

**SISTEMA ANTIOXIDANTE EM MUDAS DE CAFEEIRO SOB
CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

SIDNEI DEUNER

2007

SIDNEI DEUNER

**SISTEMA ANTIOXIDANTE EM MUDAS DE CAFEIEIRO SOB
CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Deuner, Sidnei.

Sistema antioxidante em mudas de cafeeiro sob condições de déficit hídrico / Sidnei Deuner. -- Lavras: UFLA, 2007.

65 p.: il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Estresse oxidativo. 3. Ácido ascórbico. 4. Peróxido de hidrogênio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD- 633.7321

SIDNEI DEUNER

**SISTEMA ANTIOXIDANTE EM MUDAS DE CAFEIEIRO SOB
CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 22 de junho de 2007

Prof. Dr. Marcos Antônio Bacarin	UFPel
Dra. Laudiene Meyer	UNICAMP
Profª. Dra. Ângela Maria Soares	UFLA
Profª. Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS

Prof. Dr. José Donizeti Alves

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A toda minha família, aos amigos de Lavras e de Arabutã e, em especial, a minha namorada, Raírys,

OFEREÇO.

Aos meus pais, irmãos e, em especial, a minha filha, Mariana,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, em todas as etapas do meu caminho.

Aos meus pais, Belmiro e Ladi Deuner e aos meus irmãos, Siclério, Lucinéia e Cristiane, por todo amor e encorajamento e por suportarem, junto comigo, a distância e a enorme saudade.

À minha filha, Mariana, que é meu maior motivo de alegria e a Bia, por ter sempre cuidado dela com amor e carinho.

À minha namorada, Raírys, pelo amor, apoio e maturidade que tem me passado ao longo desses anos juntos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização da pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao meu orientador, professor Dr. José Donizeti Alves, por toda a atenção, apoio, orientação e conselhos oferecidos durante esses três anos de convívio profissional.

Aos membros da banca examinadora: prof. Dr. Marcos Antônio Bacarin, Dra. Laudiene Meyer, profa. Dra. Ângela Maria, profa. Dra. Patrícia Goulart, Dra. Daniela Deitos Fries (suplente) e Dr. Marcelo Murad (suplente).

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal: Renato, Ângela, Donizeti, Amauri, Luiz Edson, Evaristo e Chalfun, por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao professor Evaristo Mauro de Castro, pelo auxílio nas análises de Anatomia Vegetal.

Aos colegas do laboratório, Ilisandra, Daniela, Camila, Emanuelle, André, Neidiquele e Paola, pela amizade e, principalmente, a grande ajuda na realização deste trabalho.

Aos funcionários técnico-administrativos: Evaristo (principalmente pela amizade), D'Artagnan e Izonel, por todo o auxílio, e a Lena, ao Joel e ao Odorêncio, pela simpatia sempre constante.

Aos amigos do Sul, Peterson, Daiane, Rafa, Vanessa, Duda e Danda, pela amizade e companheirismo.

Aos demais amigos e colegas da Fisiologia Vegetal.

Aos colegas de futebol, Jacaré, Helton, Sussuca, Rafael e Baul, que sempre se lembram de me chamar para um racha.

À Susy, pois só quem a conhece sabe da sua importância e da alegria que ela transmite.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a concretização dessa etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

BIOGRAFIA

Sidnei Deuner, filho de Belmiro Lauro Deuner e Ladi Deuner, nasceu em Arabutã, Santa Catarina, no dia 28 de julho de 1978. Coursou o ensino fundamental e médio no Colégio Estadual Ivonete Ribeiro, concluindo-o em 1996. Em 1997, foi aprovado no vestibular para o curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, RS. Em junho de 2002, graduou-se e iniciou o mestrado em Fisiologia Vegetal, também na Universidade Federal de Pelotas, RS. Em 2004, iniciou o doutorado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, MG, encerrando esta etapa profissional com a defesa da presente tese.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Estresse oxidativo	3
2.2 Mecanismo de defesa antioxidante.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Material vegetal.....	12
3.2 Experimento I: Ritmo diurno da resistência estomática, transpiração e atividade de enzimas do sistema antioxidante.....	12
3.3 Experimento II: Resistência estomática, transpiração, atividade enzimática e componentes do estresse oxidativo em cafeeiros sob estresse hídrico	13
3.4 Experimento III: Aplicação exógena de ácido ascórbico, ácido abscísico e peróxido de hidrogênio em epidermes isoladas de folhas de cafeeiro.....	14
3.5 Experimento IV: Pulverização foliar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio em mudas de cafeeiro em sala de crescimento e em casa de vegetação.....	15
3.6 Análises enzimáticas.....	16
3.7 Análises bioquímicas.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Ritmo diurno do movimento estomático.....	20
4.2 Perfil diário de atividade de enzimas do sistema antioxidante.....	22
4.3 Influência do estresse hídrico na abertura e no fechamento estomático e componentes do sistema antioxidante.....	25
4.3.1 Potencial hídrico.....	25
4.3.2 Resistência estomática e transpiração em função do estresse hídrico.....	26

4.3.3 Peroxidação lipídica.....	30
4.3.4 Atividade de enzimas do sistema antioxidante	33
4.3.5 Teores de ácido ascórbico e dehidroascorbato.....	37
4.4 Efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio e ácido abscísico sobre os diâmetros polar e equatorial em estômatos de epidermes isoladas de folhas de cafeeiro	39
4.4.1 Efeito do ácido ascórbico sobre o ácido abscísico e peróxido de hidrogênio	42
4.5 Pulverização foliar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio em mudas de cafeeiro em sala de crescimento.....	45
4.5.1 Resistência estomática e transpiração.....	45
4.5.2 Atividade de enzimas do sistema antioxidante	47
4.6 Pulverização foliar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio em mudas de cafeeiro em casa de vegetação, sob diferentes regimes hídricos.....	49
5 CONCLUSÕES	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RESUMO

DEUNER, Sidnei. **Sistema antioxidante em mudas de cafeeiro sob condições de déficit hídrico**. 2007. 65 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O presente estudo teve por objetivo avaliar a capacidade antioxidante em mudas de cafeeiro sob diferentes regimes hídricos e o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico (Asc) e H_2O_2 na atividade de enzimas antioxidantes e na abertura e fechamento estomático. Mudas de *Coffea arabica*, cv. Catuaí IAC 99, com 8 meses de idade, foram submetidas a capacidade de campo (CC), suspensão gradativa (SG) e suspensão total (ST) da irrigação por um período de 21 dias. Em CC, a cada três dias, os vasos eram pesados e a água perdida repostada. Para o regime SG, a água perdida era repostada em 80%, 60%, 40%, 20% e 0%, a cada três dias. Já para ST, a água foi suspensa a partir do primeiro dia. Foram realizadas avaliações do Ψ_w foliar na antemã (6h). As determinações enzimáticas, de peroxidação lipídica e dos teores de ácido ascórbico e dehidroascorbato foram realizadas em folhas coletadas às 17 horas, a cada três dias. Em casa de vegetação, mudas submetidas às mesmas condições descritas, após 12 dias do início do experimento, foram pulverizadas com Asc (20 mM) e H_2O_2 (1 mM). A mesma pulverização foi realizada em plantas mantidas em sala de crescimento, em condição de capacidade de campo. Após as pulverizações, foram avaliadas a resistência estomática, a transpiração e a atividade enzimática. Nas plantas em CC, o Ψ_w foi constante durante o período de avaliação. Para a SG, houve queda expressiva a partir dos 12 dias, chegando próximo a -2,5 Mpa, ao final do experimento. Já em ST observou-se queda no Ψ_w a partir do sexto dia de avaliação, chegando a -2,5 MPa aos 15 dias, período em que foi observado um aumento na peroxidação lipídica em relação às plantas em CC. Essa queda no Ψ_w para as plantas em SG e ST refletiu em aumentos na resistência estomática e diminuição da transpiração. A atividade das enzimas antioxidantes, bem como os teores de Asc e DHA, também respondeu de acordo com o Ψ_w , sendo observados aumentos nesses antioxidantes nos períodos de menor Ψ_w . A pulverização das plantas com H_2O_2 promoveu aumentos na resistência estomática e queda na transpiração em relação às plantas controle. Já a aplicação do Asc agiu de forma contrária. O efeito do H_2O_2 foi revertido pela aplicação do Asc. As pulverizações das plantas com H_2O_2 e Asc também alteraram a atividade das enzimas antioxidantes em relação às plantas controle.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, estresse oxidativo, ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio.

* Comitê Orientador: José Donizeti Alves - UFLA (Orientador), Evaristo Mauro de Castro (Co-orientador).

