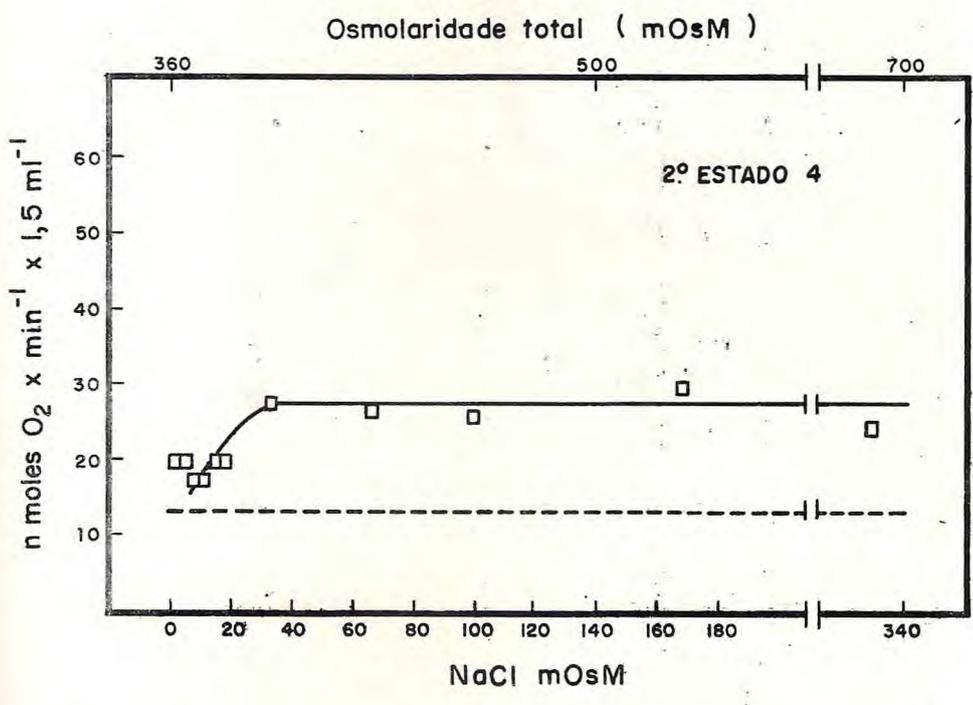
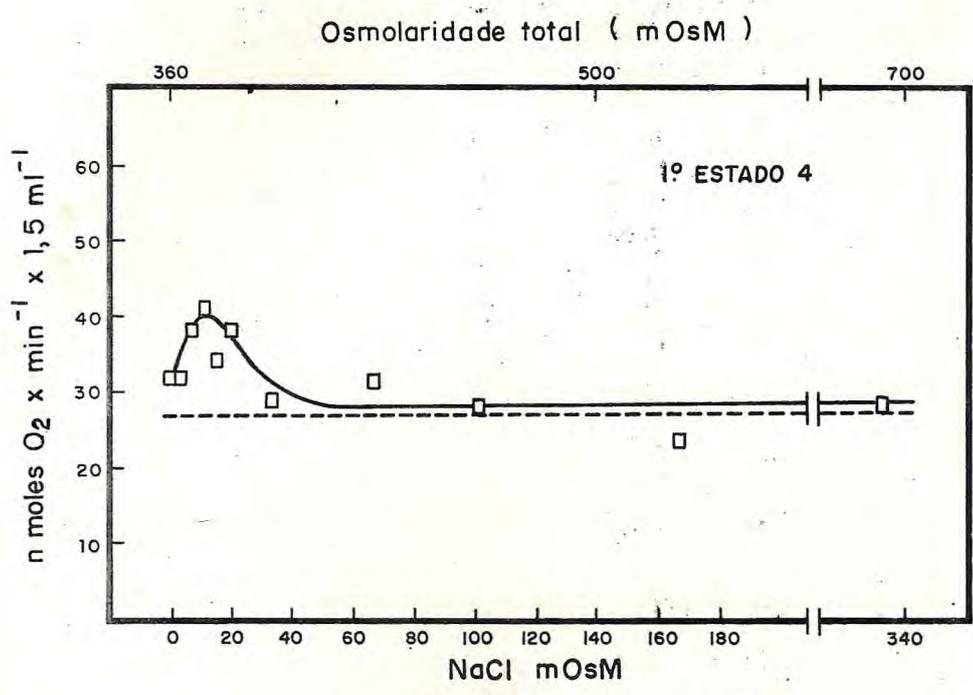


FIGURA 19 - Efeito do NaCl sobre a velocidade do consumo de O_2 no 1º e 2º estados 4 na fração mitocondrial isolada de sementes germinadas em água, quando o sal foi colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais NaCl em osmolaridade variável, e os dados representam uma média de 4 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

FIGURA 20 - Efeito do NaCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no estado 3-4 e C.R. da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação em superposição ao efeito do manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais NaCl em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 4 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

no estado 3-4, provocado pelo NaCl até 10 mOsM. Acima desta osmolaridade, o NaCl acarretou uma diminuição progressiva destes parâmetros, atingindo valores inferiores aos do controle, e que se mantiveram constantes até 330 mOsM. No que se refere ao 1º estado 3 (FIGURA 21), observou-se que o NaCl provocou um estímulo na respiração mitocondrial vigente neste estado, em osmolaridades compreendidas entre 0 e 10 mOsM, decrescendo em seguida, linearmente, até atingir valores semelhantes aos do controle. Pode-se verificar que a fosforilação não foi afetada pelas diferentes osmolaridades do sal, em virtude da constância dos valores da relação ADP/O (FIGURA 21).

O ligeiro aumento do consumo de oxigênio em presença de KCl no 1º e 2º estados 4 (FIGURA 22), não pareceu ser significativo, indicando que este sal não teria influência sobre tais parâmetros. A FIGURA 23 mostra que o consumo de oxigênio estimulado por ADP (estado 3-4) permaneceu inalterado até, aproximadamente, 120 mOsM, e acima desta osmolaridade foi inibido pelo KCl. No que tange ao controle respiratório, verificou-se que este foi progressivamente inibido pelo sal. Já os resultados obtidos para o 1º estado 3 e relação ADP/O (FIGURA 24) foram comparáveis àqueles encontrados para o controle, não sendo alterados pela osmolaridade crescente de KCl.

Foi testado, também, o efeito de osmolaridades crescentes do Na_2SO_4 sobre a fração mitocondrial em condições idênticas as das FIGURAS 19, 20, 21, 22, 23, e 24. O consumo de oxigênio no 1º e 2º estados 4 (FIGURA 25) apresentou variações que podem ser considerados desprezíveis, e, por conseguinte, iguais às observadas no controle. Entretanto, o consumo de oxigênio estimulado por ADP (estado 3-4) (FIGURA 26) permaneceu inalterado até, aproximadamente, 80 mOsM. Em osmolaridades superiores, ele foi fortemente inibido. As diferentes osmolaridades de Na_2SO_4 utilizadas foram suficientes para inibir também o controle respiratório (FIGURA 26). Na vigência do estado 3

