

JOÃO MÁRCIO DE CARVALHO RIOS

ESTUDO DOS CITOCROMOS E DA OXIDAÇÃO FOSFORILATIVA EM SEMENTE
DE PINHEIRO (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Ktze.)

Tese apresentada ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

DEDICATÓRIA

Àqueles por quem vim: meus pais.

Àqueles por quem vivo: minha esposa e meus filhos.

Àquele para quem irei: Deus,

dedico este trabalho.

Curitiba, janeiro de 1973

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	6
Isolamento de mitocôndrias	6
Métodos de ensaio	8
Microscopia eletrônica	8
Substâncias químicas	9
Siglas usadas	9
RESULTADOS	10
Velocidades respiratórias e Oxidação Fosforilativa com Alguns Substratos	10
Espectro diferencial à temperatura ambiente	10
Figura 1	11
Concentração de Citocromos	12
Microfotografias eletrônicas	12
Figura 2	13
Figura 3	14
Figura 4	15
Registro polarográfico da alíquota de suspensão mito- condrial	16
DISCUSSÃO	17
Conclusões	23
AGRADECIMENTOS	24
BIBLIOGRAFIA	25

INTRODUÇÃO

O estudo das oxidações fosforilativas em mitocôndrias de vegetais, é assunto que ultimamente foi incorporado ao acervo das pesquisas bioquímicas, numa tentativa de esclarecer as particularidades envolvidas e as suas correlações com os fenômenos da biologia das plantas.

Os estudos iniciais, feitos quase sempre de forma comparativa, trouxeram muito pouco do conhecimento real das mitocôndrias vegetais. As investigações detalhadas, sobre essas organelas celulares em plantas, somente surgiram a partir da segunda metade da década de 1950.

Até 1959 destaca-se uma extensa revisão do metabolismo mitocondrial, feita por SCHNEIDER (40), que enfatiza várias funções enzimáticas. Nesse trabalho, o autor analisa determinados critérios para se verificar a integridade de mitocôndrias isoladas, destacando, sobretudo, os métodos citológicos e enzimáticos, estes, também, preconizados por HOLTER (19), uma vez que certas enzimas respiratórias são exclusivamente associadas à mitocôndria; cita, ainda, a microscopia eletrônica, a qual fornece meios sensíveis e específicos para se determinar, tanto a pureza, quanto o grau de integridade das frações mitocondriais isoladas. Inclui-se, também, entre os trabalhos principais dessa época, uma extensa discussão do sistema de transporte de elétrons, apresentada por GREEN (15).

HILL e HARTREE (18) demonstraram que em tecidos vegetais os componentes respiratórios existem em concentrações relativamente baixas, em comparação com os tecidos animais. Este fato tem sido uma dificuldade para o progresso dos estudos da cadeia respiratória em plantas. Acresce, ainda, conforme comentam DUCET e ROSENBERG (13), que nos tecidos animais a cadeia respiratória está localizada em partículas específicas; as mitocôndrias. Nos tecidos vegetais, estudos relacionados com a cadeia

respiratória, a partir do trabalho de MILLERD et al. (31), têm revelado propriedades bioquímicas muito semelhantes às constatadas em mitocôndrias animais. Esse comportamento bioquímico das preparações vegetais, entretanto, é extremamente variável, mesmo dentro do próprio tecido, conforme condições que se lhe impõem. Isso conduziu a uma definição bioquímica de fração mitocondrial em tecidos vegetais, ou seja, chama-se de fração mitocondrial àquela fração preparada de células vegetais que se comporta, bioquimicamente, como as mitocôndrias animais.

WILSON e BONNER (45) demonstraram que as sementes secas de amendoim, respiram mais vagarosamente que as mesmas sementes embebidas e via uma cadeia respiratória diferente. Fato muito semelhante, já tinha sido observado por YAKUSHIJI (47) em algas e em plantas superiores, em geral.

Outros trabalhos se destacam, como exemplos de variação das propriedades bioquímicas e características estruturais de mitocôndrias preparadas a partir de tecidos vegetais diferentes. CHERRY (11) indica modificações nas mitocôndrias de amendoim durante a germinação. No mesmo material BREINDENBACH (5) et al. estudaram a biogênese de mitocôndrias. NAWA e ASAHI (33), trabalhando com sementes de ervilha, evidenciaram um rápido aumento das atividades e dos componentes das partículas mitocondriais, durante a germinação. Nesse mesmo trabalho, há demonstrações de que a velocidade de respiração está ligada à organização estrutural da mitocôndria durante a germinação. Em uma mesma fração mitocondrial, preparada com batata doce, YAMAKI e URITANI (48), encontraram duas formas de mitocôndrias.

Para HILL e HARTREE (18), o maior obstáculo para o estudo de mecanismos respiratórios em vegetais, é o fato de que a desintegração celular dá início a reações que são bastante diferentes, tanto em magnitude quanto em natureza, daquelas que ocorrem em tecidos intactos. Há, ainda, uma grande faixa de inibidores internos e de substâncias potencialmente inibidoras que, de acordo com JONES e HULME (23), acham-se compartimentalizadas

tanto no citoplasma quanto nos vacúolos. Esses inibidores são liberados ou formados durante os procedimentos de homogeneização e tendem a inativar, tanto fisicamente por fixação ou adsorção, quanto quimicamente por interação ou desnaturação.

A preparação de fração mitocondrial, é influenciada pela natureza do tecido vegetal. A partir de tecidos clorofilados sempre surgem problemas de grande monta e de difícil solução, como evidenciado por PIERPOINT (36, 37). Os ácidos graxos, que são abundantes em determinados tecidos vegetais, são liberados durante a homogeneização e podem conduzir a uma fração mitocondrial com a cadeia respiratória desacoplada, de acordo com LIEBERMAN e BAKER (28). DALGARNO (12) constatou efeitos dos ácidos graxos livres na relação P/O, na fosforilação e no consumo de oxigênio, ao estudar mitocôndrias isoladas de cenoura.

BONNER e VOSS (4), trabalhando com couve-flor e batata doce, tornaram-se pioneiros no assunto, ao conseguir preparações de mitocôndrias que apresentavam um bom controle respiratório, isto é, com baixo consumo de oxigênio na presença de substrato, o qual era aumentado por adição de ADP. Com esse trabalho evidenciou-se, também, que tecidos vegetais aclorofilados se constituem em fontes mais apropriadas de frações mitocondriais.

A partir de então, os tecidos vegetais de reserva, que são desprovidos de clorofila, passaram a ser o principal alvo de diversos estudos bioquímicos ligados à cadeia respiratória. No caso específico de sementes, têm sido usadas algumas de suas partes constituintes, como fontes de frações mitocondriais. CHERRY (11) usou cotilédones de sementes de amendoim para estudar as modificações ocorridas no conteúdo de enzimas e de mitocôndrias e suas consequências. Embriões, serviram de material de estudo para WILSON e BONNER (45) compararem velocidades de utilização de oxigênio por mitocôndrias.

Sementes têm sido estudadas, principalmente, em diversos estágios de sua germinação, como fizeram AKASAWA e BEEVERS (1), CHERRY (11), NAWA e ASAHI (33), YOUNG et al. (51), YOUNG e

VARNER (52) e BREINDENBACH et al. (5). Porém, têm predominado estudos feitos com "seedlings" obtidos por germinação de sementes no escuro, com o que se tornam estiolados, sem clorofila. Com esse material, tem sido possível estudar alguns detalhes da cadeia respiratória de certos vegetais, como fizeram EARNSHAW e TRUELOVE (14), AKAZAWA e BEEVERS (1), CHERRY (11), NAWA e ASAHI (33), MALHOTRA e SPENCER (30) e BREINDENBACH et al. (5). Mais recentemente, SARKISSIAN e SRISVASTAVA (39) discutiram métodos e condições para se isolar mitocôndrias de "seedlings" de trigo que sejam ativas e firmemente acopladas.