ABSTRACT

DEUNER, Sidnei. **Antioxidant system in coffee seedlings in conditions of water deficit**. 2007. 65 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The present research aimed to evaluate the antioxidant capacity in coffee seedlings on different water deficit levels and the effect of exogenous application of ascorbic acid (Asc) and H₂O₂ in antioxidant enzymes activity and in the stomata aperture and closing. Seedlings of *Coffea arabica* cv. Catuai IAC 99, with 8 months, of age were submitted to field capacity (CC), gradative suspension (SG) and total suspension (ST) of irrigation for a 21 days period. Considering the CC, each three days, the pots were weighed and the lost water was added again. For the SG, the water lost was replaced in 80%, 60%, 40%, 20% and 0%, each three days. For the ST system, the water was suspended from the first day. There were realized the leaf water potential (Ψ_w) evaluations at 6 h. The enzymatic analysis, lipidica peroxidation and ascorbic acid and dehydroascorbate levels were made in leaves collected at 17 hours, each three days. In greenhouse conditions cited below after 12 days from the beginning of the experiment were pulverized with Asc (20 mM) and H₂O₂ (1 mM). The same pulverization was made in plants kept in growth chamber in conditions of field capacity. After pulverizations, there were evaluated stomatic resistance, transpiration and enzymatic activity. In plants CC, the Ψ_w was constant during the evaluation period. For the SG, occurred a expressive drop since 12 days reaching close to -2,5 MPa in the end of the experiment. For the ST, it was observed a drop in Ψ_w from the sixth day of the evaluation reaching -2,5 MPa nine days later, period that was observed an increase in lipidica peroxidation in relation to plants in CC. This decrease in Ψ_w for the plants in SG and ST reflected the increase in stomatic resistance and decrease in transpiration. The activity in antioxidant enzymes as wells as the levels of Asc and DHA, also showed a pattern according to Ψ_w , being observed increases in these antioxidants in the periods of lower Ψ_w . The plant pulverization with H₂O₂ promoted increases in the stomatic resistance and decrease in transpiration in relation to control plants. Although, the exogenous Asc caused the contrary effect. The H₂O₂ effect was reverted by Asc application. The plant pulverization with H₂O₂ and Asc also altered the antioxidant enzymes activities in relation to control plants.

Keywords: *Coffea arabica*, oxidative stress, ascorbic acid, hydrogen peroxide.

* Guidance Committee: José Donizeti Alves (Adviser) - UFLA, Evaristo Mauro de Castro (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

O café tem grande importância econômica e social para o Brasil, que é o principal produtor e exportador mundial. É a segunda mercadoria mais comercializada no mundo, depois do petróleo, sendo a principal cultura em diversos países. Embora exista um grande número de espécies de cafeeiro, somente a *Coffea arabica* L. e a *Coffea canephora* Pierre têm importância econômica. O *C. arabica* representa cerca de 80% da área plantada no Brasil e aproximadamente 75% do café comercializado mundialmente (EMBRAPA Café, 2005).

Condições ambientais adversas podem causar diversos prejuízos ao cultivo do café. O déficit hídrico é uma situação comum à produção de muitas culturas, podendo causar um impacto negativo substancial no crescimento e no desenvolvimento das plantas. Quando a ocorrência do déficit hídrico é rápida, os mecanismos morfofisiológicos são severamente afetados e a planta necessita adaptar-se à nova situação, de forma rápida. Porém, sob condições moderadas de seca, ocorrem reduções gradativas na atividade fotossintética principalmente devido ao fechamento dos estômatos, que são os indicadores primários do déficit hídrico.

Sob estresse hídrico ocorre um aumento na produção de ácido abscísico (ABA) na folha, ocasionando a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células-guarda. O fechamento dos estômatos tem sido atribuído ao acúmulo de H_2O_2 nas células-guarda, o qual é ativado pelo ABA. A formação do H_2O_2 , nessas condições, normalmente, ocorre devido a um excesso do poder redutor formado em consequência da reduzida atividade do ciclo de Calvin. Nesse caso, os elétrons são utilizados para reduzir o oxigênio molecular, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos cloroplastos. Adicionalmente, a

mitocôndria e os peroxissomos são também potenciais produtores das EROs. Para proteger o aparato fotossintético do estresse oxidativo, as plantas necessitam dissipar o excesso energia, produzindo, assim, concomitante, aumento de substâncias e enzimas antioxidantes.

Nesse sentido, o sistema de defesa antioxidativo tem papel fundamental na aquisição de tolerância pelas plantas. A possível função dessa resposta é a proteção do aparato fotossintético, a preservação da integridade de membranas e a proteção de DNA e de proteínas.

Assim, o estudo da ação de componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos é uma ferramenta importante para o melhor entendimento da fisiologia do cafeeiro sob diferentes condições hídricas.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante em mudas de cafeeiro sob diferentes regimes hídricos e o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio na atividade de enzimas antioxidantes e na abertura e no fechamento estomático.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estresse oxidativo

A atmosfera da Terra, no decorrer da evolução biológica, tornou-se progressivamente mais rica em O₂, permitindo a evolução dos organismos aeróbicos, os quais utilizam O₂ como aceptor final de elétrons durante a respiração. Dessa forma, permite maior ganho energético, comparada à fermentação e à respiração anaeróbica (Scandalios, 1990; Elstner & Osswald, 1994).

Em face da espontaneidade das reações em organismos adaptados ao modo de vida aeróbico, o aparecimento de radicais livres intracelulares é normal, durante o ciclo de vida das plantas, sendo essencial para muitos processos biológicos. Entende-se que radical livre seja um átomo, ou um grupo de átomos, com elétrons não pareados na última camada eletrônica. São intermediários ou produtores de reações enzimáticas, principalmente na respiração e na fotossíntese e também fazem parte do evento em cascata formado em resposta a uma invasão microbiana (Rice-Evans et al., 1991). No entanto, passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes antioxidantes. Em qualquer uma dessas situações, passa a predominar um estresse oxidativo, denominado, em muitos casos como “explosão oxidativa” (Resende et al., 2003).

Os radicais livres, por serem eletronicamente instáveis, são altamente reativos, apresentando a capacidade de reagir com um grande número de compostos, “roubando” um elétron, a fim de se estabilizar (Elstner, 1987). Com a perda desse elétron, cria-se um novo radical livre, que irá deflagrar uma reação em cadeia, caracterizando, com isso, o estresse oxidativo, lesando seriamente vários componentes celulares. Portanto, se a produção dos radicais não é

controlada, eles podem tornar-se destrutivos para células e tecidos, podendo reagir com ácidos graxos insaturados das membranas e alterar a sua funcionalidade, além de diminuir a capacidade de fixação de carbono em cloroplastos e de promover peroxidação de lipídios, inativação de enzimas e degradação de ácidos nucleicos (Rice-Evans et al., 1991; Scandalios, 1993; Goodman, 1994).

Nesse contexto, o O_2 tem papel importante na produção de radicais livres, dando origem às chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) que são os elementos mais freqüentes nos processos de estresse oxidativo. A sua falta interfere diretamente na respiração e no transporte de elétrons, paralisando a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, levando a uma redução na carga energética (Albert et al., 1983; VanToai, 1989). A saturação da cadeia oxidativa com elétrons resulta no acúmulo de NADPH e NADH (Crawford, 1985). Assim, altos níveis de equivalentes redutores, baixa carga energética e componentes da cadeia de transporte de elétrons saturados oferecem condições favoráveis para a formação das EROs.

Entre as principais EROs que causam danos celulares pela oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singleto (1O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (McKersie & Leshem, 1994; Pastori & Foyer, 2002; Apel & Hirt, 2004).

Em plantas, as EROs podem ser produzidas em reações ocorridas na mitocôndria, nos cloroplastos e nos peroxissomos (Foyer & Noctor, 2000), em todos os órgãos, incluindo nódulos fixadores de nitrogênio, sendo utilizadas como armas contra patógenos invasores na explosão oxidativa (Moller, 2001).

Em geral, o $O_2^{\bullet-}$ é formado quando elétrons são mal direcionados e doados ao oxigênio, podendo ser produzido na planta por meio de vários mecanismos, inclusive pela ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas a membrana, peroxidases da parede celular e lipoxigenases. Sua formação é

resultante da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto e, normalmente, oxida várias moléculas orgânicas, como o ascorbato, ou atua como redutor de metais, como Fe^{3+} , nas reações de Haber-Weiss ou Fenton (Breusegem et al., 2001).

O H_2O_2 é um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que pode facilitar sua passagem através da bicamada lipídica da membrana celular. Essa alta capacidade de se difundir através da membrana celular favorece a rápida elicitação da resposta vegetal. A maioria do H_2O_2 celular surge da dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (Apostol et al., 1989).

Embora os OH^{\bullet} tenham meia-vida curta ($< 1 \mu\text{s}$), são os mais potentes oxidantes conhecidos com alta afinidade com biomoléculas no seu sítio de produção (Halliwell & Gutteridge, 1989), dificultando seu estudo. São hábeis em atacar, rápida e indiscriminadamente, todas as macromoléculas, causando sérios danos aos componentes celulares (Scandalios, 1993) e peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas, mutação do DNA (Browler et al., 1992), lesões no DNA, podendo levar a disfunções metabólicas irreparáveis e morte celular (Scandalios, 1993).

O $^1\text{O}_2$ tem, aproximadamente, $2 \mu\text{s}$ de vida, sendo altamente destrutivo, reagindo com a maioria das moléculas biológicas (Foyer et al., 1994). Porém, a maioria dos danos ocorre próximo aos sítios onde são produzidos. São, predominantemente, gerados nos cloroplastos, por meio da transferência de energia de uma clorofila foto-excitada para o elétron do oxigênio molecular.