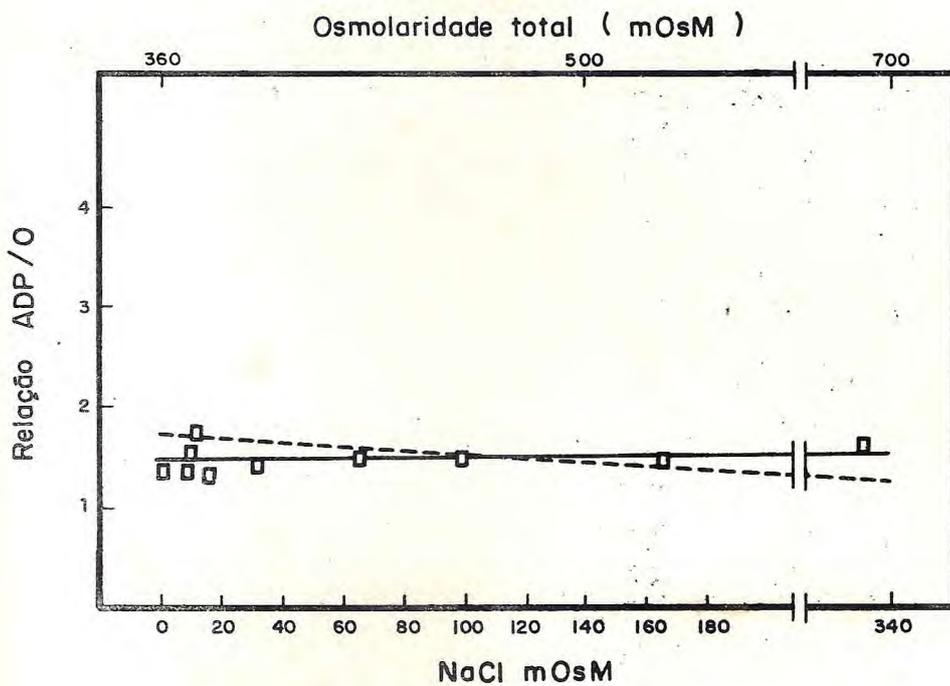
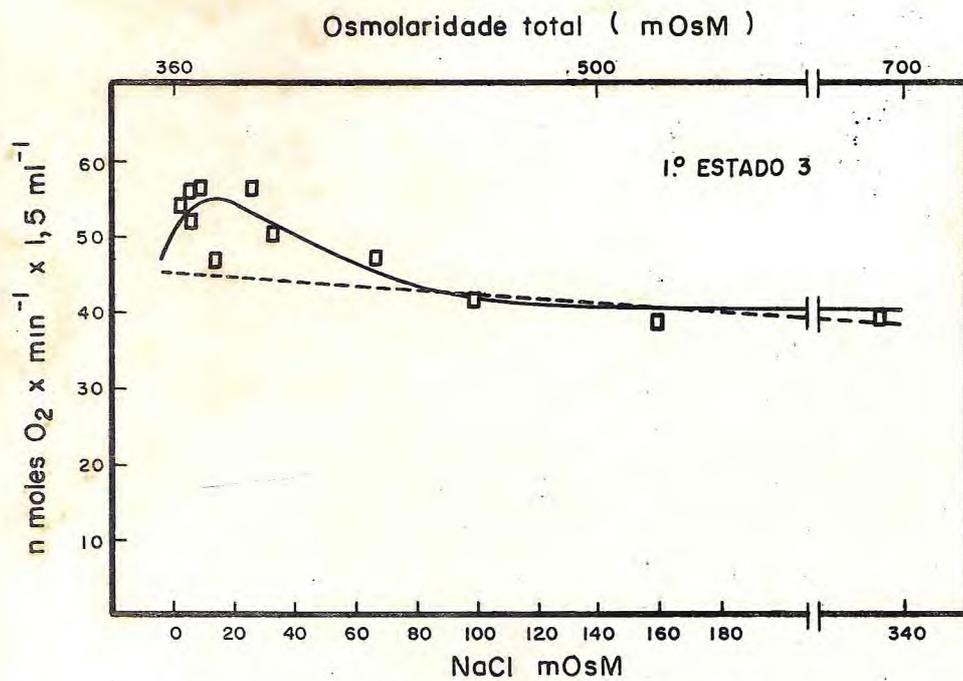


FIGURA 21 - Efeito do NaCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no 1º estado 3 e na relação ADP/O da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais NaCl em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 4 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

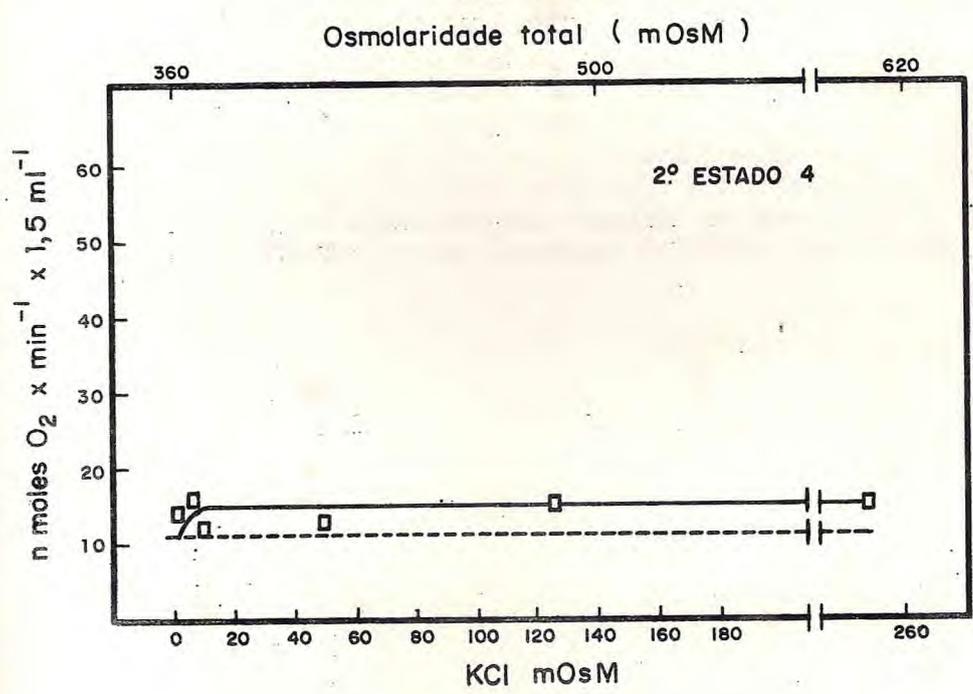
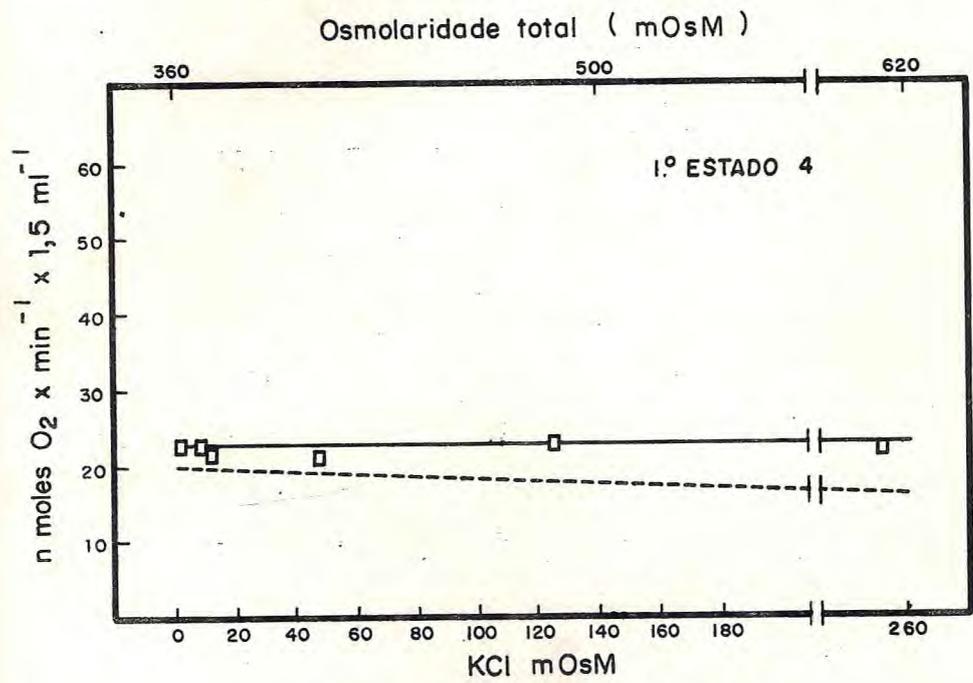


FIGURA 22 - Efeito do KCl sobre a velocidade de consumo de O_2 nos 1º e 2º estados 4 da fração mitocondrial isolada de sementes germinadas em água, quando o sal foi colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais KCl em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 2 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