Em se tratando de sementes intactas e não germinadas porém, não tem havido muita investigação. Há, mesmo, até algumas sugestões de que as sementes sejam muito pobres em partículas mitocondriais. BREINDENBACH et al. (5) apresentaram resultados que mostram que a atividade enzimática é quase que totalmente ausente em sementes secas, mas aumenta muito durante os primeiros nove dias de germinação. CHERRY (11) demonstrou que durante a germinação de sementes, as mitocôndrias parecem aumentar sua estrutura e organização interna, em relação à semente em repouso.

NAWA e ASAHI (33) relataram que somente uma estrutura mitocondrial pobre e com baixa atividade respiratória foi detectada em células de cotilédones dormentes, ao passo que uma estrutura mitocondrial mais diferenciada e mais ativa tornou-se evidente à medida que a germinação acontecia. WILSON e BONNER (45) são categóricos ao afirmar que "com o aparecimento do embrião, surgem mitocôndrias que são semelhantes às aquelas isoladas de outros tecidos vegetais maduros, pois apresentam controle respiratório e metabolizam ativamente succinato, malato e NADH". Em face disso "sementes secas utilizam o oxigênio muito vagarosamente".

O estudo da cadeia respiratória de sementes intactas e em repouso, vem abrir uma nova área de investigação científica, ligada às oxidações biológicas. A obtenção de fração mito -

condrial íntegra e ativa, pode ser evidenciada por sua caracterização bioquímica, segundo DUCET e ROSENBERG (13), que consideram que as mitocôndrias vegetais podem ser definidas por suas propriedades bioquímicas.

O presente trabalho estuda a cadeia respiratória e os citocromos de frações mitocondriais preparadas de sementes de pinheiro (Araucaria angustifolia) secas e em repouso. Procuram-se esclarecer fenômenos biológicos que ocorrem em relação à semente em questão, através de sua caracterização bioquímica, o que vem demonstrar, ainda, a integridade das mitocôndrias e a homogeneidade dessas frações mitocondriais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolamento de mitocôndrias - As mitocôndrias foram preparadas de sementes de pinheiro, intactas e maduras, colhidas diretamente das pinhas.

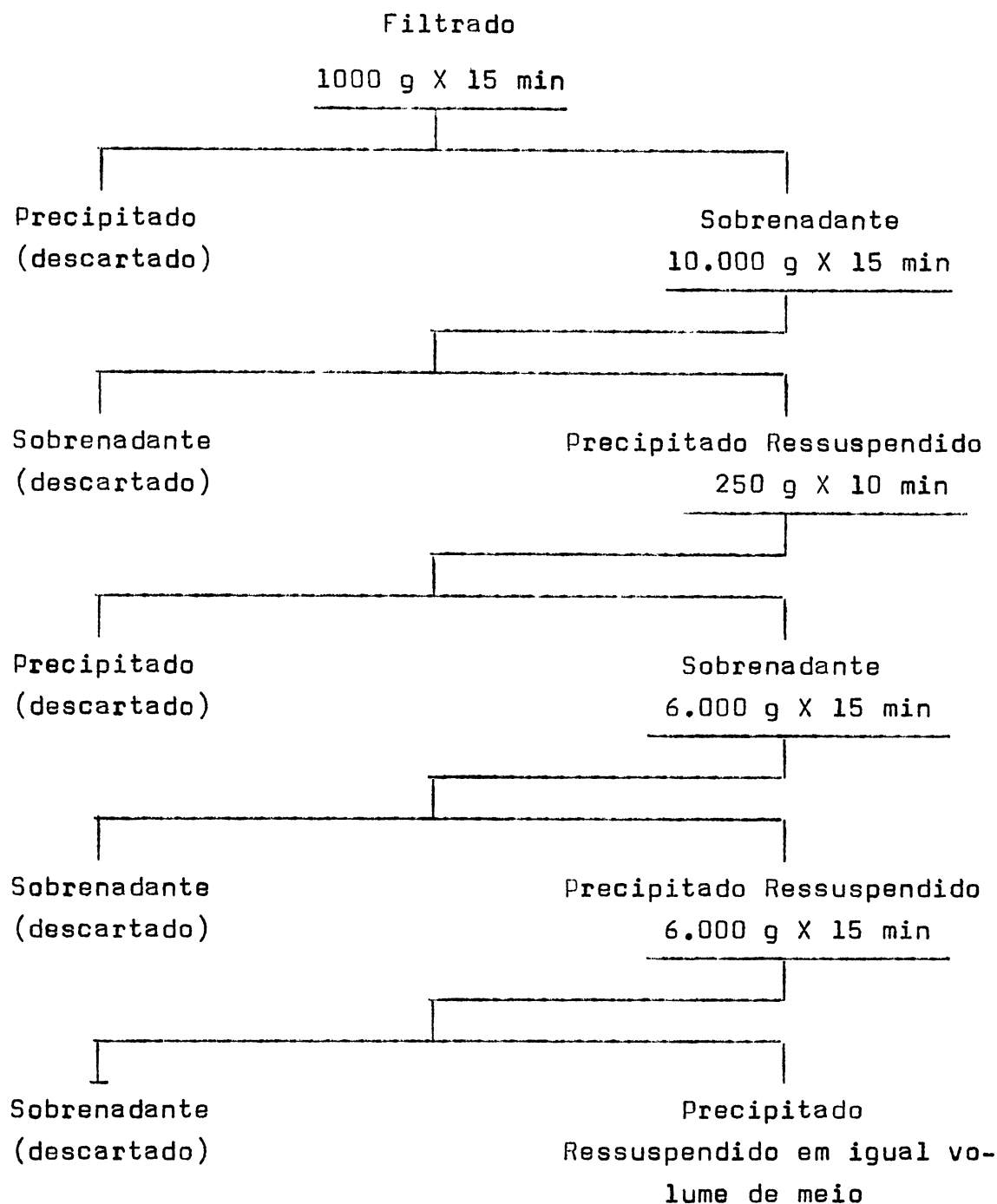
O método básico de preparação, usado como ponto de partida, foi o empregado por BONNER e VOSS (4), modificado com base nos trabalhos de BONNER (3) e IKUMA (22).

A fração mitocondrial foi preparada de sementes frescas e descascadas, que apresentavam um peso médio de 6 g e 51 % de umidade. Essas sementes foram raladas e, então, misturadas com o meio de extração, que continha HEPES 20 mM pH 7,2, Manitol 0,4 M, EDTA 1mM, BSA 0,01% e Cisteína 0,01% e que foi preparado adicionando-se os componentes nesta ordem e na ocasião de ser usado.

O material foi homogeneizado, manualmente, em gral de porcelana mantido em cuba de gelo e, a seguir, filtrado em oito camadas de gaze; o resíduo sofreu nova extração e filtração; nessa extração, o volume de meio utilizado correspondeu, sempre, a aproximadamente três vezes o volume de sementes raladas.