Sob condições fisiológicas normais, a produção de EROs ocorre, mas é baixa, devido ao fato de as plantas possuírem mecanismos que as mantêm em níveis reduzidos (Scandalios, 1993). Entretanto, sua produção é aumentada como resultado de vários tipos de estresse biótico ou abiótico (Foyer et al., 1994). Exposição das plantas a condições de estresse, como seca, frio, alta

intensidade luminosa, radiação UV, metais pesados e alguns compostos químicos orgânicos, tem demonstrado ser agente causador de injúrias nos tecidos, decorrentes da aumentada produção de EROs (Hegedüs et al., 2001).

A indução de peroxidação lipídica é um dos efeitos mais danosos das EROs e um indicativo de sua produção, devido à sua reação com ácidos graxos insaturados, causando a peroxidação de lipídios de membranas essenciais da plasmalema ou de organelas intracelulares (Scandalios, 1993).

Apesar dos organismos aeróbicos disporem de vantagens energéticas significativas utilizando o oxigênio molecular como um oxidante terminal na respiração, a presença do oxigênio no ambiente celular constitui uma ameaça oxidativa constante às suas próprias estruturas e processos, devido ao seu potencial de agir como redutor parcial e, assim, formar as EROs (Mallick & Mohn, 2000), que podem se tornar altamente destrutivas para células e tecidos se sua produção não for estritamente controlada. Assim, a formação de EROs é uma consequência inevitável do metabolismo dos organismos aeróbicos e provocam estresse oxidativo devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (Rice-Evans et al., 1991).

2.2 Mecanismo de defesa antioxidante

Para a proteção das membranas celulares e organelas dos efeitos danosos das EROs, as células das plantas possuem um sistema de defesa antioxidante, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos que, normalmente, mantêm um balanço de EROs dentro das células. Dentre os antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11) e a glutathione redutase (GR, E.C. 1.6.4.2), bem como antioxidantes de baixo peso

molecular, não enzimáticos, como o ácido ascórbico, a glutatona e outros grupos tiólicos não protéicos que removem tipos diferentes de EROs (Foyer et al., 1994) e protegem a célula contra a injúria e a disfunção dos tecidos (Miquel, 1989). Além disso, em plantas, os carotenóides também possuem efeito antioxidante importante no sistema fotossintético (Halliwell, 1987).

As principais vias de limpeza das EROs em plantas (Figura 1), são o ciclo água-água nos cloroplastos que inclui a SOD; o ciclo ascorbato/glutaciona nos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos; e a CAT nos peroxissomos (Gomes Junior, 2006).

A SOD é a primeira enzima constituinte do sistema antioxidante enzimático, considerada uma enzima chave, uma vez que, além de remover o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), é capaz de controlar outras EROs, sendo os produtos de sua reação o H_2O_2 e o O_2 (Figura 1a-d) (Verma & Dubey, 2003; Mittler, 2002). É a única enzima cuja atividade determina a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , sendo, portanto, central no mecanismo de defesa, prevenindo, desse modo a formação do radical OH^{\bullet} (León et al., 2002). Contudo, o H_2O_2 é também tóxico para a célula e deve ser detoxificado pela catalase e ou peroxidases.

A CAT, presente nos peroxissomos, remove o H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos. É uma das enzimas envolvidas na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em altas concentrações, pois apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 (Mittler, 2002). Pertence a família das oxirredutases presente universalmente nos organismos que decompõe H_2O_2 em água e oxigênio molecular (Morita et al., 1994).

A APX, outra importante enzima do sistema de defesa antioxidante, é chave no ciclo ascorbato/glutaciona que reduz o H_2O_2 (quando em baixas concentrações na célula) até água, usando ascorbato como doador de elétrons, resultando na formação de dehidroascorbato (Figura 1b). Este é reciclado novamente a ascorbato usando a glutatona reduzida (GSH) como doadora de

elétrons, e a glutathiona oxidada (GSSG) é, então, convertida pela enzima glutathiona redutase (GR) dependente de NADPH (Asada & Takahashi, 1987).

A GR além de, juntamente com sua forma oxidada, manter um balanço redox nos compartimentos celulares, atua na eliminação do H_2O_2 citosólico e reage não-enzimaticamente com outras EROs, como oxigênio singlete, radical superóxido e radical hidroxila (Blokhina et al., 2003). Apesar disso, sua maior importância no sistema antioxidante está na habilidade em regenerar outros antioxidantes, como o ácido ascórbico. Tal função ocorre via ciclo ascorbato/glutathiona, cuja redução é realizada pela GR (Noctor & Foyer, 1998; Henriques et al., 2001). Desse modo, a SOD age como primeira linha de defesa, convertendo o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . A APX e a CAT, então, detoxificam o H_2O_2 . Em contraste à CAT (Figura 1d), a APX requer um ciclo regenerador de ascorbato e ou glutathiona (Figura 1a,c). Esse ciclo usa elétrons diretamente do aparato fotossintético (Figura 1a) ou NAD(P)H (Figura 1b,c) como poder redutor.

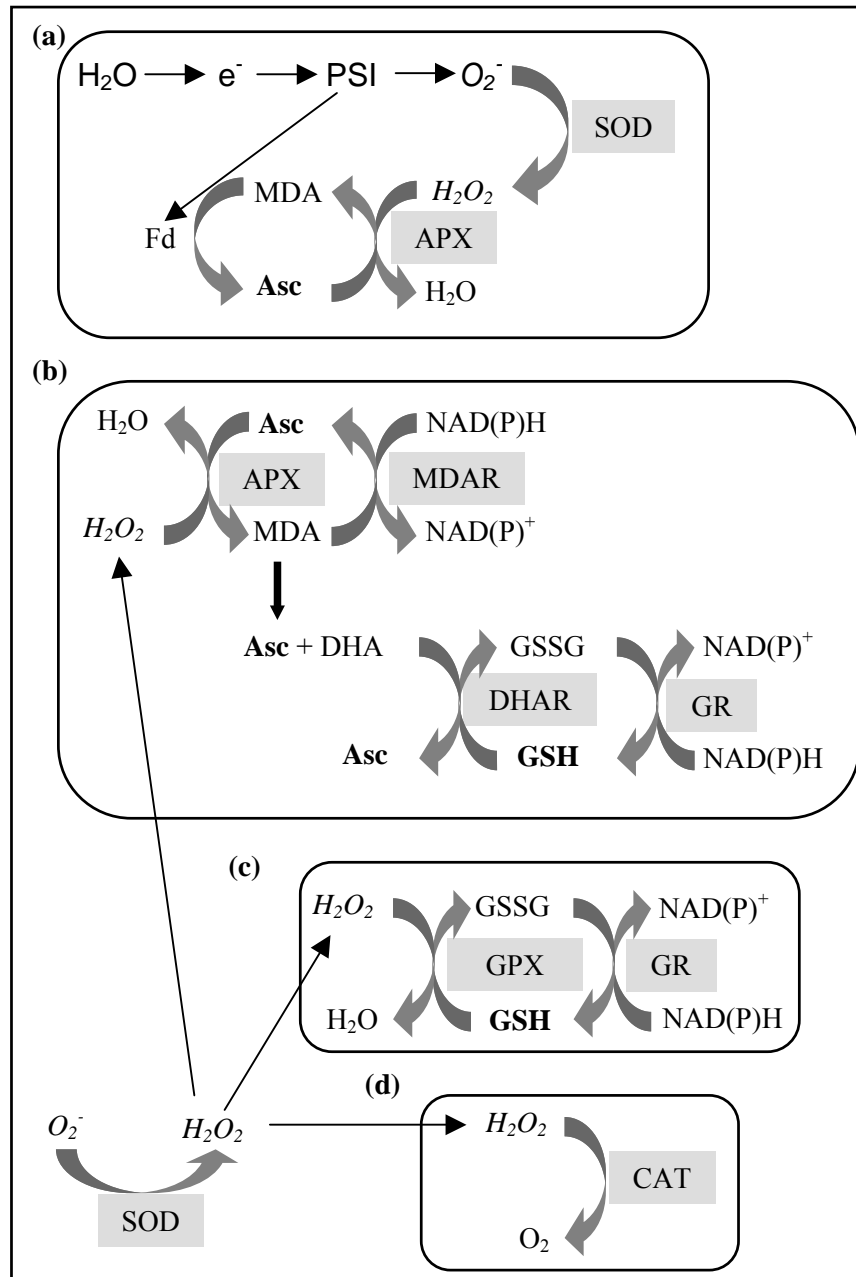


FIGURA 1. Rota das espécies reativas de oxigênio e sua remoção nas plantas: (a) ciclo água-água; (b) ciclo ascorbato/glutaciona; (c) ciclo glutaciona e (d) catalase (Adaptado de Mittler, 2002).

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

Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, as defesas antioxidantes não-enzimáticas são de fundamental importância para as células, sendo essencialmente compostas de concentrações relativamente altas de ácido ascórbico, glutatona, β -caroteno e α -tocoferol, que são eficientes consumidores de oxirradicais (Bowler et al., 1992).

O ácido ascórbico é o mais abundante antioxidante encontrado nas plantas, estando presente em concentrações que variam de 10 a 300 mM (Smirnoff, 2000) e sendo também o maior contribuidor do estado redox da célula. Está envolvido na regulação da fotossíntese, na expansão celular, na alongação das raízes e no transporte dos elétrons transmembrana (Noctor & Foyer, 1998; Smirnoff, 2000). Também é importante na remoção das EROs (Sinha et al., 2005).