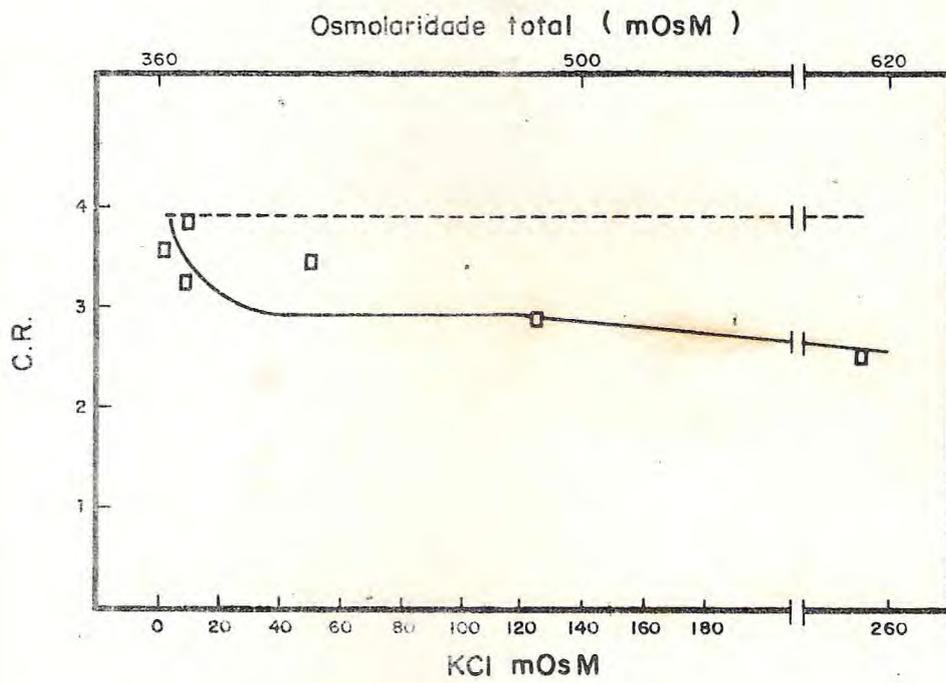
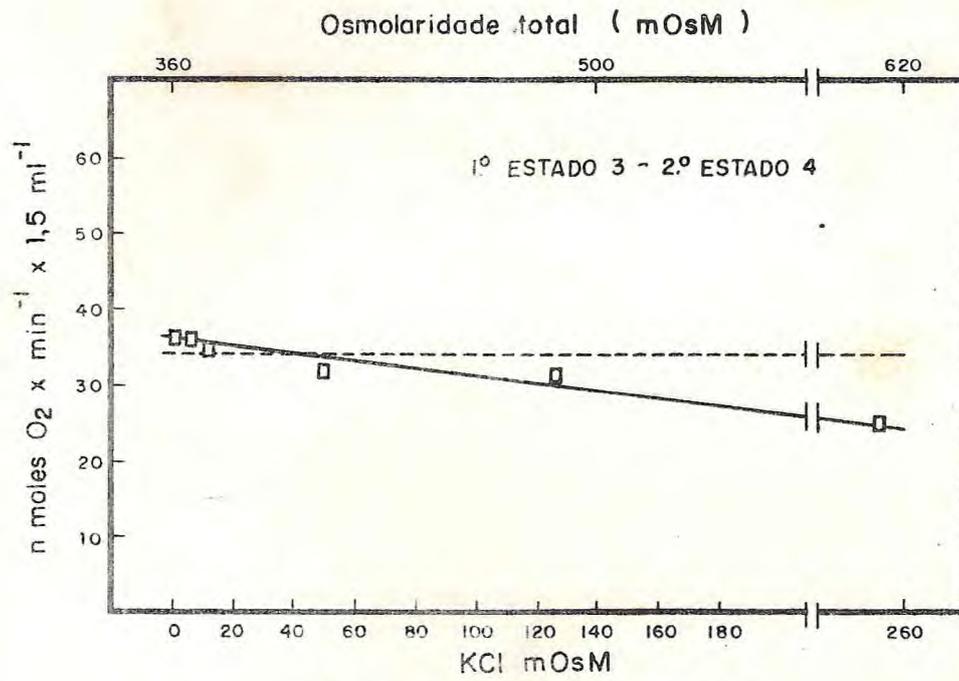


FIGURA 23 - Efeito do KCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no estado 3-4 e C.R. da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao efeito do manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais KCl em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 2 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

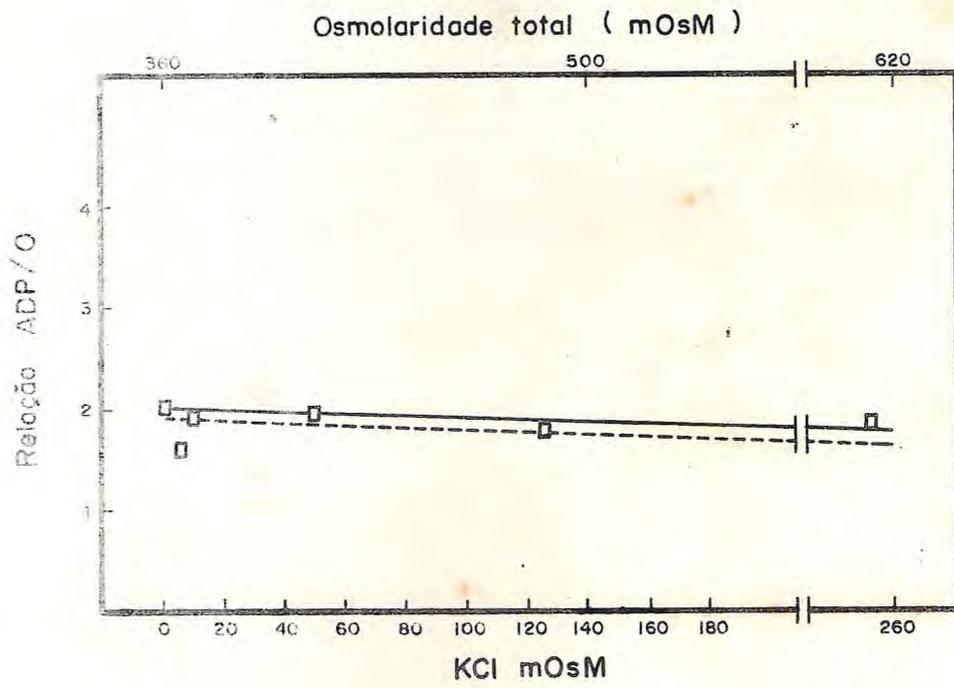
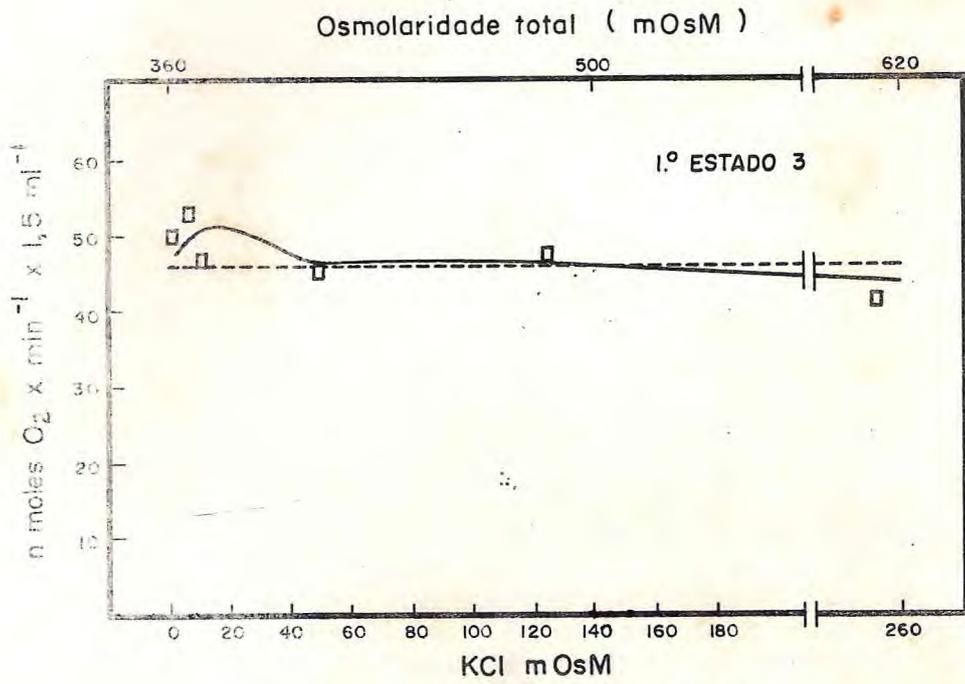