Os filtrados, foram submetidos à centrifugação diferencial, em centrífuga refrigerada Sorvall RC, de acordo com esquema indicado por BONNER (3), modificado no fato de se repetir a lavagem do "pellet" final. Além disso, todas as operações de lavagem, constantes desta etapa, foram realizadas com meio constituído, exclusivamente, de Manitol 0,5 M, cujo pH final foi ajustado para 7,4.

Os procedimentos da centrifugação podem ser sintetizados, como a seguir:



Todas essas operações foram realizadas em temperatura mantida entre 0° e 4° C.

2. Métodos de ensaio - As determinações polarográficas da oxidação fosforilativa, foram obtidas à temperatura ambiente mantida entre 22° e 25° C, em eletródio de oxigênio modelo descrito por VOSS et al. (42). O meio de reação utilizado, bem como a ordem de adição à câmara de reação, foram os preconizados por IKUMA (22).

A relação P/O foi calculada como relação ADP/O, de acordo com o método descrito por CHANCE e WILLIAMS (8). A relação ADP/O foi calculada como consumo de oxigênio, em microátomos por segundo e por litro, durante o estado ativo da respiração, em relação à concentração molar de ADP adicionado.

O coeficiente respiratório (RC), foi calculado como a razão entre as velocidades respiratórias em presença de substrato mais ADP (estado 3) e após o consumo de ADP (estado 4), (10).

Proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al. (29), usando-se, ainda, uma curva padrão traçada com leituras de alíquotas de soroalbumina bovina, sendo que as determinações espectrofotométricas foram feitas em espectrofotômetro Beckman DB.

A medição dos pHs foi feita em potenciômetro Radiometer, tipo 22r.

Espectros diferenciais, foram obtidos à temperatura ambiente, por meio de Espectrofotômetro Registrador Diferencial (split beam), modelo descrito por CHANCE (6). Os espectros foram obtidos com uma suspensão de mitocôndrias, reduzida por adição de substrato, contra uma suspensão oxidada (9). À suspensão de mitocôndrias, adicionou-se succinato 10 mM e quando a suspensão estava sob condições anaeróbicas, registrou-se o espectro diferencial entre esta e a preparação aeróbica.

Em todos os ensaios, a alíquota da fração mitocondrial utilizada, teve sua proteína ajustada para 10mg/ml.

3. Microscopia eletrônica - Alíquotas de suspensão de mitocôndrias, previamente testadas em eletródio de oxigênio, foram fixadas em glutaraldeído (46), após pré-fixação em tetróxido de ósmio 2% (35). As inclusões foram feitas em "crystic aral

dite" (44) e a coloração, por acetato de uranila (43) e citrato de chumbo (38). Os cortes foram realizados em ultra - micrótomo Sorvall Porter-Blum MT-2 e as microfotografias eletrônicas obtidas em microscópio eletrônico Philips modelo EM-300, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

4. Substâncias químicas - As substâncias químicas utilizadas na composição dos meios de extração, de lavagem e de reação, bem como aquelas usadas nos ensaios, foram sempre P.A., isto é, com pureza química garantida pelos laboratórios fabricantes.

5. Siglas - As siglas que aparecem no decorrer deste trabalho, correspondem ao que se segue:

ADP - 5-Difosfato de Adenosina

BSA - Soroalbumina bovina

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

HEPES - Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfônico

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida

P/O = ADP/O - relação entre moles de ADP adicionado ao sistema e moles de oxigênio consumido

P.A. - para análise; quimicamente pura.

RESULTADOS

1. Os dados referentes à atividade da fração mitocondrial, em presença de alguns substratos do ciclo dos ácidos tri-carboxílicos e obtidos por meio de eletródio de oxigênio, aparecem na tabela I.

TABELA I - Velocidades Respiratórias e Oxidação Fosforilativa de Mitocôndrias de Pinhão em Presença de Alguns Substratos⁺.

Substrato	Respiração	Respiração Após ADP	Resp. Após Consumo ADP	R C	ADP/O
Succinato	0,562	1,410	0,473	2,98	2,04
Alfa-Ceto glutarato	0,221	0,624	0,209	3,15	2,97
Isocitrato	0,315	0,582	0,251	2,32	2,07

Sistema - 0,5 ml de suspensão de mitocôndrias; 250 micromoles de ADP; 100 micromoles de substrato e meio de reação para completar volume final de 2,45 ml.

⁺ Valores expressos em micromoles de oxigênio por segundo e por litro e representam média de cinco determinações.

2. O espectro diferencial, à temperatura ambiente e que retrata o estado dos citocromos da cadeia respiratória após redução de seus componentes, com succinato, aparece na figura 1.

ESPECTRO DIFERENCIAL EM TEMPERATURA AMBIENTE DA FRAÇÃO
MITOCONDRIAL DA SEMENTE (ARAUCÁRIA ANGUSTIFOLIA)

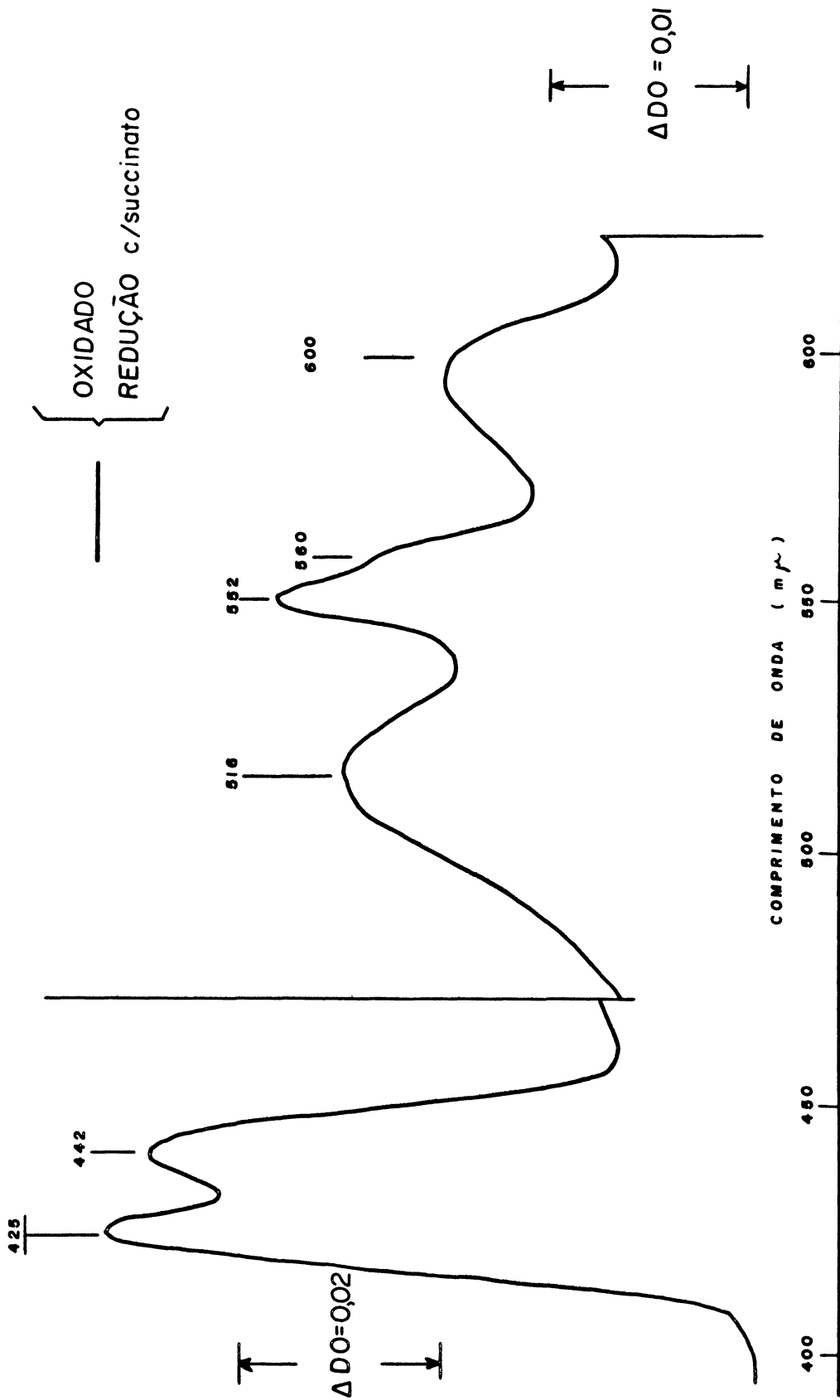


Figura 1

Fig. 1 - Espectro diferencial à temperatura ambiente de mitocôndrias de pinhão. Condições como descritas no ítem 2 de material e métodos.