Em seu papel antioxidante, o ácido ascórbico é utilizado pela APX para converter H_2O_2 a água e, por ser um antioxidante primário, reage diretamente com OH^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ e 1O_2 . Pode servir como cofator enzimático, como por exemplo, para a violaxantina de-epoxidase (VDE) (Eskling et al., 1997), que catalisa a conversão da violaxantina a zeaxantina (ciclo da xantofila), requerido para a dissipação do excesso de energia em excitação durante o quenching não fotoquímico (Horemans et al., 2000). É também um poderoso antioxidante secundário, reduzindo a forma oxidada do α -tocoferol, um importante antioxidante, em fases não aquosas. Em adição a sua importância no ciclo ascorbato/glutatona, o ácido ascórbico desempenha um papel na preservação da

atividade de enzimas que contêm íons metálicos prostéticos de transição (Noctor & Foyer, 1998).

A glutathione (GSH) é outro importante agente redox na maioria das células aeróbicas e desempenha uma rota importante em funções fisiológicas, incluindo regulação redox, conjugação de metabólitos, detoxificação de xenobióticos e homeostase e sinalização celular que engatilha as respostas adaptativas. Essas funções dependem da concentração e ou do estado redox da GSH foliar (Noctor et al., 2002). Além disso, a GSH tem importante função na remoção do H_2O_2 das células vegetais, via ciclo ascorbato/glutathione. Pode ser sintetizada no citosol, cloroplasto e mitocôndria e sua concentração nas células pode variar consideravelmente entre espécies e em diferentes órgãos ou estágios de desenvolvimento na mesma planta. Os cloroplastos contêm altas quantidades de GSH em razão do seu papel no ciclo ascorbato/glutathione (Creissen et al., 1994).

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

Dessa forma, uma condição de estresse torna-se crítica, causando injúrias nos tecidos das plantas sempre que os níveis de acumulação de EROs exceder a capacidade de detoxificação. Assim, o fator que determina o estresse oxidativo é a velocidade com que as plantas ativam suas reservas antioxidantes (Ranieri et al., 1993), aspecto este que pode conferir tolerância ao estresse (Sinha et al., 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Mudas de *Coffea arabica*, cultivar Catuaí IAC 99 com oito meses de idade, foram cultivadas em sacolas plásticas com capacidade de 3 litros contendo como substrato uma mistura de terra e esterco bovino na proporção de 4:1, mantidas em casa de vegetação coberta com sombrite 30% de interceptação da radiação solar por um período de dois meses. As mudas foram irrigadas diariamente, mantendo-se o nível de água do solo próximo à capacidade de campo até a indução dos tratamentos.

3.2 Experimento I: Ritmo diurno da resistência estomática, transpiração e atividade de enzimas do sistema antioxidante

As avaliações foram iniciadas em outubro de 2006, sendo realizadas em folhas do terceiro par, completamente expandidas, no período das 6 às 18 horas, com avaliações a cada duas horas. Em casa de vegetação as plantas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente, e em sala de crescimento as avaliações foram realizadas após uma semana de aclimação em ambiente semicontrolado com fotoperíodo de 14 horas, densidade de fluxo de fótons de, aproximadamente, $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As medições de umidade relativa e temperatura da cubeta, radiação, resistência estomática e transpiração foram realizadas por meio de porômetro modelo Steady State Porometer, Licor1600M. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições por período de avaliação. Cada repetição era composta por uma planta.

Após as avaliações realizadas com porômetro, para os mesmos horários e intervalos, foram coletadas folhas das plantas em casa de vegetação. O material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C para posterior análise das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR). Para as plantas em sala de crescimento, não foi realizada a análise enzimática, uma vez que os parâmetros observados por meio das leituras com porômetro apresentaram pouca variação.

3.3 Experimento II: Resistência estomática, transpiração, atividade enzimática e componentes do estresse oxidativo em cafeeiros sob estresse hídrico

Indução do estresse hídrico

As mudas utilizadas foram submetidas a três regimes hídricos: capacidade de campo (CC), suspensão gradativa da irrigação (SG) e suspensão total da irrigação (ST). Até o início do estabelecimento dos regimes hídricos, os vasos foram pesados e mantidos na capacidade de campo. A cada três dias, estes eram novamente pesados para a reposição da água perdida pela evapotranspiração. Para o regime de suspensão gradativa da irrigação, a água perdida a partir do primeiro dia e a cada intervalo de três dias era respondida em 80%, 60%, 40%, 20% e 0%. Para o regime de suspensão total da irrigação, a água foi totalmente suspensa a partir do primeiro dia. O experimento foi montado em DIC com três repetições por tratamento e as avaliações foram realizadas a cada três dias, durante o período de 21 dias.

Avaliações

O potencial hídrico de antemanhã (Ψ_w máximo) foi realizado entre 5 e 6 horas, em folhas do quarto par, com auxílio de uma câmara de pressão tipo Scholander.

A transpiração (E) e a resistência estomática (r_s) foram medidas às 10 e 17 horas. No segundo horário, foram coletadas as folhas para análises enzimáticas (SOD, CAT, APX e GR) e bioquímicas ((peroxidação lipídica, ascorbato (Asc) e dehidroascorbato (DHA)). O material coletado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer, a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, para posterior análise.

3.4 Experimento III: Aplicação exógena de ácido ascórbico, ácido abscísico e peróxido de hidrogênio em epidermes isoladas de folhas de caféiro

O experimento foi montado conforme descrito por Pei et al. (1997), com algumas modificações. Secções da epiderme abaxial de folhas de caféiro do terceiro par completamente expandidas foram incubadas em placas de Petri contendo tampão MES/KCl (MES 10 mM/KCl 50 mM) pH 6,1, livre de CO_2 e mantidas em sala de crescimento, com temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons de $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por 3 horas, a fim de promover a abertura dos estômatos, verificada mediante observação em microscópio de luz. Após esse período, as secções epidérmicas foram transferidas para nova solução do tampão MES/KCl acrescido de ácido ascórbico (1, 10 e 20 mM) ou ABA (25, 50 e 100 μM) ou de H_2O_2 (0,01; 0,1; 1 e 10 mM). As secções foram incubadas nas mesmas condições e a avaliação da abertura estomática foi realizada após uma, três, cinco e sete horas.

Para verificar o possível efeito do ácido ascórbico na reversão do fechamento estomático induzido pelo ABA e H_2O_2 , secções da epiderme abaxial

foram incubadas em solução tampão MES/KCl acrescida de ABA 100 μ M ou H₂O₂ 0,01 e 10 mM, por três horas. Após esse período, as epidermes foram transferidas e incubadas em nova solução tampão acrescida de ácido ascórbico nas concentrações de 1, 10 e 20 mM e a avaliação da abertura estomática realizada após uma, três, cinco e sete horas.

Para o preparo das lâminas, após lavagem em água destilada, as secções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio, por 1 minuto, com posterior lavagem triplíce em água destilada. As epidermes foram coradas com azul de toluidina 0,2% e as lâminas montadas em glicerina 50% e visualizadas em microscópio. As fotomicrografias foram realizadas em um fotomicroscópio Olympus BX-60 e os estômatos foram medidos através do programa Sigma Scan PRO 5.0, avaliando-se os diâmetros polar e equatorial e a média de sua razão, segundo a técnica de Labouriau et al. (1961).

3.5 Experimento IV: Pulverização foliar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio em mudas de cafeeiro em sala de crescimento e em casa de vegetação.

Mudas de cafeeiro oriundas da casa de vegetação foram transferidas para sala de crescimento, sendo mantidas irrigadas diariamente, próximo à capacidade de campo. Após uma semana de aclimatação, foram pulverizadas com soluções de ácido ascórbico ou peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 20 mM e 1 mM, respectivamente, acrescidas de 0,1% de Triton-X. A pulverização foi realizada às 13 horas e de hora em hora, por um período de 4 horas, foram feitas avaliações da resistência estomática, transpiração e a coleta de folhas do terceiro par totalmente expandido para posterior análise da

atividade das enzimas SOD, CAT, APX, e GR. As mesmas avaliações foram realizadas em plantas controle, que não foram pulverizadas.

Em casa de vegetação, foram realizadas pulverizações com ácido ascórbico (20 mM), peróxido de hidrogênio (1 mM) e peróxido de hidrogênio seguidas por nova pulverização com ácido ascórbico, duas horas depois. As pulverizações foram realizadas em plantas sob capacidade de campo, suspensão gradativa da irrigação e suspensão total da irrigação, 12 dias após a indução dos tratamentos como descrito anteriormente. O peróxido de hidrogênio foi aplicado às 14 horas, o ácido ascórbico às 15 horas e a coleta das folhas para as análises enzimáticas e anatômicas foi realizada às 16 horas. No tratamento combinado, o peróxido de hidrogênio foi pulverizado às 14 horas e, duas horas depois foi realizada a pulverização do ácido ascórbico, coletando-se o material vegetal às 17 horas. Em todos os tratamentos, foram realizadas leituras de transpiração e resistência estomática de hora em hora, de 14 às 17 horas. Para o controle, foram utilizadas plantas nos três regimes hídricos sem serem submetidas à pulverização.