FIGURA 24 - Efeito do KCl sobre a velocidade de consumo de O_2 no 1º estado 3 e na relação ADP/O da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao manitol. O meio de reação do controle (----) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, $MgCl_2$ 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo informações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais KCl em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 2 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

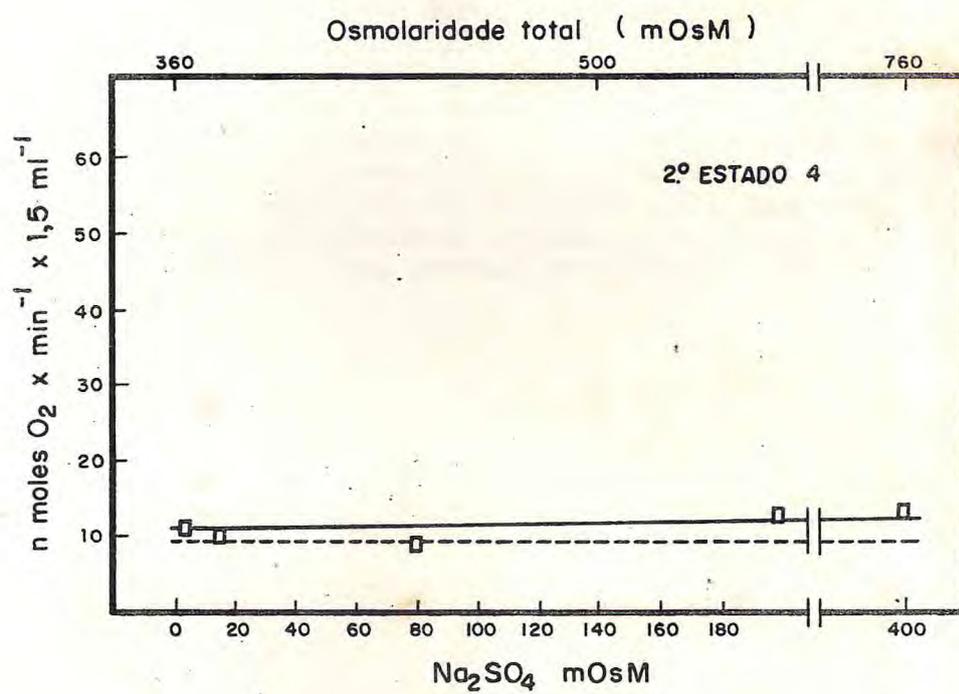
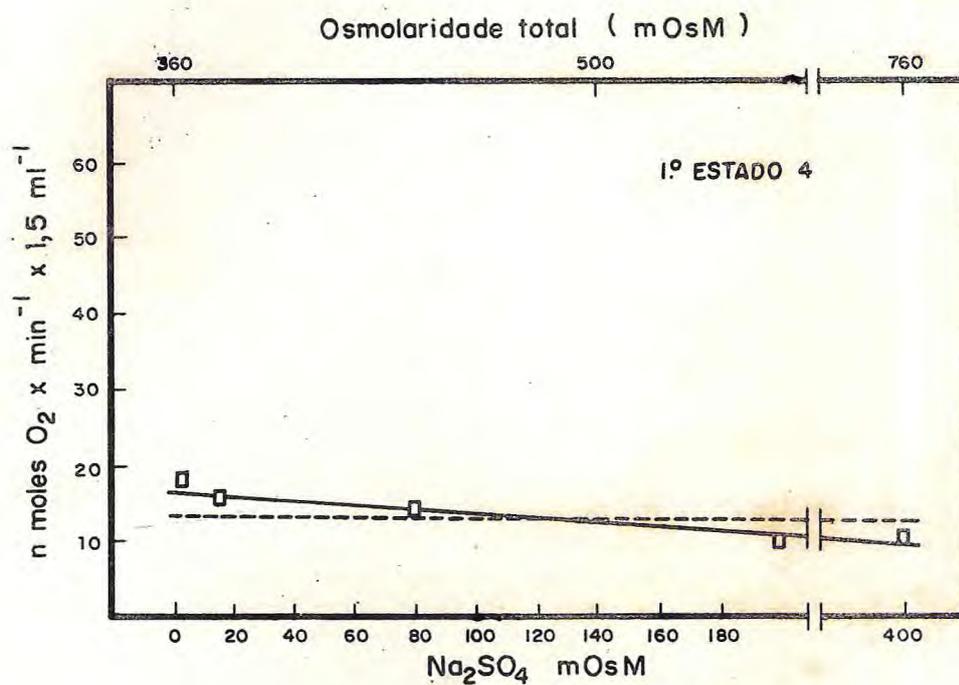


FIGURA 25 - Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade de consumo de O_2 nos 1º e 2º estados 4 da fração mitocondrial isolada de sementes germinadas em água, quando o sal foi colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, MgCl_2 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais Na_2SO_4 em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 2 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

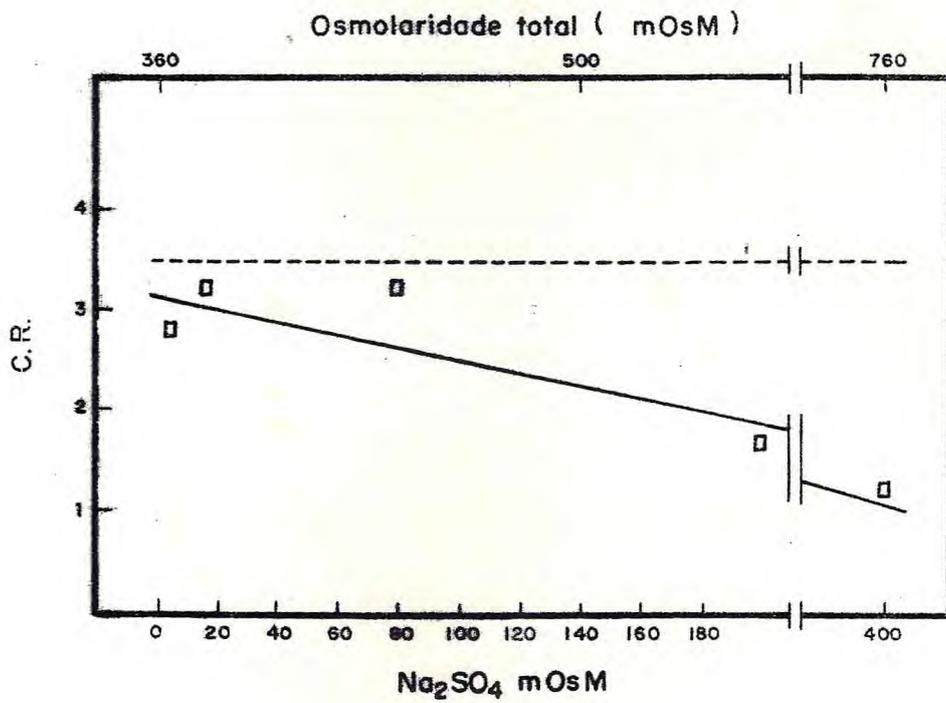
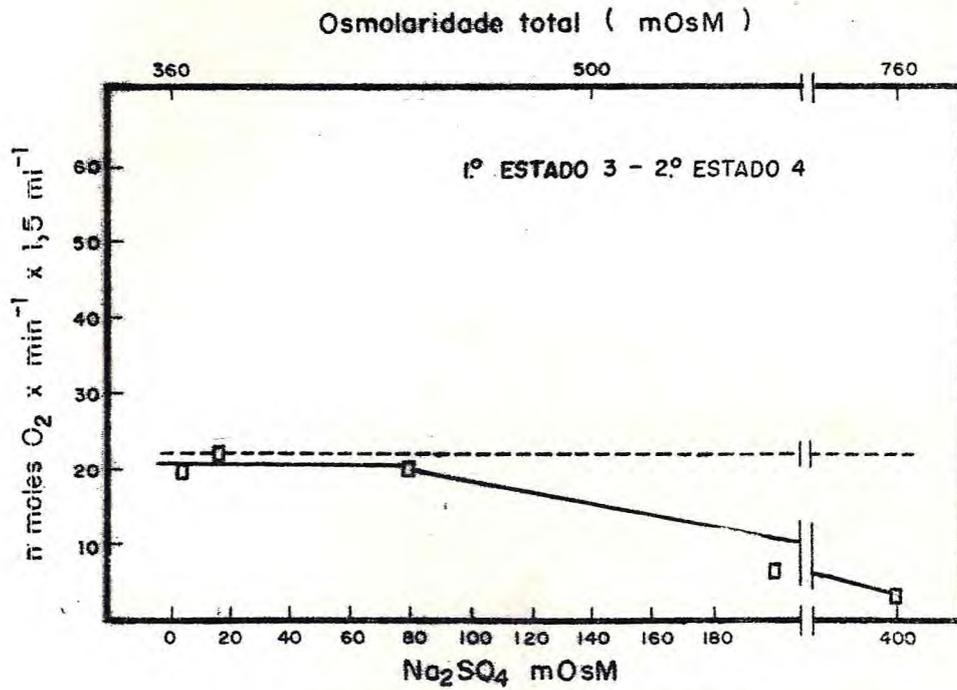