3. A tabela II apresenta a concentração de citocromos na fração mitocondrial, calculada a partir do espectro diferencial, à temperatura ambiente (Fig. 1) e de acordo com coeficientes de extinção molar indicados por CHANCE (7). As quantidades relativas dos citocromos foram calculadas, fazendo-se a concentração do citocromos a igual a 1,0 (2).

TABELA II - Concentração de Citocromos em Mitocôndrias de Pinhão.

Citocromo	Diferença de D.O.	Epsilon $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$	Concentração micromolar	10^{-6} moles/g proteína	Razão [†]
a_3	0,060	91	0,66	0,066	1,03
a	0,009	14	0,64	0,064	1,00
b	0,006	20	0,30	0,030	0,47
c	0,017	19	0,89	0,089	1,39

[†] Quantidades relativas de citocromos.

4. As microfotografias eletrônicas da fração mitocondrial, aparecem nas figuras 2, 3 e 4. Uma alíquota dessa fração foi previamente ensaiada em eletródio de oxigênio, quanto ao seu comportamento em presença de succinato.

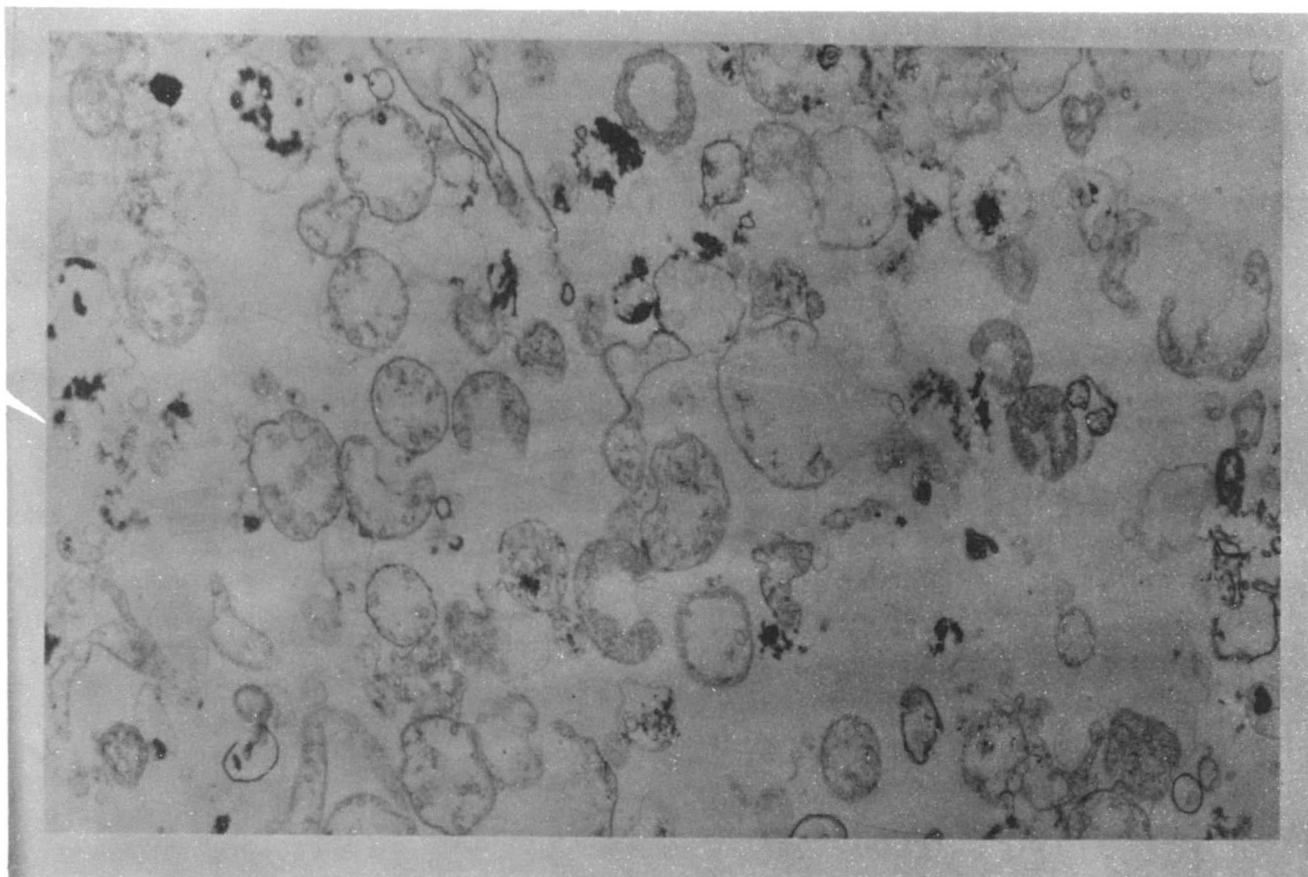


Figura 2 - Microfotografia eletrônica de mitocôndrias de pinhão.