3.6 Análises enzimáticas

Duzentos miligramas de tecido foliar foram macerados em N₂ líquido com 50% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado em 1,5 mL do seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Após centrifugação a 13.000 g por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi coletado e dessalinizado em Coluna Sephadex G-25 (PD-10). As colunas foram equilibradas com 30 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 com 1 mM de ácido ascórbico. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão e monitoradas a 280 nm. O eluato foi utilizado

para a atividade das enzimas e a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolis e Reis, 1977), em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μ M, NBT 75 μ M e riboflavina 2 μ M. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito pela seguinte equação:

$$\% \text{ DE INIBIÇÃO} = (A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$$

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998), com pequenas modificações. Sua atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, durante dois minutos, em um meio de reação incubado a 28°C, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM.

Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada segundo Nakano & Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação

incubado a 28°C foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um período de dois minutos, a partir do início da reação.

Redutase da glutathiona (GR)

A atividade da GR baseou-se no método de Cakmak et al. (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH pelo decréscimo na absorbância, a 340 nm, durante dois minutos. O meio de reação incubado a 28°C foi constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, glutathiona oxidada 1 mM e NADPH 0,075 mM.

3.7 Análises bioquímicas

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege & Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido foliar foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP e homogeneizado em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Duzentos e cinquenta microlitros do sobrenadante foram adicionados a 1 mL do meio de reação (0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA), incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação:

$$[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b),$$

Em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1)

A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g^{-1} de matéria fresca.

Ascorbato e dehidroascorbato

Ascorbato (Asc) e dehidroascorbato (DHA) foram determinados conforme descrito por Arakawa et al. (1981), com algumas modificações. Cem miligramas de tecido foliar foram macerados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (p/v) e o homogeneizado centrifugado a 10.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Ascorbato total (Asc + DHA) foi determinado após a redução do DHA pelo dithiothreitol (DTT). Trinta microlitros do sobrenadante foram adicionados ao seguinte meio de reação: 70 μL de TCA 5% (p/v), 125 μL de DTT 0,06% (p/v) e 125 μL de fosfato de sódio 0,2 M, pH entre 7 e 8 (ajustado com NaOH 1,2 M). Após incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foram adicionados 125 μL de *N*-ethylmaleimide 0,24% (p/v) e o pH de cada tubo aferido e ajustado entre 1 e 2, pela adição de TCA 20% (p/v). Em seguida, adicionaram-se 125 μL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 4% (v/v), 250 μL de Bathophenantrolina 0,5% (p/v) e 125 μL de FeCl_3 0,03% (p/v), homogeneizando-se a mistura vigorosamente e incubando-a, a 30°C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas a 534 nm.

O ascorbato foi determinado conforme descrito acima, substituindo-se o DTT por etanol absoluto em igual volume. Os valores DHA foram obtidos pela diferença entre os valores de ascorbato total e ascorbato. Todas as soluções foram preparadas em etanol absoluto, exceto o TCA e o fosfato de sódio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ritmo diurno do movimento estomático

De maneira geral, a resistência estomática (Figura 2A) e a transpiração (Figura 2B) apresentaram maior variação, durante o período de avaliação, nas plantas que se encontravam em casa de vegetação, comparadas àquelas que estavam em sala de crescimento. Em casa de vegetação, houve uma redução da resistência estomática entre 6 e 8 horas, aumentando ligeiramente até as 14 horas. A partir daí, um aumento brusco até as 18 horas foi observado quando, então, os estômatos se encontravam praticamente fechados.

A resistência estomática respondeu diretamente na transpiração, aumentando progressivamente até às 10 horas, estabilizando-se nas próximas 4 horas, seguindo-se uma queda brusca até às 18 horas (Figura 2B). O movimento estomático e seus efeitos na transpiração refletiram uma resposta à radiação e ao DPV. A abertura e o fechamento dos estômatos nas duas primeiras e quatro últimas horas, respectivamente, podem estar diretamente relacionados ao aumento e à queda da radiação (Figura 2C). Todavia, entre 8 e 16 horas, a resposta estomática pode ser explicado pelo aumento no DPV (Figura 2D). Em cafeeiro, os estômatos apresentam grande sensibilidade ao DPV entre a folha e o ar (Rena & Maestri, 2000).

Para as mudas em sala de crescimento, observou-se que, até às 10 horas, os estômatos estavam mais abertos, havendo, em seguida, um pequeno, mas progressivo, aumento na resistência, culminando em valores próximo a 25 s.cm^{-1} às 18 horas (Figura 2A). Como a radiação na sala de crescimento foi constante (Figura 2C), as respostas estomáticas podem estar relacionadas a outros fatores, como DPV e ou ritmo circadiano. Neste trabalho, o aumento do DPV (Figura 2D), principalmente a partir das 10 horas, pode ter influenciado no fechamento

estomático nesse mesmo período, reduzindo, com isso, a transpiração (Figura 2B).

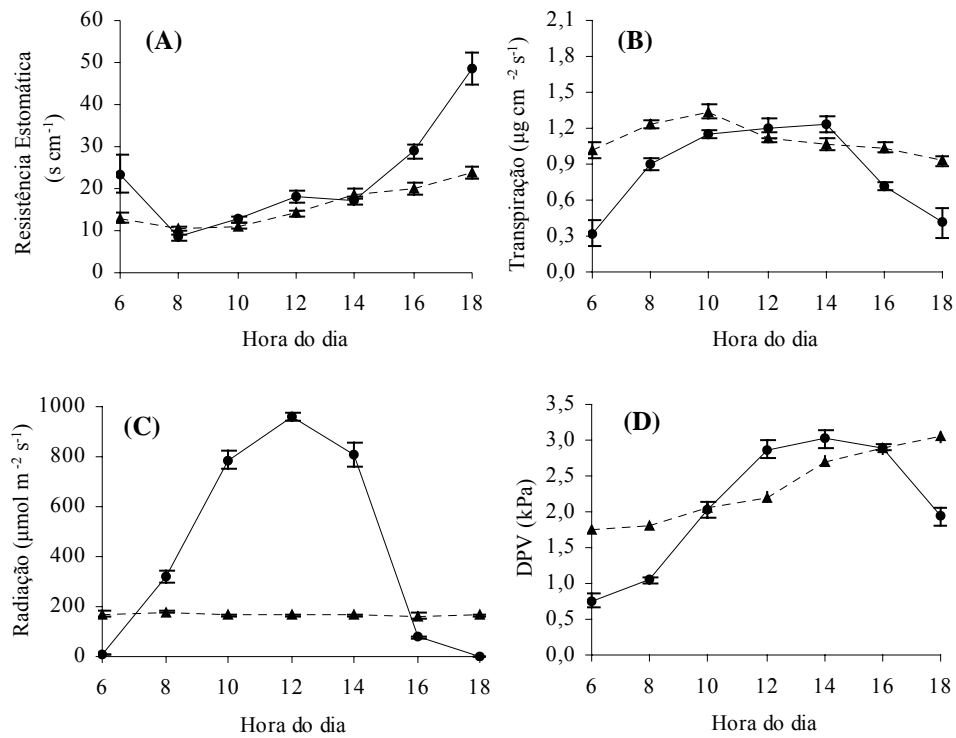


FIGURA 2. Resistência estomática (A), transpiração (B), radiação (C) e déficit de pressão de vapor (D), em mudas de café cv. Catuaí IAC 99 cultivadas em casa de vegetação (—●—) e sala de crescimento (---▲---). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Para plantas de café crescidas no campo, a condutância estomática é tipicamente mais elevada durante o início da manhã, diminuindo ao longo do dia com o aumento da irradiância e o DPV entre a folha e o ar (Gutiérrez et al., 1994; Barros et al., 1997). Além disso, durante períodos de menor temperatura no dia, a elevação da umidade relativa parece estimular a abertura dos

estômatos, especialmente quando a umidade do solo não está limitando (DaMatta 2004).

O DPV entre a folha e o ar é um importante fator ambiental que pode afetar o funcionamento dos estômatos nas plantas. Segundo Matzner & Comstock (2001), a condutância estomática diminui enquanto o DPV aumenta por causa de um aumento na transpiração que diminui o potencial hídrico da folha. Uma elevada transpiração pode ser responsável pelo fechamento dos estômatos pelo aumento do gradiente de potencial hídrico entre as células guardas e outras células epidérmicas ou pela diminuição do volume do potencial hídrico da folha (Monteith, 1995).

4.2 Perfil diário de atividade de enzimas do sistema antioxidante

A dismutase do superóxido (SOD), primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apresentou atividade constante até as 16 horas, aumentando, a partir daí, até às 18 horas (Figura 3A). Esse aumento, provavelmente, se deve ao acúmulo de EROs promovido pela radiação (Figura 2C). Para se evitarem danos celulares, a eliminação dessas EROs se faz necessária, sendo a SOD responsável pelo primeiro ajuste da tolerância das plantas ao estresse oxidativo. Como seu produto, o H_2O_2 é também um radical livre e seu acúmulo é tão prejudicial quanto o superóxido e precisa também ser eliminado, o que pode ser realizado tanto por catalases quanto por peroxidases (Willekens et al., 1995; Asada, 1999).