FIGURA 26 - Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade de consumo de O_2 no estado 3-4 e C.R. da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, MgCl_2 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais Na_2SO_4 em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 2 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi o succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

(FIGURA 27), o consumo de oxigênio permaneceu inalterado até, aproximadamente, 80 mOsM em relação aos resultados observados no controle. Acima desta osmolaridade, houve uma redução do mesmo. Por outro lado, a fosforilação não foi afetada até 80 mOsM pelo Na_2SO_4 , mas, à proporção que a osmolaridade crescia, houve um progressivo aumento da mesma, indicado pelos valores de ADP/O (FIGURA 27).

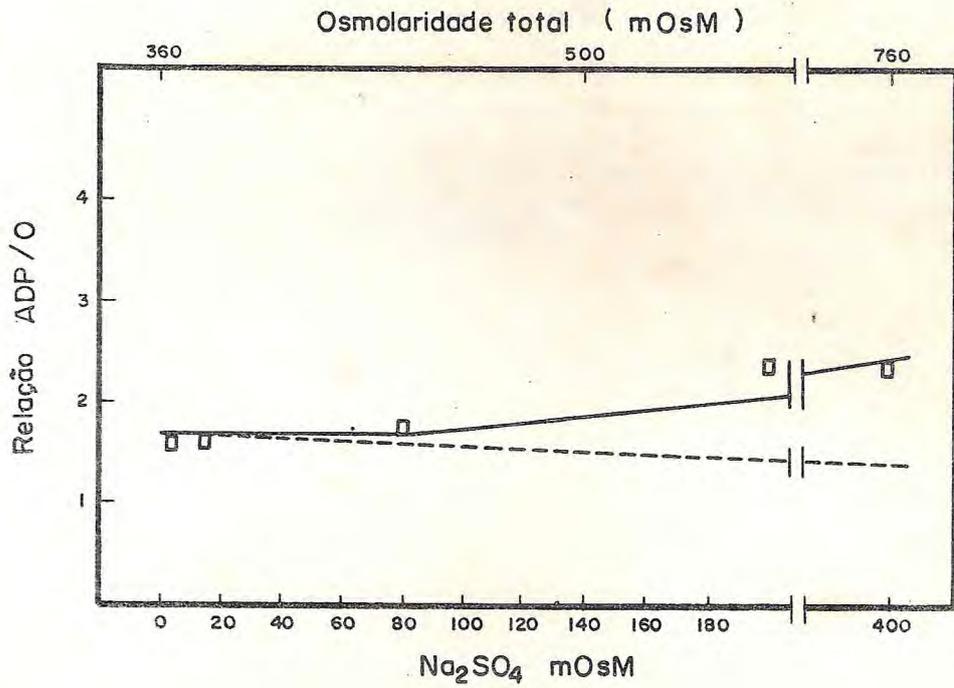
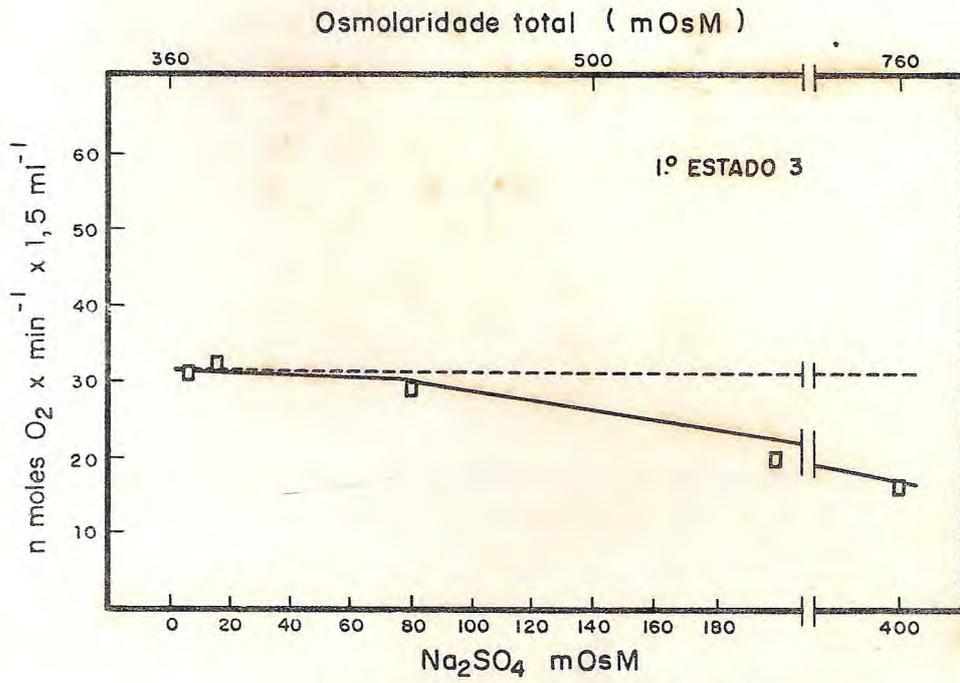


FIGURA 27 - Efeito do Na_2SO_4 sobre a velocidade de consumo de O_2 no 1º estado 3 e na relação ADP/O da fração mitocondrial, quando colocado diretamente no meio de reação, em superposição ao manitol. O meio de reação do controle (---) continha Manitol 0,3M, KCl 10mM, MgCl_2 6mM e Tampão Fosfato 10mM, pH 7,2. Os resultados foram normalizados segundo indicações expressas na legenda da FIGURA 6 e representam uma média de 2 experiências. O meio de reação para o estudo do efeito salino (—) tinha a mesma composição do controle, mais Na_2SO_4 em osmolaridade variável. Os dados representam uma média de 2 experiências. A concentração de proteína foi de 1,8mg/1,5ml e o substrato foi succinato 13mM. Condições experimentais segundo as descritas em MATERIAL E MÉTODOS e nas legendas da TABELA I e FIGURA 4.

DISCUSSÃO

É amplamente conhecido que a salinidade inibe a germinação de sementes (UHVITS 1946, STROGONOV 1964; PRISCO & O'LEARY 1970a). Esta inibição deve-se, principalmente, aos efeitos exercidos sobre o crescimento do eixo embrionário (PRISCO & O'LEARY 1970b). Como as células deste órgão necessitam da energia metabólica liberada durante a respiração celular acoplada ao processo fosforilativo de ADP, poder-se-ia esperar que uma inibição de 50% no crescimento das plântulas, provocada pela salinidade, acarretasse não apenas uma diminuição na atividade respiratória, como também na atividade fosforilante da fração mitocondrial.