Aumento: 16.780 X

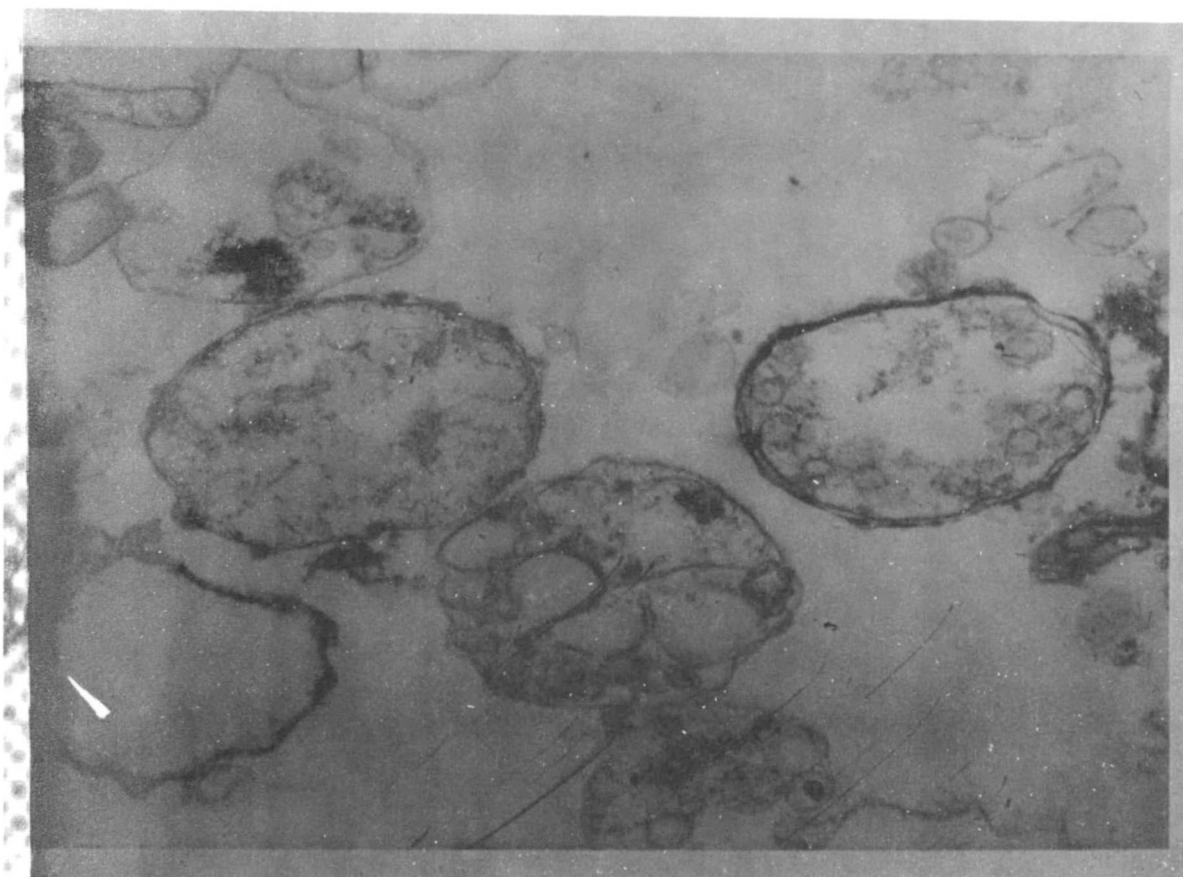


Figura 3 - Microfotografia eletrônica de mitocôndrias de pinhão.

Aumento: 61.560 X

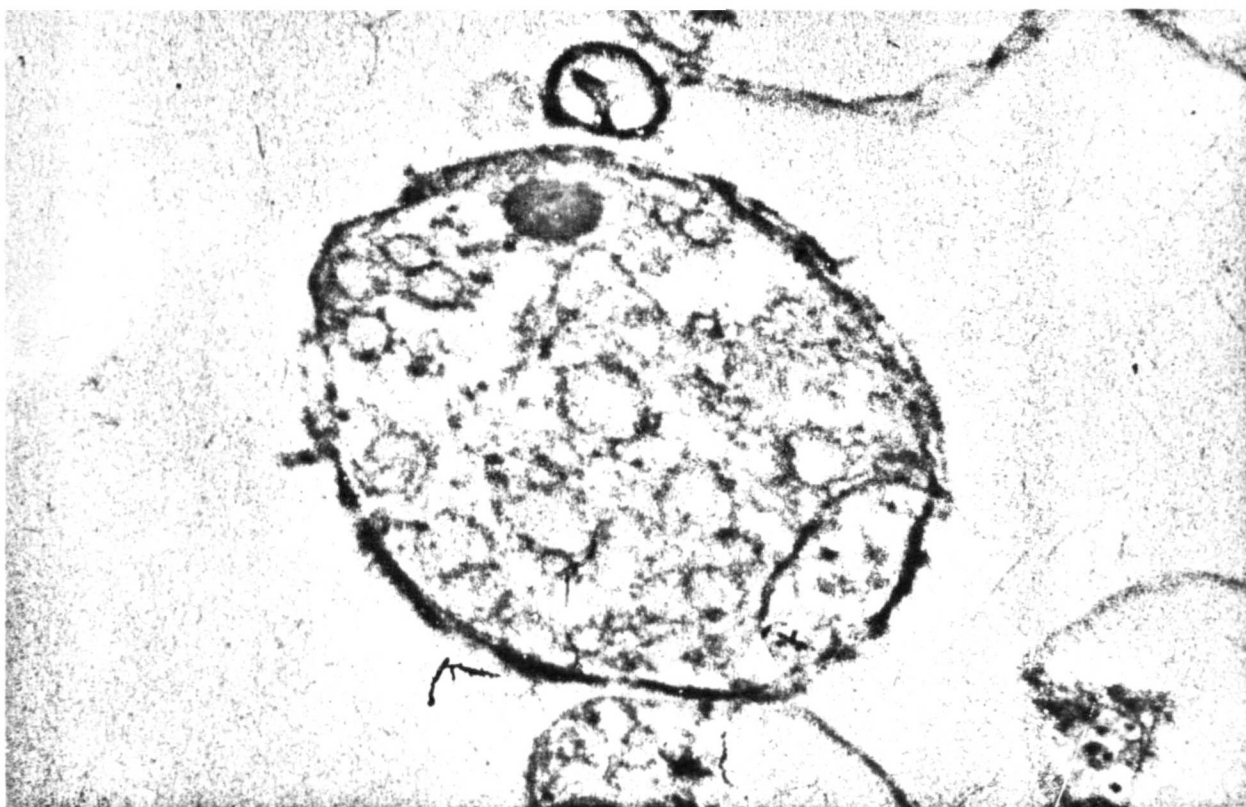


Figura 4 - Microfotografia eletrônica de mitocôndrias de pinhão.

Aumento: 100.540 X

5. O comportamento da alíquota de suspensão mitocondrial submetida à microscopia eletrônica e à espectrofotometria diferencial, medido por eletródio de oxigênio, aparece na figura 5.