A catalase (CAT) diminuiu lentamente sua atividade até as 14 horas, mantendo-se estável até o final do período (Figura 3B). A atividade da catalase é

fundamental na eliminação do H_2O_2 , quando seu excesso é prejudicial, o que pode não ser o caso no presente estudo.

Já a atividade da ascorbato peroxidase (APX) mostrou-se estável até às 12 horas, caindo, a seguir, até às 14 horas (Figura 3C). No período posterior, sua atividade aumentou novamente, alcançando valores semelhantes aos observados nas primeiras horas do dia. Esse resultado pode ser atribuído à eliminação do H_2O_2 produzido pela SOD em uma reação de redução do ascorbato a dehidroascorbato. A atividade da GR não mostrou alteração com a evolução do dia (Figura 3D).

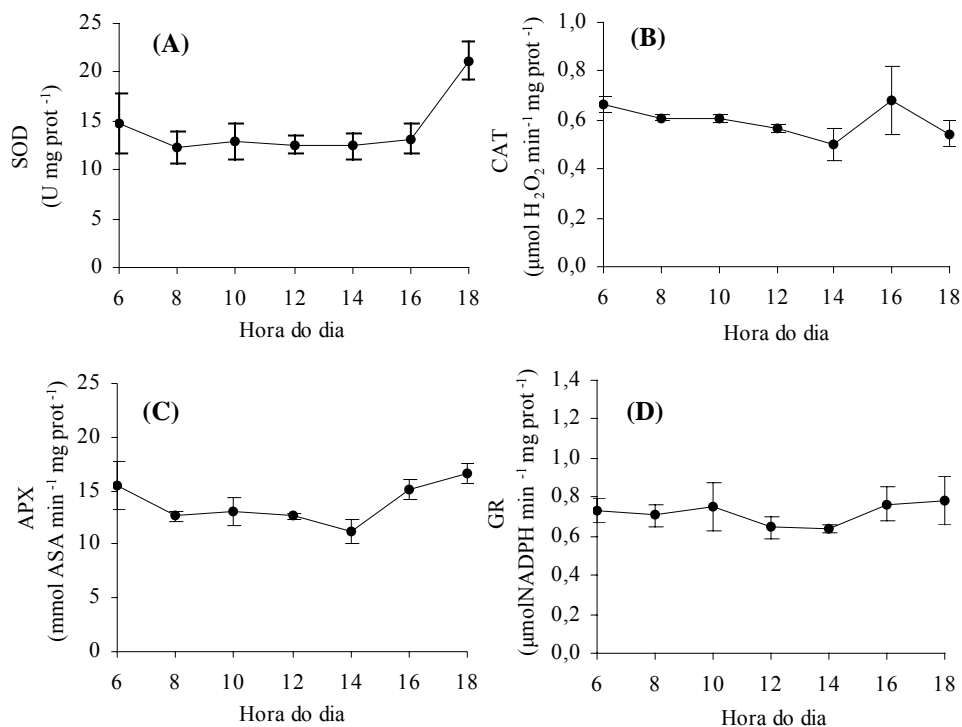


FIGURA 3. Perfil diário da atividade da SOD (A), CAT (B), APX (C) e GR (D), em mudas de cafeeiro cv. Catuaí IAC 99 cultivadas em casa de vegetação. As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

No processo de eliminação de EROs utilizando a APX, torna-se necessária a reciclagem do ascorbato, que é resultado da atividade das enzimas redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e redutase da glutathione (GR) (Asada, 1999).

Estes resultados mostram que a atividade dessas enzimas não estava diretamente relacionada com a abertura e o fechamento dos estômatos e sim com a radiação e o déficit de pressão de vapor. Sabe-se, ainda, que, em altas radiações, ocorre um aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante, a fim de eliminar as EROs que causam injúrias celulares. No presente caso, não houve excesso de radiação, uma vez que não ultrapassou os $1.000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, resultado das condições sombreadas em que as plantas se encontravam. Entretanto, o acúmulo de radiação nas horas mais quentes do dia pode ter influenciado a maior atividade da SOD e APX ao final do dia. Esses resultados permitiram definir os horários de 10 e de 17 horas para avaliações e coleta de material para os estudos com estresse hídrico.

Mudanças diurnas na expressão da SOD e da GR foram relatadas para *Aster tripolium* (Erdei et al., 1998). Chen & Gallie (2004), estudando a regulação diurna da atividade das enzimas antioxidantes em folhas de tabaco, verificaram que a DHAR, MDHAR, GR e a CAT tiveram menor atividade durante a manhã, aumentando ao longo do dia, chegando à atividade máxima durante à tarde. No entanto, a atividade da APX foi alta do início da manhã e até o meio da tarde e depois declinou. Em contraste com essas mudanças, a atividade da SOD permaneceu, na maior parte, inalterada durante todo o dia.

4.3 Influência do estresse hídrico na abertura e no fechamento estomático e componentes do sistema antioxidante

4.3.1 Potencial hídrico

Nas plantas em capacidade de campo (CC), o potencial hídrico apresentou valores constantes, próximos a -0,2 MPa, durante todo o período de avaliação (Figura 4). Já nas plantas em que a irrigação foi suspensa gradativamente (SG), aos 12 dias de avaliação, quando receberam somente 20% da água perdida, houve uma queda expressiva do potencial hídrico. Entretanto, aos 15 dias, quando as plantas ficaram totalmente sem água, essa redução foi mais acentuada, chegando a valores próximos a -2,5 MPa ao 21 dias, último período de avaliação. A suspensão total da irrigação (ST) promoveu redução no potencial hídrico a partir do sexto dia de avaliação, chegando a -2,5 MPa, já aos 15 dias. Valores inferiores a -2,0 MPa são considerados prejudiciais ao cafeeiro, uma vez que causam redução da condutância estomática e, conseqüentemente, das taxas fotossintéticas (Lima et al., 2002).

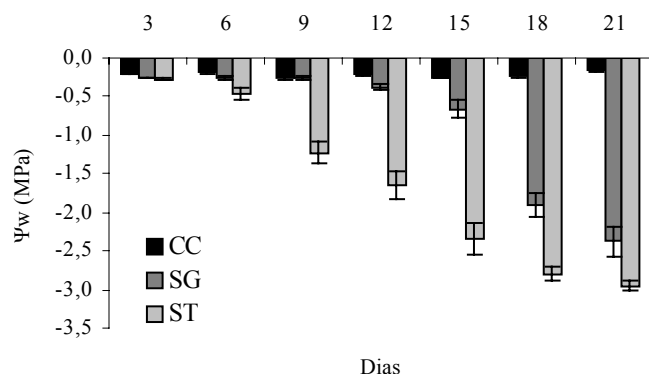


FIGURA 4. Potencial hídrico foliar (Ψ_w) de antemanhã, em mudas de cafeeiro cv. Catuaí IAC 99 submetidas a três regimes hídricos: capacidade de campo (CC), suspensão gradativa da irrigação (SG) e suspensão total da irrigação (ST). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Um estudo realizado por Levitt (1980) demonstrou que, durante um déficit hídrico, os diversos ajustes fisiológicos da planta determinam as respostas adaptativas de ordem anatômica e morfológica. Porém, essas respostas sofrem variações de acordo com a espécie, a cultivar, o estágio de desenvolvimento das plantas e a duração com a intensidade do déficit hídrico. Segundo o mesmo autor, as plantas têm capacidade de resistir a períodos de déficit hídrico, procurando utilizar mecanismos que reduzam a perda de água.

Quando a ocorrência do déficit hídrico é rápida, os mecanismos morfofisiológicos são severamente afetados e a planta necessita adaptar-se à nova situação, de forma rápida. Dessa forma, plantas cultivadas em condições de irrigação, normalmente, apresentam menor resistência a situações de déficit hídrico no solo, enquanto plantas submetidas ao déficit hídrico gradual ou à deficiência de água no solo no início do seu ciclo, se adaptam mais facilmente. A tolerância ao déficit hídrico parece ser um importante mecanismo de resistência para a manutenção do processo produtivo em condições de baixa disponibilidade de água às plantas (Lima et al., 2002).

Em cafeeiro, a condutância estomática tem mostrado uma diminuição linear com a diminuição do potencial hídrico foliar, sugerindo forte sensibilidade dos estômatos ao déficit hídrico (Pinheiro et al., 2005).

4.3.2 Resistência estomática e transpiração em função do estresse hídrico

A resistência estomática avaliada às 10 e às 17 horas, nas plantas que estavam na capacidade de campo (CC), não apresentou diferença durante o período de avaliação (Figura 5). Entretanto, a suspensão gradativa da irrigação (SG) e seus efeitos no potencial hídrico (Figura 4) influenciaram em aumentos na resistência estomática avaliada às 10 horas, a partir dos 12 dias do início do

experimento, sendo mais acentuado após 15 dias, quando a irrigação foi completamente suspensa (Figura 5A). Para as plantas com suspensão total da irrigação, diferença em relação à testemunha (CC) foi observada a partir do sexto dia e, em relação às plantas com suspensão gradual da irrigação, essa diferença foi observada a partir dos 12 dias.

De maneira geral, a avaliação realizada às 17 horas (Figura 5B) apresentou valores maiores de resistência estomática que aqueles verificados às 10 horas. Já aos nove dias de avaliação, observaram-se diferenças expressivas entre os três regimes hídricos e esta se acentuou com a evolução do experimento. Esses resultados mostram que a resistência estomática teve um comportamento, como era de se esperar, inversamente proporcional ao potencial hídrico (Figura 4).