No presente estudo, utilizando-se mitocôndrias provenientes de hipocótilos de feijão de corda pitiúba (*Vigna sinensis* (L.) Savi), germinadas em água (controle) e em NaCl, verificou-se que houve inibição do consumo de oxigênio no 1º estado 4 (TABELA I, TABELA II e FIGURAS 4B e 4D) em presença de succinato e L-malato. Já a velocidade do consumo de oxigênio no 2º estado 4 (TABELA I, TABELA II e FIGURAS 4B e 4D) apresentou-se inibida com o succinato e aumentada com o L-malato. Foi também inibida a taxa do controle respiratório (TABELA I, TABELA II, FIGURAS 4B e 4D) e o estado 3-4 (TABELA I, TABELA II, FIGURAS 4B e 4D). A relação ADP/O aumentou em mitocôndrias provenientes de plântulas submetidas a tratamento salino, quando o substrato utilizado foi o succinato, e permaneceu inalterada quando o substrato foi o L-malato (TABELA I, TABELA II, FIGURAS 4B e 4D). Estes resultados referentes ao consumo de oxigênio podem ser interpretados como devidos à influência do NaCl em sistemas enzimáticos relacionados com a atividade mitocondrial, uma vez que a salinidade inibe a atividade de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (PORATH & POLJAKOFF-MAYBER, 1964; 1969; FLOWERS & HANSON, 1969; KALIR & POLJAKOFF-MAYBER, 1975). A aparente discrepância entre os dados aqui apresentados e os obtidos por LIVNE & LEVIN (1967), que observaram

um aumento do consumo de oxigênio provocado pela salinidade, explica-se pelos baixos níveis de sal por eles utilizados, uma vez que a inibição respiratória logo se evidencia quando a salinidade aumenta. Como os substratos oxidados pelas mitocôndrias foram succinato (TABELA I e FIGURA 4B) e L-malato (TABELA II e FIGURA 4D), admite-se que a inibição provocada pela salinidade in vivo, nos diferentes estados metabólicos, é devida a efeitos exercidos sobre a succinato desidrogenase (E.C.1.3.99.1) e sobre a malato desidrogenase (E.C.1.1.1.39). Embora exista ampla evidência experimental de que a salinidade afeta a malato desidrogenase de tecidos vegetais (PORATH & POLJAKOFF-MAYBER 1964; 1969; FLOWERS & HANSON 1969; FLOWERS 1973; KALIR & POLJAKOFF-MAYBER, 1975), tal efeito sobre a succinato desidrogenase é apenas referido em mitocôndrias de tecidos animais (CAMPBELL, RAISON & BRADY, 1975).

Em presença de succinato (TABELA I e FIGURA 4B), verificou-se que a passagem por um ciclo de fosforilação não foi capaz de reverter a inibição da succinato desidrogenase anteriormente sugerida, como é evidenciado pela persistência de baixos valores do 2º estado 4 (FIGURA 4B). A taxa do consumo de oxigênio do 2º estado 4 não foi estatisticamente diferente daquela do 1º estado 4, o que indica não só uma persistência da ação inibitória sobre a succinato desidrogenase, como também um possível efeito desorganizador do sal sobre o controle respiratório mitocondrial.

Em presença de L-malato, embora tendo-se verificado inibição do 1º estado 4, e do 1º estado 3, o 2º estado 4 apresentou-se estimulado quando comparado ao controle (TABELA II e FIGURA 4D). Já é fato conhecido que a oxidação de L-malato, através da cadeia respiratória mitocondrial, provoca uma diminuição da velocidade do consumo de oxigênio no 2º estado 4 por acúmulo de oxaloacetato (BOWNAN, IKUMA & STEIN, 1976). Neste caso, o oxaloacetato age, não só inibindo a malato desidrogenase, como também porque seu acúmulo gera con-

dições termodinamicamente desfavoráveis à oxidação do L-malato, posto que a reação Malato \rightarrow Oxaloacetato tem um $\Delta G = + 7,1 \text{ kcal mol}^{-1}$. O aumento do consumo de oxigênio no 2º estado 4 (TABELA II e FIGURA 4D) de mitocôndrias isoladas de plântulas submetidas a "stress" salino, comparado ao controle, é interpretado como uma possível diminuição da afinidade da malato desidrogenase ao oxaloacetato induzida pela presença do NaCl, como já foi encontrado por WEIEMBERG (1967). Além disso, uma elevação do 2º estado 4 (TABELA II e FIGURA 4D) é indicativa de uma desorganização do controle respiratório, fato comparável ao verificado quando o substrato foi o succinato (TABELA I e FIGURA 4B).

Considerando-se os resultados obtidos para os estados 3-4 (TABELA I e TABELA II) e controles respiratórios (TABELA I, TABELA II, FIGURAS 4B e 4D), quando da oxidação de succinato e L-malato, constatou-se diminuição destes parâmetros. Isto parece indicar que o efeito do sal se exerce sobre o controle do mecanismo de fosforilação oxidativa. No que diz respeito à relação ADP/O, quando o succinato foi o substrato utilizado, ela se apresentou mais elevada do que a do controle (TABELA I e FIGURA 4B), indicando que o processo da fosforilação oxidativa, além de não ter sido inibido, apresentou-se até estimulado (TABELA I e FIGURA 4B). Em presença de L-malato, a relação ADP/O apresentou valores iguais aos do controle (TABELA II e FIGURA 4D). O estudo do efeito da salinidade sobre o metabolismo energético, a não ser em concentrações salinas muito elevadas, não tem indicado, até então, uma influência inibitória sobre o mesmo, o que tem sido comprovado pela inalterabilidade das relações ADP/O (FLOWERS & HANSON, 1969). O estímulo da relação ADP/O, observado com mitocôndrias de feijão de corda pitiúba oxidando succinato, pode ser interpretado ou como uma diferença não significativa, ou como resultado de uma maior exigência energética por parte das plântulas tratadas com sal, o que já foi evidenciado por LIVNE & LEVIN (1967) com mitocôndrias de ervilha.

No que diz respeito à influência da salinidade in vitro sobre a atividade mitocondrial, pode-se verificar que os resultados apresentados com o "stress" salino induzido por NaCl, KCl e Na_2SO_4 , em iguais osmolaridades, obedeceram à mesma tendência daqueles obtidos in vivo (FIGURAS 5B, 5C e 5D). Haja vista que as mitocôndrias oxidando succinato apresentaram inibição nos estados 3 e 4 (FIGURAS 6, 8 e 10), resultados estes concordantes com os obtidos com mitocôndrias de fígado de rato (ATSMON & DAVIS, 1967), mesmo que em intensidade variável com a osmolaridade do meio. Embora não seja possível uma comparação quantitativa da ação destes diferentes íons, o Na_2SO_4 parece provocar uma inibição mais acentuada da atividade respiratória mitocondrial. Esta inibição, igualmente, é atribuída a uma alteração na atividade enzimática da succinato desidrogenase, provocada por estes sais. Como foi observado in vivo, estas organelas também não conseguiram anular a inibição, mesmo passando por um ciclo de fosforilação, como pode ser verificado, por serem os valores do 2º estado 4 menores que os do controle (FIGURAS 6, 8 e 10). FLOWERS & HANSON (1969), estudando os efeitos do KCl na respiração mitocondrial de soja, também observaram inibição do consumo de oxigênio no estado 3 enquanto a respiração no estado 4 não foi afetada. O mesmo estudo, realizado por CAMPBELL, RAISON & BRADY, 1975, com mitocôndrias de fígado de rato, mostraram também inibição da respiração no estado 3. Por outro lado, os resultados dos experimentos in vitro, igualmente apresentaram as mesmas tendências dos obtidos in vivo, no que tange ao controle respiratório e relação ADP/O (FIGURAS 7, 9, e 11).