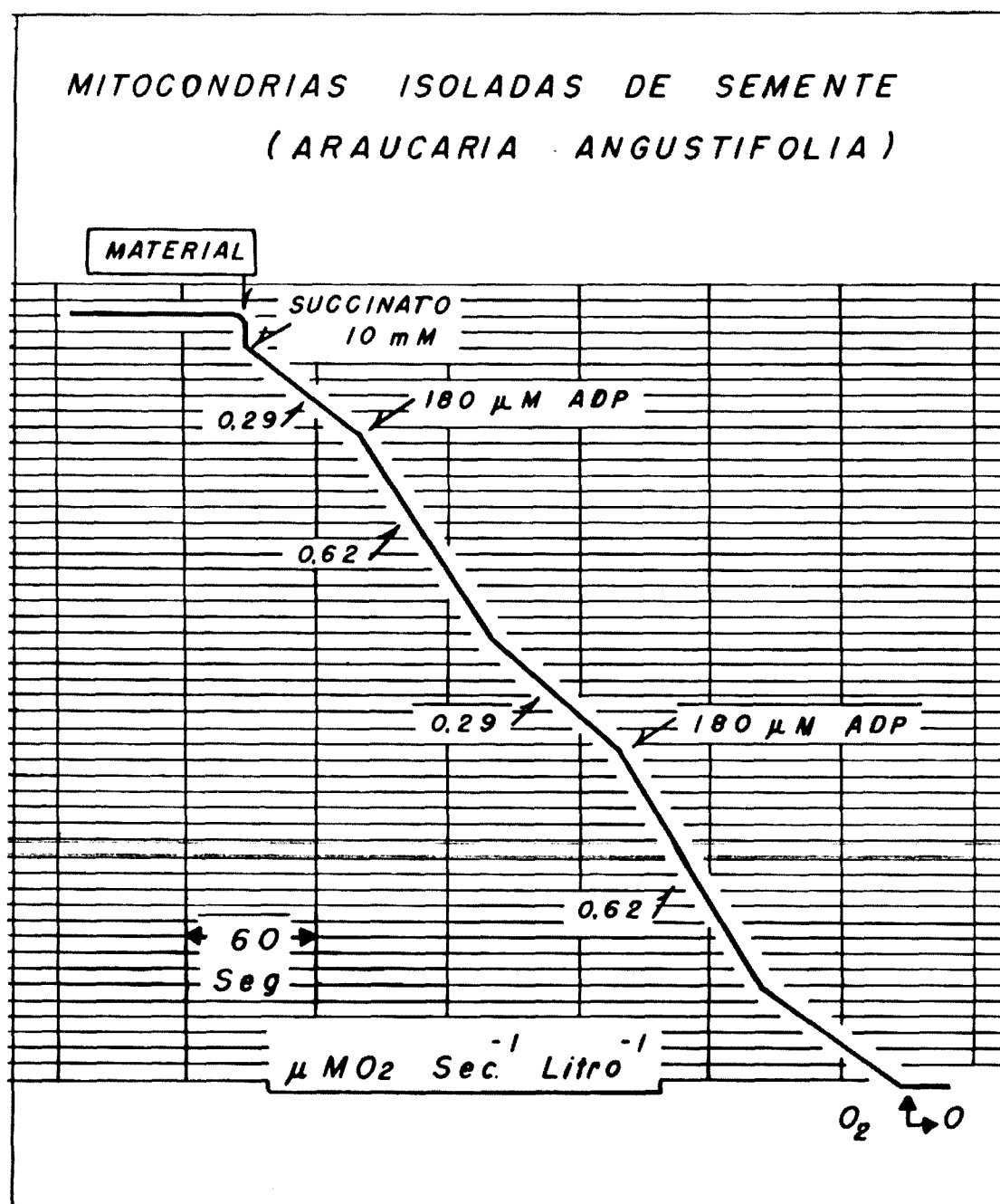


Figura 5 - Registro polarográfico de fração mitocondrial preparada de pinhão.

0,5 ml de suspensão de mitocôndrias e meio de reação para completar volume final de 2,45 ml.

DISCUSSÃO

A caracterização de frações mitocondriais pelo seu comportamento bioquímico (13, 24, 25, 31, 33, 40) e através de microscopia eletrônica (11, 24, 33, 34, 46, 48, 50) permite avaliar o grau de integridade das mitocôndrias e a homogeneidade de sua preparação. Em realidade, há uma íntima relação entre estrutura de mitocôndria e suas funções (11, 14, 25, 33, 51, 52). Em alguns casos (1, 5, 11, 33) tem sido possível estabelecer que a estrutura constatada para as mitocôndrias bem como as suas funções, dependem do estado metabólico e da natureza do tecido a partir do qual foram preparadas.

O estado metabólico dos tecidos de reserva de sementes é ativado pela presença de água uma vez que modificações rápidas ocorrem com sementes em embebição (45). Em primeira instância, portanto, o estado metabólico de um tecido de reserva, depende de seu conteúdo de água (33, 45).

As razões de controle respiratório crescem durante o processo de embebição das sementes enquanto há, também, um acentuado aumento na atividade respiratória dessas sementes, o que confirma a influência do conteúdo de água. As mitocôndrias se tornam ricas em proteínas e lipídeos e adquirem atividade do ponto de vista biológico e sua estrutura parece tornar-se estável. Tudo isso sugere um processo de desenvolvimento de mitocôndrias, com a transformação de partículas vesiculares em mitocôndrias ativas (33).

Nos organismos vivos também existem mecanismos reguladores que permitem variações das velocidades das reações metabólicas, tremendamente grandes e bruscas, que dependem do imediato requerimento de energia ou das condições particulares do meio ambiente (17, 26, 27).

Em se tratando das atividades respiratórias e fosforilativas das mitocôndrias, tem sido demonstrada uma íntima rela-

ção com a sua estrutura. Confirmação dessa dependência, foi dada por CHERRY (11) que apresentou microfotografias eletrônicas de cotilédones de sementes em repouso, que continham poucas mitocôndrias típicas e muitas membranas vesiculares.

Quando os procedimentos de isolamento de mitocôndrias são perfeitamente apropriados, estas retêm a mesma estrutura que possuem quando no interior dos tecidos, o que permite a realização de estudos bioquímicos, conforme observações e citações de PALADE (34).

Quase todos os estudos feitos em sementes, têm sido realizados com sementes embebidas, ou mesmo, submetidas à germinação. YATSU (50), entretanto, estudou a ultra-estrutura de sementes de algodão armazenadas em ambiente seco e salientou que qualquer técnica de estudo que envolva embebição do tecido, mesmo por períodos curtos, podem não refletir as condições originais.

Mitocôndrias são descritas por este autor, como ovoídes, apesar de ser bem comum encontrarem-se algumas irregulares; possuem a típica membrana dupla e as cristas convencionais; com frequência, pequenos glóbulos ou grânulos podem ser vistos dentro da matriz mitocondrial. Aspectos muito semelhantes, foram também constatados por YAMAKI e URITANI (48) em mitocôndrias preparadas com batata doce.

Os valores apresentados na tabela I, demonstram propriedades bioquímicas da fração mitocondrial. Tanto com succinato, quanto com Alfa-Cetoglutarato e mesmo com Isocitrato, a adição de ADP à mistura de reação, aumentou a velocidade respiratória, a qual voltou ao valor normal após o consumo do acceptor de fosfato (41). Isso demonstra que a oxidação e a fosforilação estão acopladas na cadeia respiratória presente à fração mitocondrial.

O valor da relação ADP/O, no caso do Alfa-Cetoglutarato como substrato, aproxima-se muito do teórico e segundo HACKETT (16) indica que há três etapas fosforilativas entre a pi-

ridina nucleotídeo e o oxigênio. Já o valor da mesma relação para o caso do Succinato como substrato, também é praticamente igual ao teórico, o que sugere a existência de duas etapas fosforilativas entre a Coenzima Q e o oxigênio.

O valor dessa relação para o Isocitrato como substrato, é ligeiramente maior do que 2,0 e está coerente com resultados apresentados por MURTHY e RAPPÓPORT (32) e por AKASAWA e BEEVERS (1).

Nesses particulares, a cadeia respiratória envolvida apresenta algumas características semelhantes às descritas em estudos com sementes embebidas e com "seedlings", bem como à cadeia respiratória de mitocôndria animal.

O espectro diferencial à temperatura ambiente, apresenta características semelhantes às descritas por outros trabalhos com mitocôndrias vegetais (25, 41, 47). Aí aparecem registrados aqueles componentes prontamente observados como participantes do transporte de elétrons. O pico de absorção da citocromo-oxidase está localizado em 600 μ , uns poucos μ mais próximo da região azul do espectro que a citocromo-oxidase de mitocôndrias animais, cuja alfa-banda é, geralmente, situada em 605 μ (49). A alfa-banda dos citocromos c está em 552 μ e os citocromos b aparecem como um ligeiro ombro centralizado em 560 μ . O pico de absorção que aparece ao redor de 516 μ , representa a combinação das bandas beta dos citocromos b e c. A faixa de SoRET é dominada pelo pico de absorção dos citocromos b, em 425 μ , enquanto que a citocromo-oxidase aparece como um pronunciado ombro em 442 μ . No caso de redução dos transportadores de elétrons da mitocôndria ser realizada por anaerobiose, em presença de succinato, esses resultados estão muito coerentes com os encontrados por WILSON e BONNER (45).