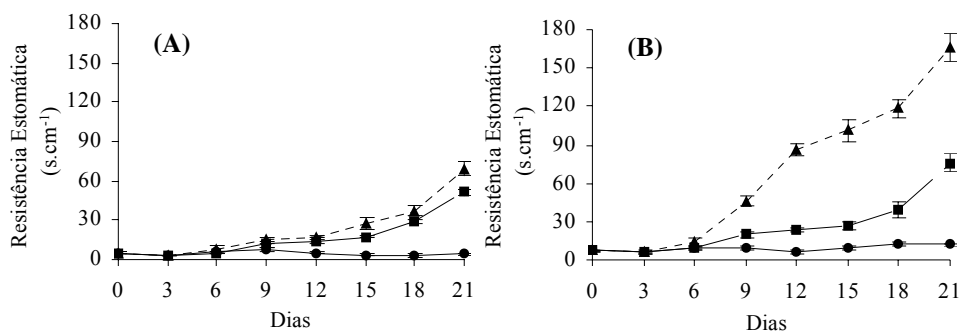


FIGURA 5. Resistência estomática avaliada às 10 (A) e 17 (B) horas, em mudas de café cv. Catuaí IAC99 submetidas a três regimes hídricos: CC (—●—), SG (---■---) e ST (---▲---). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

A taxa transpiratória avaliada às 10 horas manteve-se constante durante o período de avaliação para as plantas em capacidade de campo (Figura 6A), concordando com os dados de resistência estomática (Figura 5A). Diferentemente, às 17 horas (Figura 6B), houve redução na transpiração dessas

plantas após o terceiro dia do experimento. Essa diferença na transpiração entre os dois horários, provavelmente, se deve ao fato de que, às 10 horas, a demanda evaporativa era menor que às 17 horas.

Para as plantas em suspensão gradual da irrigação (SG), houve uma diminuição gradativa da transpiração ao longo das avaliações realizadas às 10 horas (Figura 6A), sendo inferior ao controle (CC) a partir do sexto dia. Para a avaliação realizada às 17 horas (Figura 6B), foi observada uma queda acentuada do terceiro ao nono dia. Daí em diante, a transpiração diminuiu lentamente, chegando próximo a zero, aos 21 dias.

A transpiração avaliada às 10 horas, nas plantas em que a irrigação foi totalmente suspensa desde o início do experimento, apresentou redução já no terceiro dia (Figura 6A). Essa redução foi gradativa até os 21 dias, chegando próximo a zero. Às 17 horas, uma queda acentuada do terceiro para o nono dia pôde ser verificada (Figura 6B), atingindo valores próximos de zero daí em diante. De maneira geral, o comportamento da transpiração observado, tanto às 10 horas quanto às 17 horas, refletiu o movimento estomático (Figura 5) que, por sua vez, seguiu o padrão estabelecido pelo potencial hídrico (Figura 4).

O déficit de pressão de vapor (DPV) observado às 10 horas mostrou-se diferente ao longo do período de avaliação (Figura 6C). Entretanto, esse comportamento parece não ter influência na transpiração das plantas em capacidade de campo para este período, uma vez que ela se manteve constante (Figura 6A). Já para a avaliação realizada às 17 horas, o DPV sofreu uma queda até o nono dia de avaliação (Figura 6D), aumentando bruscamente até os 15 dias, quando onde nova queda foi observada. Essa variação no DPV foi acompanhada pela transpiração, para os mesmos períodos.

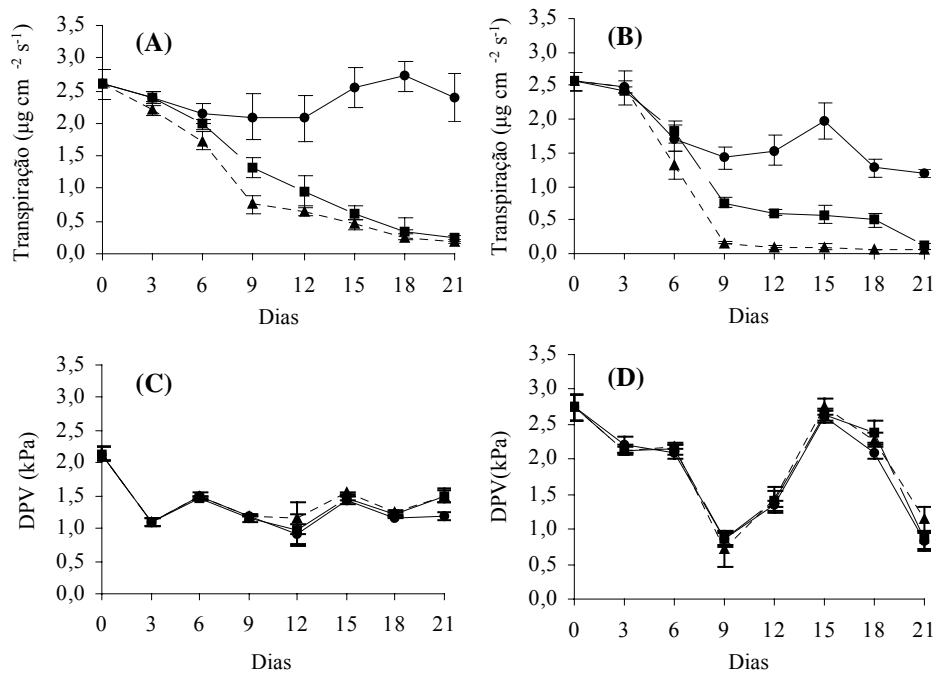


FIGURA 6. Transpiração avaliada às 10 (A) e às 17 (B) horas e déficit de pressão de vapor (DPV) avaliada às 10 (C) e às 17 (D) horas, em mudas de cafeeiro cv. Catuaí IAC 99 submetidas a três regimes hídricos: CC (—●—), SG (---■---) e ST (---▲---). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

O fechamento dos estômatos parece ser uma das primeiras estratégias utilizadas pelas plantas do cafeeiro para minimizar as perdas de água ocorridas com a transpiração em condições de baixos potenciais hídricos foliares (Barros et al., 1997). Estudos feitos com cafeeiros sob baixa disponibilidade hídrica têm relatado uma diminuição na condutância estomática em resposta a baixos potenciais hídricos das folhas (DaMatta, 1995; DaMatta et al., 2000).

Pinheiro et al. (2005) encontraram rápida recuperação do potencial hídrico, que foi acompanhada pelo aumento da condutância estomática após re-irrigar clones de *Coffea robusta* submetidos a estresse hídrico ($\Psi_w = -3.0$ MPa),

ênfatizando o papel do “status” hídrico da folha no controle estomático. Também, diversos estudos têm mostrado que a condutância estomática é maior nas folhas de sombra do que naquelas completamente expostas ao sol (Gutiérrez et al., 1994), particularmente durante toda a manhã.

4.3.3 Peroxidação lipídica

Há evidências de que os efeitos do estresse hídrico sobre as plantas podem ser mediados pela produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Smirnoff, 1993; Lawlor, 1995), levando a extensivos danos às membranas, desencadeando processos peroxidativos de lipídios (Alonso et al., 1997; Queiroz et al., 1998). No presente caso, a peroxidação lipídica (Figura 7) nas plantas controles (CC) aumentou, até os três primeiros dias, de 8,7 para 11,4 nmol de MDA.g⁻¹MF, permanecendo nesse patamar até os 12 dias, caindo a partir daí aos níveis iniciais. Plantas que estavam em suspensão gradativa e total da irrigação também mostraram um aumento na peroxidação lipídica nos três primeiros dias, retornando a valores iniciais aos 9 e 12 dias. Somente no período final das avaliações houve um aumento expressivo no teor de MDA dessas plantas em relação às plantas controle. Já para as plantas em suspensão total da irrigação, esse aumento foi observado dos 15 dias em diante.

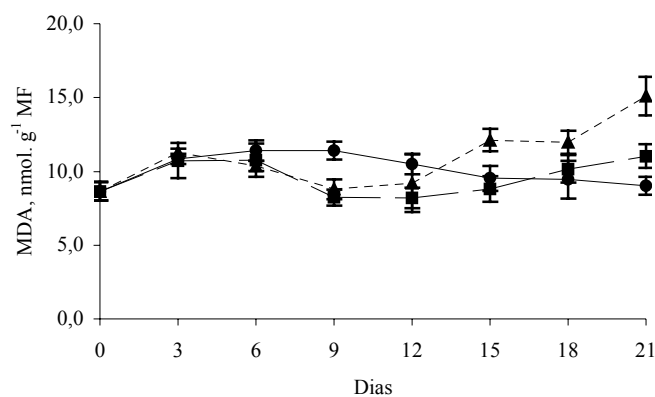


FIGURA 7. Peroxidação lipídica em mudas de cafeeiro cv. Catuaí IAC 99 submetidas a três regimes hídricos: CC (—●—), SG (—■—) e ST (---▲---). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Esse aumento na peroxidação lipídica, aos 15 dias de estresse para as plantas em suspensão total e aos 21 para as plantas em suspensão gradual da irrigação, ocorreu quando as plantas atingiram potencial hídrico de -2,5 MPa (Figura 4). Portanto, esses resultados mostram que a faixa de potencial hídrico limite que as plantas de café toleram é de -2,0 a -2,5 MPa. Valores inferiores a esses podem causar danos celulares que, dependendo de sua duração, comprometem os processos fisiológicos do cafeeiro. Como exemplo, observa-se um maior movimento estomático na direção do fechamento dos estômatos (Figura 5), chegando a quase zero a transpiração (Figura 6), exatamente quando as plantas atingiram -2,5 MPa, ou seja, aos 15 e aos 21 dias, para as plantas em suspensão total e gradual da irrigação, respectivamente. Nesse caso, observou-se que as planta sob suspensão total da irrigação estavam em estresse por, no mínimo, seis dias, enquanto que, para suspensão gradual, as plantas atingiram o estresse hídrico aos 21 dias, último período de avaliação.