No caso do NaCl, com o aumento da osmolaridade (FIGURA 7) verificou-se um aumento correspondente no controle respiratório, não atingindo este, entretanto, os valores obtidos no tratamento controle. Isto não significou melhora no acoplamento das mitocôndrias, pois foi devido a uma redução no estado de repouso da respiração mitocondrial, ou seja, no 2º estado 4 (FIGURA 6), o que traduziria uma possível ação do sal sobre a succinato desidrogenase, e não sobre o

mecanismo de controle da fosforilação. Os demais sais provocaram uma redução no controle respiratório nas diferentes osmolaridades utilizadas (FIGURAS 9 e 11), fato também constatado em mitocôndrias de soja (FLOWERS & HANSON, 1969) e de fígado de rato (ATSMON & DAVIS, 1967; CAMPBELL, RAISON & BRADY, 1975).

A atividade fosforilativa, apreciada através dos valores de ADP/O, apresentou-se discretamente aumentada, ao ser comparada ao controle, entre 0 e 300 mOsM, quando NaCl e KCl foram utilizados (FIGURAS 7 e 9). Acima deste limite, a relação ADP/O foi estimulada por concentrações crescentes de sal. Quando o sal adicionado ao meio de reação foi o Na_2SO_4 , a relação ADP/O (FIGURA 11) apresentou-se idêntica à do controle, até 100 mOsM, e, acima deste valor, foi progressivamente estimulada pelo sal. Portanto, pode-se concluir que o efeito da salinidade na fosforilação oxidativa é função não só do tipo de sal utilizado, como de sua concentração. Além disso, a fosforilação, estimulada em altas osmolaridades, deve-se, ou a uma maior exigência energética motivada pela presença do sal (LIVNE & LEVIN, 1967), ou a uma desordem no sistema de controle da fosforilação oxidativa ao nível da membrana mitocondrial interna. Esta última alternativa fundamenta-se no efeito exercido pelos sais nos valores dos estados 3-4 e nos valores de controle respiratório (FIGURAS 7, 9, e 11). O conjunto de dados estaria concordante para sugerir uma influência global dos sais sobre os elementos constitutivos da membrana mitocondrial interna. Tal conclusão também estaria de acordo com as idéias já expostas por CAMPBELL *et al.*, (1975), que postularam um efeito inibitório dos solutos sobre a capacidade funcional do sistema respiratório associado à membrana mitocondrial interna.

Do exposto, cabe a sugestão de que a ação de diferentes sais *in vitro*, em mitocôndrias de hipocótilos de feijão de corda pitiúba, em presença de succinato como substrato oxidável, se exerce em dois aspectos:

- (a) sobre a atividade de enzimas envolvidas com o transporte de elétrons;
- (b) sobre o controle da fosforilação oxidativa.

Embora estas pareçam as explicações mais coerentes com os resultados encontrados, haveria ainda a necessidade de experiências comprobatórias da ação dos sais diretamente sobre as enzimas ou sobre a membrana mitocondrial interna responsável pelo fluxo de elêtrons acoplado à fosforilação.

A preparação mitocondrial oriunda de plântulas germinadas em NaCl 0,1M oxidando succinato, foi colocada em presença de NaCl, KCl e Na₂SO₄ in vitro, com o intuito de verificar se as mitocondrias de hipocótilos de plântulas germinadas em condições de "stress" salino torna-se-íam refratárias às modificações provocadas pelos sais. Os resultados encontrados sugerem a mesma tendência no que diz respeito ao 1º estado 4, 1º estado 3, 2º estado 4, controle respiratório e estado 3-4. A relação ADP/O, contrariamente ao verificado nos casos de "stress" salino in vivo ou in vitro, isoladamente, manteve-se próxima ao controle, especialmente em osmolaridades superiores a 300 mOsM (FIGURAS 14, 16 e 18). Neste caso, poder-se-íia sugerir que o controle do sistema mitocondrial produtor de energia estaria afetado pela salinidade de tal maneira que a adição suplementar de diferentes sais não provocou alterações no metabolismo energético. Outra explicação para estes resultados estaria no fato de que, como as mitocôndrias eram oriundas de plântulas desenvolvidas em "stress" salino, eles não necessitariam mais da aludida disponibilidade energética (LIVNE & LEVIN, 1967) para seu ajustamento osmótico.

Já é fato conhecido que a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de plantas e animais é inibida quando a fração mitocondrial é colocada em um meio de baixo potencial hídrico, provocado pela adição de sacarose, manitol, NaCl ou KCl (ATSMON & DAVIS, 1967; FLOWERS & HANSON, 1969). JOHNSON & LARDY, 1968, demonstraram também que, sob condições de hiperosmolaridade, diferentes substratos não provocavam igualmente o mesmo grau de inibição na respiração. Estes autores sugeriram que esta variação poderia ter sido ocasionada por mudanças na permeabilidade seletiva da mitocôndria sob condições de alta concentração de sacarose. Apesar disso, a explicação para inibição da atividade respiratória provocada por diferentes solutos ainda é controversa. CAMPBELL, RAISON & BRADY (1975) verificaram que esta inibição na velocidade de respiração do estado 3, quando mitocôndrias de fígado de rato foram colocadas em um meio contendo KCl, sacarose, manitol ou glicose. Diferentemente, em meio glicina as velocidades de respiração do estado 3, não foram inibidas. Destas observações, eles concluíram que a inibição na atividade respiratória não era decorrente do potencial hídrico do sistema, mas de uma possível alteração na membrana mitocondrial.

Do estudo da dissociação dos efeitos osmóticos dos iônicos (FIGURAS 19 - 27), admite-se que o potencial hídrico do meio não seja o único responsável pela inibição da atividade respiratória, quando o soluto se encontra em altas concentrações. Isto explica os resultados encontrados com o uso de diferentes sais em mitocôndrias de feijão pitiúba onde não houve grande diferença entre os efeitos provocados por NaCl e KCl (FIGURAS 19 - 24). Contudo, a ação do Na_2SO_4 mostrou-se diversa no que diz respeito a uma inibição mais acentuada no estado 3-4, e C.R. e a uma estimulação na relação ADP/O. Outros trabalhos existem mostrando os efeitos específicos dos íons.

LARRY (1976) verificou que potenciais hídricos inferiores a -2bar o Na_2SO_4 promoveu maiores decréscimos na percentagem de germinação de sementes de sorgo do que o NaCl. Dados semelhantes foram obtidos com alguns cultivares de trigo (SERGEEV, citado por STROGONOV, 1964), beterraba, tomate, alfafa, cebola e outras espécies (HAYWARD, UHVITS, WADLEIGH & GAUCH, citados por STROGONOV), o que vem corroborar os dados encontrados com mitocôndrias isoladas de hipocótilos de feijão pitiúba.

CONCLUSÕES

(1) O efeito inibitório da salinidade in vivo sobre o consumo de oxigênio, em presença de succinato e L-malato como substratos oxidáveis, é atribuída a ação exercida pelo NaCl sobre a succinato desidrogenase e a malato desidrogenase.

(2) O efeito inibitório da salinidade in vitro sobre o consumo de oxigênio, em presença de succinato como substrato oxidável, é, igualmente, interpretado como ação exercida sobre a succinato desidrogenase.

(3) A influência da salinidade, in vivo e in vitro, no metabolismo energético, expresso pela relação ADP/O, não apresentou caráter inibitório, mas pareceu ser de natureza estimulatória. Não há indícios, pois, de depressão do metabolismo energético por efeito do sal, e pareceria mesmo que ele estaria trabalhando dentro de sua capacidade máxima para se ajustar às condições desfavoráveis do "stress" salino.

(4) Apesar da inalterabilidade imediata do metabolismo energético, expressa pelos valores de ADP/O, o controle deste mecanismo parece afetado, tanto pelo tratamento in vivo como pelo in vitro (acima de 300 mOsM), o que se evidencia pelos valores de C.R. e de estado 3-4.

(5) Mitocôndrias isoladas de plântulas germinadas em condição de "stress" salino, ao serem postas em presença de osmolaridades superiores a 300 mOsM, apresentaram valores de ADP/O comparáveis aos do controle, sugerindo que elas criaram uma condição de independência em relação ao efeito deletério do sal, e não necessitariam mais de suporte energético solicitado quando dos tratamentos in vivo e in vitro.