A concentração dos citocromos na cadeia respiratória (Tab. II), comparadas com dados apresentados por outros autores (2, 7, 25, 36, 45) indicam uma maior proporção de citocromo c, sobretudo em comparação com mitocôndrias isoladas de outras se-

mentes dormentes. WILSON e BONNER (45) encontraram resultados semelhantes quando estudaram, comparativamente, sementes de amendoim secas e embebidas. Para esses autores, a deficiência em citocromo c, existente numa semente seca, poderia prevenir uma descontrolada perda de substrato na ausência de um controle respiratório eficiente.

A perda do citocromo c, o qual ao contrário dos outros citocromos, não é firmemente ligado à membrana mitocondrial, é capaz de conseguir esse controle metabólico sem completa destruição das organelas respiratórias.

Considerando-se, também, à luz de outros trabalhos mencionados, que os tecidos de reserva da semente em repouso se acham metabolicamente controlados, a menor concentração de citocromo c em sementes assim mantidas, reforça a idéia desses autores (45). Quando novas mitocôndrias e novos sistemas puderem ser produzidos pelo crescimento do embrião, fato já bem demonstrado em vários trabalhos (1, 5, 11, 30, 46, 47) o consumo de substrato passa a ser controlado por meio de sistemas integrantes da cadeia respiratória (16, 17).

O comportamento bioquímico das mitocôndrias de pinhão sugere, entretanto, que suas características devem ser semelhantes às de mitocôndrias de tecidos vegetais maduros e ativos, em face das razões ADP/O constatadas para alguns dos componentes do Ciclo de Krebs e de um controle respiratório razoável (41). O conteúdo de água, normalmente encontrado nessas sementes, torna-se suficiente para agir como fator de quebra de dormência e, assim, desencadear a biogênese e o desenvolvimento de mitocôndrias, já várias vezes encontrados em sementes embebidas e em germinação (1, 5, 11, 33, 45, 51, 52).

Pelos resultados de seu comportamento bioquímico, podemos afirmar que os métodos de preparação da fração mitocondrial mostraram-se apropriados e que as maiores dificuldades na técnica de isolamento (18, 20, 21, 24, 40) foram superadas a contento. Considerando-se que a fração mitocondrial submetida à mi

microscopia eletrônica, teve uma alíquota testada em eletródio de oxigênio (Fig. 5) e considerando-se, ainda, que a microscopia eletrônica, desde o trabalho de PALLADE (34) tem sido uma das mais importantes técnicas de investigação estrutural dessas organelas celulares, as microfotografias das figuras 2, 3 e 4, deveriam retratar as características observadas no tecido original.

De fato, muitos dos detalhes aí observados coincidem em grande parte, com os descritos por YATSU (50) em sementes dormentes de algodão. Observam-se mitocôndrias em diversos estágios: umas totalmente típicas, com matriz abundante e bem visível e outras, numa fase oposta assemelhando-se, bastante, às formações vesiculares citadas por ele e por CHERRY (11), além de outras, com características intermediárias, reforçando a sugestão de que esse processo pode estar influenciado pelo conteúdo de água do tecido.

Nas mitocôndrias típicas é bem visível a disposição característica da matriz, dando um aspecto semelhante ao descrito por YAMAKI e URITANI (48) em uma das formas de mitocôndrias encontradas em preparações com batata doce.

A microfotografia eletrônica que abrange um campo maior (Fig. 2) mostra, entretanto, contaminação por outras frações além de uma proporção relativamente grande de mitocôndrias rompidas e num aspecto definido por YAMAKI e URITANI (48), como em degenerescência ou em degradação. Isso sugere firmemente, que o processo utilizado na preparação do material para a microscopia eletrônica, que foi o mesmo empregado para mitocôndrias animais, não se mostrou adequado e produziu modificações na sua estrutura, alterando suas características originais, que são as reveladas nas mitocôndrias íntegras (Fig. 4) e que são muito semelhantes as outras descritas, principalmente por YAMAKI e URITANI (48) e YATSU (50).

Tomando-se em conta esses resultados, temos, uma corroboração às hipóteses de NAWA e ASAHI (33), que afirmam que a

atividade respiratória de sementes parece ser dependente de seu conteúdo de água e de WILSON e BONNER (45) que comprovaram que sementes secas utilizam o oxigênio muito vagarosamente, em face de sua baixa porcentagem de água. Isso constitui uma justificativa para os cuidados em se armazenar sementes com baixo teor de água na sua composição e em ambientes secos, a fim de se preservar o seu poder germinativo.

CONCLUSÕES

1. A cadeia respiratória de sementes de pinheiro (Araucaria angustifolia (Bertol.) O. Ktze.) é semelhante à de outros tecidos vegetais e mesmo animais, em alguns de seus aspectos gerais.

2. A alta concentração relativa de citocromo c é indício de que a quantidade de água existente na semente já é suficiente para desencadear o processo de desenvolvimento de mitocôndrias, confirmado pelo comportamento bioquímico da fração mitocondrial.

3. Os métodos e procedimentos de preparação da fração mitocondrial, mostraram-se apropriados e as maiores dificuldades da técnica de isolamento foram superadas a contento.

4. O pico de absorção da citocromo-oxidase, centralizado em 600 m μ , é uma possível confirmação de que esse deslocamento no sentido do azul, é característica do sistema citocromo-oxidase de vegetais.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, à Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), por possibilitarem a realização deste trabalho.

A todo pessoal do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio, estímulo, cooperação e amizade.

Ao Diretor e Técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, dos quais dependeu a obtenção das microfotografias eletrônicas.

De modo especial ao Dr. Dinor O. Voss, pela orientação e assistência prestadas, que se constituíram em fatores indispensáveis à execução desta tese.

Às demais pessoas e instituições que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

01. AKAZAWA, T. and BEEVERS, H. Mitochondria in the Endosperm of the Germinating Castor Bean: a development study. Biochem J, 67, 115-18, 1957.
02. BACILA, M; VOSS, D.O. and CAMPELLO, A.P. The Respiratory Chain and the Oxidative Phosphorylation of Rat Mitochondria. An Acad Brasil Cienc, Vol 35 nº 3, 431-39, 1963.
03. BONNER Jr., W.D. A General Method for the Preparation of Plant Mitochondria. In: Methods Enzymol Vol 10; New York and London, Academic Press, 1967, 126-33.
04. BONNER Jr., W.D. and VOSS, D.O. Some Characteristics of Mitochondria Extracted from Higher Plants. Nature, 191, 682-4, 1961.
05. BREINDENBACH, R.W.; CASTELFRANCO, P. and PETERSON, C. Biogenesis of Mitochondria in Germinating Peanut Cotyledons. Plant Physiol, 41, 803-9, 1966.
06. CHANCE, B. Techniques for the Assay of the Respiratory Enzymes. In: Methods Enzimol Vol 4, New York, Academic Press, 1957, 273-329.
07. CHANCE, B. Spectra and Reaction Kinetics of Respiratory Pigments of Homogenized and Intact Cells. Nature, 169, 215-21, 1952.
08. CHANCE, B. and WILLIAMS, G.R. Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. I. Kinetics of Oxygen Utilization. J. Biol Chem, 217, 383-93, 1955.
09. CHANCE, B. and WILLIAMS, G.R. Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation. II. Difference Spectra. J Biol Chem, 217, 395-407, 1955.

10. CHANCE, B. and WILLIAMS, G.R. The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation. Advan Enzymol, 17, 65-134, 1956.
11. CHERRY, J.H. Nucleic Acid, Mitochondria and Enzyme Changes in Cotyledons of Peanut Seeds During Germination. Plant Physiol, 38, 440-46, 1963.
12. DALGARNO, L. and BIRT, L.M. Free Fatty Acids in Carrot tissue Preparations and their Effects on Isolated Carrot Mitochondria. Biochem J, 87, 586-96, 1963.
13. DUCET, G. and ROSENBERG, A.J. Leaf Respiration. Annu Rev Plant Physiol, 13, 171-200, 1962.
14. EARNSHAW, M.J. and TRUELOVE, B. Swelling and Contraction of Phaseolus Hipocotyl Mitochondria. Plant Physiol, 43, 121-9, 1968.
15. GREEN, D.E. Electron Transport and Oxidative Phosphorylation. Advan Enzymol, 21, 73-129, 1959.
16. HACKETT, D.C. Respiratory Mechanisms in Higher Plants. Annu Rev Plant Physiol, 10, 113-46, 1959.
17. HACKETT, D.C. Respiratory Mechanisms and Control in Higher Plant Tissue. In: WRIGHT, B. Control Mechanisms in Respiration and Fermentation. New York, The Ronald Press Company, 1963, 105-27.
18. HILL, R. and HARTREE, E.F. Hematin Compounds in Plants. Annu Rev Plant Physiol, 4, 115-50, 1953.
19. HOLTER, H. Localization of Enzymes in Cytoplasm. Advan Enzymol, 13, 1-20, 1952.
20. HULME, A.C. and JONES, J.D. Mitochondrial Preparations from the Fruit of the Apple. I. Preparation and General Activity. Phytochemistry, 3, 173-88, 1964.
21. HULME, A.C. and JONES, J.D. Mitochondrial Preparations from the Fruit of the Apple. II Oxidative Phosphorylation. Phytochemistry, 3, 201-12, 1964.

22. IKUMA, H. Necessary Conditions for Isolation of Tightly Coupled Higher Plant Mitochondria. Plant Physiol, 45, 773 - 81, 1969.
23. JONES, J.D. and HULME, A.C. Preparation of Mitochondria from the peel of Apples. Nature, 191, 370-2, 1961.
24. KU, H.S. et al. Isolation of Active Mitochondria from Tomato Fruits. Plant Physiol, 43, 883-7, 1968.
25. LANCE, C. and BONNER, Jr, W.D. The Respiratory Components of Higher Plants Mitochondria. Plant Physiol, 43, 756-66 , 1968.
26. LARDY, H.A. Energetic Coupling and the Regulation of Metabolic Rates. Proc Int Congr Biochem, 3^o, Brussels, 287 - 94, 1955.
27. LARDY, H.A. and WELLMAN, H. Oxidative Phosphorylations: Role of Inorganic Phosphate and Acceptor Systems in Control of Metabolic Rates. J Biol Chem, 196, 215-24, 1952.
28. LIEBERMAN, M. and BAKER, J.E. Respiratory Electron Transport. Annu Rev Plant Physiol, 16, 343-82, 1965.
29. LOWRY, O.H. et al. Protein Measurement with Folin phenol Reagent. J Biol Chem, 195, 265-75, 1951.
30. MALHOTRA, S.S. and SPENCER, M. Changes in Respiratory, Enzymatic and Swelling and Contraction Properties of Mitochondria from Cotyledons of Phaseolus vulgaris, L. during germination. Plant Physiol, 46, 40-4, 1970.
31. MILLERD, A. et al. Oxidative and Phosphorylating Activity of Plant Mitochondria. Proc Nat Acad Sci USA, 37, 855-62 , 1951.
32. MURTHY, M.R.V. and RAPPOPORT, D.A. Biochemistry of the developing Rat Brain. III. Mitochondrial Oxidation of Citrate and Isocitrate and Associated Phosphorylation. Biochim Biophys Acta, 74, 328-39, 1963.

33. NAWA, Y. and ASAMI, T. Rapid Development of Mitochondria in Pea Cotyledon during the Early Stage of Germination. Plant Physiol, 48, 67-9, 1971.
34. PALADE, G.E. Electron Microscopy of Mitochondria and Other Cytoplasmic Structures. In: GAEBLER, O.H. Enzymes: units of Biological Structures and Function. New York, Academic Press, 1956, 185-215.
35. PALADE, G.E. A Study of Fixation of Electron Microscopy. J Exp Med, 95, 285-97, 1952.
36. PIERPOINT, W.S. Mitochondrial Preparations from the leaves of Tobacco. Biochem J, 71, 518-28, 1959.
37. PIERPOINT, W.S. Mitochondrial Preparations from the leaves of Tobacco. IV Separation of Some Components by Density-Gradient Centrifuging. Biochem J, 82, 143-8, 1962.
38. REYNOLDS, E.S. Lead Citrate at High pH as an electron-epaque stain in electron microscopy. J Cell Biol, 17, 208 - 12, 1963.
39. SARKISSIAN, I.V. and SRIVASTAVA, H.K. On Methods of Isolation of Active Tightly Coupled Mitochondria of wheat Seedlings. Plant Physiol, 43, 1406-10, 1968.
40. SCHNEIDER, W.C. Mitochondrial Metabolism. Advan Enzymol, 21 1-72, 1959.
41. TARJAN, E.M. and VONKORFF, R.W. Factor Affecting the Respiratory Control Ratio of Rabbit Heart Mitochondria. J Biol Chem, 242, 318-24, 1967.
42. VOSS, D.O. et al. A New Oxygen Electrode Model for the Polarographic Assay of Cellular and Mitochondrial Respiration. Anal Biochem, 6, 211-22, 1963.
43. WATSON, M.L. Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. II. Applications containing Lead and Barium. J. Biophys Biochem Cytol, 4, 475-78, 1958.

44. WEIGL, D.R. and KISIELIUS, J. A. Inclusão em Crystic-araldite na Microscopia Eletrônica. Cienc Cult, 20, 657-60, 1968
45. WILSON, S.B. and BONNER JR, W.D. Studies of Electron Transport in dry and embibed Peanut Embryos. Plant Physiol, 48, 340-8, 1971.
46. WRIGGLESWORTH, J.M.; PACKER, L. and BRANTON, D. Organization of Mitochondrial Structures as Revealed by Freeze-etching. Biochim Biophys Acta, 205, 125-35, 1970.
47. YAKUSHIJI, E. Cytochromes Occurrence in Higher Plants and Algae. Acta Phytochim, 8, 325-9, 1935.
48. YAMAKI, S. and URITANI, I. Mechanism of Chilling Injury in Sweet Potato. VII. Changes in Mitochondrial Structure during Chilling Storage. Plant Cell Physiol, 13, 795-805, 1972.
49. YONETANI, T. Studies of Cytochrome Oxidase. I. Absolute and Difference Absorption Spectra. J Biol Chem, 235, 845-52, 1960.
50. YATSU, L.Y. The Ultrastructure of Cotyledonary Tissue from Gossypium hirsutum, L. seeds. J. Cell Biol, 25, 193-99, 1965.
51. YOUNG, J.L. et al. Conditions Affecting Enzyme Synthesis in Cotyledons of Germinating Seeds. Plant Physiol, 35, 288-92, 1960.
52. YOUNG, J.L. and VARNER, J.E. Enzyme Synthesis in the Cotyledons of Germinating Seeds. Arch Biochem Biophys, 84, 71-8, 1959.