(6) Comparando-se os efeitos de NaCl, KCl e Na₂SO₄ in vitro, este último pareceu ter um efeito mais desorganizador do que os demais.

LITERATURA CITADA

- ATSMON, A. & R. P. DAVIS. 1967 - Mitochondrial respiration under conditions of varying osmolarity. Biochim. Biophys. Acta., 131 : 221-233.
- AUSTENFELD, F. A. 1976 - The effect of various alkaline salts on the glycolate oxidase of Salicornia europaea and Pisum sativum in vitro. Physiol. Plant., 36 : 82-87.
- BARBOSA, L. 1975 - Efeitos de Reguladores do Crescimento na Germinação de Sementes de Sorghum bicolor (L.) Moench Semeadas em Condições Salinas. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil. 49 p.
- BELL, D. T., D. E. KOEPPE & R. J. MILLER. 1971 - The effects of drought stress on respiration of isolated corn mitochondria. Plant. Physiol., 48 : 413-415.
- BERKALOFF, A., J. BOURGUET, P. FAVARD & M. GUINNEBAULT. 1972 - Biologia e Fisiologia Celular. Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo. 287p.
- BERNSTEIN, L. 1961 - Osmotic adjustment of plants to saline media I. Steady state. Am. J. Botany, 48 : 909-918.
- . 1963. - Osmotic adjustment of plants to saline media. II. Dinamic phase. Amer. J. Bot., 50 : 360-370.
- . & HAYWARD, H. E. 1958 - Physiology of salt tolerance. Ann. Rev. Plant. Physiol., 9 : 25-46.
- BLACK, C. A. 1968 - Soil-Plant Relationships. John Wiley & Sons, New York, 792 p.

- BONNER, W. D. Jr. 1965 - Mitochondria and electron transport. In: Plant Biochemistry, Eds. Bonner, Jr. & J. E. Varner. Academic Press, New York. p. 89-120.
- BOUCAUD, J. 1972 - Effects du NaCl sur l'activité de la nitrate reductase chez deux variétés halophytes: Suaeda maritima var. macrocarpa. Physiol. Plant., 27 : 37-42.
- BOWMAN, E. J., IKUMA, H. & STEIN, H. J. 1976 - Citric acid cycle activity in mitochondria isolated from mung bean hypocotyls. Plant. Physiol. 58 : 426-432.
- CAMPBELL, L. C., J. K. RAISON & C. J. BRADY. 1975 - Factors limiting mitochondrial respiration in media of high solute content. J. Bioenergetics., 7 : 189-200.
- CHANCE, B. & G. R. WILLIAMS. 1956 - The respiratory chain and oxidative phosphorylation. In: Adv. Enzimol., 17 : 65-130. Ed. F. F. Nord. Interscience Publ., New York.
- EVANS, H. J. & G. J. SORGER. 1966 - Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. Ann. Rev. Plant. Physiol., 17 : 47-76.
- FLOWERS, T. J. 1972a - Salt tolerance in Suaeda maritima (L.) Dum. The effect of sodium chloride on growth, respiration, and soluble enzymes in a comparative study with Pisum sativum L. J. Exp. Botan., 23 : 310-321.
- . 1972b - The effect of sodium chloride on enzyme activities from four halophyte species of Chenopodiaceae. Phytochemistry., 11 : 1881-1886.
- . 1973 - Salt tolerance in Suaeda maritima (L.) Dum. A comparison of mitochondria isolated from green tissues of Suaeda and Pisum. J. Exp. Botan., 25 : 101-110.

- _____. & J. B. HANSON. 1969 - The effect of reduced water potential on soybean mitochondria. Plant. Physiol., 44 : 939-945.
- _____, P. F. TROKE & A. R. YEO. 1977 - The mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. Ann. Rev. Plant. Physiol., 28 : 89-114.
- GOES, E. S. 1977 - O problema da salinidade e drenagem em projetos de irrigação do nordeste e a ação da pesquisa com vistas a seu equacionamento. D. A. A., SUDENE, Recife, Pernambuco, Brasil, 20 p. (mimeografado).
- GOMES, E. FILHO. 1976 - Efeitos da Salinidade na Atividade de Três Enzimas Hidrolíticas Extraídas de Cotilédones de Feijão de Corda Pitiúba (*Vigna sinensis* (L.) Savi) Durante a Germinação. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 77 p.
- GORNALL, A. G., J. BARDAWILL & M. M. DAVID. 1949 - Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. J. Biol. Chem., 177 : 651-766.
- GREENWAY, H. & C. B. OSMOND. 1972 - Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. Plant. Physiol., 49 : 256-259.
- HAGIARA, B. 1961 - Techniques for the applications of polarography to mitochondrial respiration. Biochim. Biophys. Acta., 46 : 134-142.
- HENRY, M. F. & E. J. NYNS. 1975 - Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway. Sub-Cell. Biochem., 4 : 1-65.
- IKUMA, H. 1970 - Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. Plant. Physiol., 45 : 773-781.
- KALIR, A. & A. POLJAKOFF-MAYBER. 1975 - Malic dehydrogenase from Tamarix roots. Effects of sodium chloride in vivo and in vitro. Plant. Physiol., 55 : 155-162.

- LEHNINGER, A. L. 1970 - In Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York. 833 p.
- LISON, L. 1958 - Statistique Appliquée a la Biologie Experimentale. Ed. Gauthier Villais. 346 p.
- LIVNE, A. & N. LEVIN. 1967 - Tissue respiration and mitochondrial oxidative phosphorylation of NaCl-treated pea seedlings. Plant. Physiol., 42 : 407-414.
- PALMER, J. M. 1976 - The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Ann. Rev. Plant. Physiol., 27 : 133-157.
- PORATH, E. & A. POLJAKOFF-MAYBER. 1964 - Effect of salinity on metabolic pathways in pea root tips. Israel J. Bot., 13 : 115-121.
- . 1968 - Effect of salinity in the growth medium on carbohydrate metabolism in pea root tips. Plant and Cell Physiol., 9 : 195-203.
- . 1969 - The effect of salinity on the malic dehydrogenase of pea roots. Plant. Physiol., 44 : 1031-1034.
- PRISCO, J. T. & J. W. O'LEARY. 1970a - Osmotic and "toxic" effects of salinity on germination of Phaseolus vulgaris L. seeds. Turrialba, 20 : 177-184.
- . 1970b - Effect of Salt and water stresses on protein synthesizing capacity of embryo-axis of germinating Phaseolus vulgaris L. seeds. Rev. Brasil. Biol., 30 : 317-321.
- RACKER, E. 1967 - Resolution and reconstitution of the inner mitochondrial. Fed. Proc., 26 : 1335-1340.

———. 1976 - Control of Energy Metabolism. In a New Look at Mechanisms in Bioenergetics. Ed. Efraim Racker. Academic Press. New York. p. 153-163.

RICHARDS, L. A. 1954 - Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils. U.S.D.A. Agric. Handbook. Nº 60. 160 p.

SCHIMPER, A. F. W. 1898 - Pflanzengeographie auf physiologischer Grundlage. 1st ed. Jena: Gustav Fischer.

SILVA, M. LIMA., N. D. DENSLow & D. FERNANDES DE MELO. 1977 - Atractyloside inhibition of adenine nucleotide translocation in mitochondria from hypocotyls of Vigna sinensis cv. seridó. Physiol. Plant., 41 : 193-196.

STROGONOV, B. P. 1964 - Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants. Traduzido do Russo por A. POLJAKOFF-MAYBER & A. M. MAYER. Israel Program for Scientific Translations Ltda., 279 p.

UHVITS, R. 1946 - Effect of osmotic pressure on water absorption and germination of alfalfa seeds. Amer. J. Bot., 33 : 278-285.

WALTON, D. C., 1966 - Germination of Phaseolus vulgaris L. Resumption of axis growth. Plant. Physiol., 51 : 298-302.

WEIMBERG, R. 1967 - Effect of sodium chloride on the activity of a soluble malate dehydrogenase from pea seeds. J. Biol. Chem., 242 : 3000-3006.

———. 1970 - Enzyme levels in pea seedlings grown on highly salinized media. Plant. Physiol., 46 : 466-470.