A peroxidação da membrana celular afeta severamente a funcionalidade e a integridade da membrana, podendo causar danos irreversíveis ao funcionamento da célula, podendo ser iniciada por meio da ativação de espécies reativas de oxigênio (Edreva, 2005).

Segundo Blokhina et al. (2003), a peroxidação lipídica é o processo metabólico que ocorre em condições naturais, o que pode explicar os valores de peroxidação encontrados nas plantas nos primeiros períodos de avaliação. Vários trabalhos ilustram o aumento da peroxidação lipídica, sob diversos tipos de estresse: seca, em plantas de milho (Viana, 2002); altas doses de chumbo, em arroz (Verma & Dubey, 2003); estresse por alumínio, em soja (Cakmak & Horst, 1991) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (Peixoto et al., 1999); estresse por frio, em café (Queiroz et al., 1998) e outros.

Sob condições normais, as plantas, geralmente, são bem adaptadas para minimizar danos, devido à inevitável formação das espécies reativas de oxigênio na fotossíntese (Foyer et al., 1994). Porém, a seca intensifica a formação de radicais livres em plantas por limitar o "pool" de NADP⁺ disponível para aceitar elétrons do fotossistema I. Dessa maneira, aumenta a probabilidade de transferência de energia de excitação para o O₂, levando à produção de O₂^{•-} e ¹O₂, os quais reagem com os ácidos graxos das membranas, ocasionando a peroxidação lipídica (Smirnoff, 1993).

Cargnelutti (2007), estudando o efeito do metal mercúrio no estresse oxidativo em plântulas de pepino, verificaram que, na concentração 500 µM de HgCl₂, o nível da peroxidação de lipídeos aumentou 33%, após 10 dias e 250%, após 15 dias de exposição ao metal.

Outros trabalhos relacionam o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como mecanismo de defesa, degradando espécies reativas de oxigênio e favorecendo a diminuição da peroxidação lipídica (Aziz & Larher, 1998; Peixoto et al., 1999; Verma & Dubey, 2003). Yan et al. (1996),

trabalhando com uma cultivar de milho sensível ao encharcamento, encontraram um aumento progressivo na peroxidação lipídica até sete dias, com decréscimo da atividade de enzimas antioxidantes.

Iturbe-Ormaetxe et al. (1998), estudando o efeito do déficit hídrico em plantas de ervilha, observaram que os índices de MDA por grama de peso seco nas folhas das plantas com potencial hídrico de -1,3 e -1,93 MPa foram 24% e 45% superiores, respectivamente, às plantas controle, com potencial hídrico de -0,5 MPa. Em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico, Queiroz et al. (2002) verificaram que o nível de desidratação imposto levou à diminuição da atividade fotossintética, caracterizada pela redução da condutância estomática, decréscimos na taxa máxima aparente de elétrons e desencadeamento de um processo lipoperoxidativo nas membranas, em que uma redução de 45% no conteúdo relativo de água aumentou a peroxidação lipídica em, aproximadamente, 32%.

O aumento da produção de antioxidantes, combinado com a atividade de enzimas antioxidantes, parece ser a principal estratégia para limitar a peroxidação lipídica em plantas (Schmith & Kunert, 1986).

4.3.4 Atividade de enzimas do sistema antioxidante

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) em plantas sob suspensão gradual da irrigação diferiu da testemunha a partir dos 12 dias de estresse, permanecendo constante até os 15 dias, quando passou a aumentar até o final do experimento, aos 21 dias (Figura 8A). Esse aumento ocorreu justamente quando o potencial hídrico caiu de -0,7 a -2,5 MPa, aproximadamente (Figura 4) e a resistência estomática aumentou expressivamente para a avaliação realizada às 17 horas, nesse mesmo período (Figura 5B). Para as plantas sob suspensão

total da irrigação, a atividade da SOD aumentou lenta e constantemente a partir do início do experimento. Após 15 dias de estresse, esse aumento foi mais acentuado, coincidindo com o potencial hídrico próximo de -2,5 MPa, e aumentos bruscos na resistência estomática e peroxidação lipídica. Nessas plantas, a alta atividade da SOD parece participar eficientemente no controle da peroxidação lipídica até os 15 dias de estresse, apesar do aumento de sua atividade até os 21 dias.

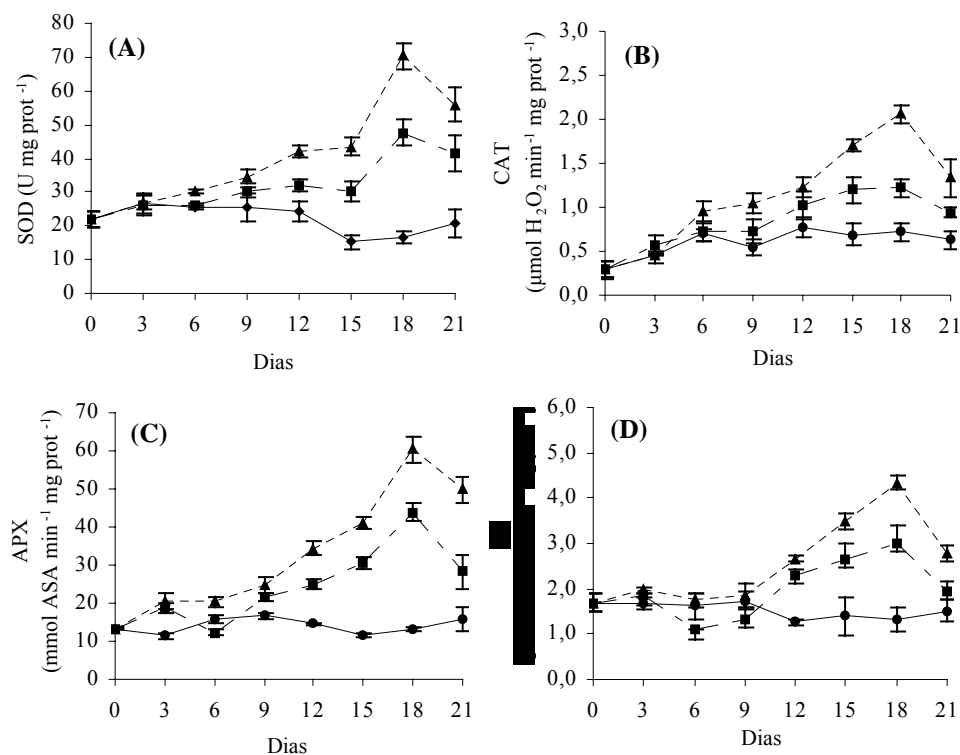


FIGURA 8. Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), APX (C) e GR (D), em mudas de café cv. Catuai IAC99 submetidas a três regimes hídricos: CC (—●—), SG (—■—) e ST (---▲---). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Entre as várias enzimas envolvidas na eliminação das EROs, a SOD pode ser considerada uma enzima chave, sendo, geralmente, a primeira linha de defesa de encontro ao estresse oxidativo (Willekens et al., 1995; Asada, 1999). Os resultados obtidos demonstram que o déficit hídrico induziu uma maior atividade da SOD, que determina a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , sendo central nos mecanismos de defesa requeridos para prevenir a formação do radical OH^{\bullet} (Gratão et al., 2005).

Embora a SOD faça parte do primeiro ajuste da tolerância das plantas ao estresse oxidativo, seu produto, o H_2O_2 , é também um radical livre tão prejudicial quanto o superóxido. De qualquer modo, maior grau de proteção contra danos oxidativos deve requerer um rápido metabolismo de H_2O_2 gerado pela ação da SOD.

Portanto, para o bom funcionamento da detoxificação de radicais livres, enzimas subseqüentes do sistema antioxidante devem atuar em sincronia para eliminar o H_2O_2 , como a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX) (Willekens et al., 1995; Asada, 1999). Verificou-se que, para as plantas, em ambas as condições de estresse, a CAT (Figura 8B) e a APX (Figura 8C) apresentaram comportamento semelhante ao da SOD. Para as plantas em suspensão total da irrigação, observou-se elevada atividade a partir de 15 dias, justamente quando ocorreram danos celulares, evidenciados pela peroxidação lipídica. Nas plantas sob suspensão gradual, os maiores danos foram observados quando ocorreu queda abrupta no potencial hídrico entre 12 e 21 dias.

A APX utiliza o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água, gerando monodehidroascorbato. Este, por sua vez, precisa ser regenerado novamente a ascorbato, a fim de manter o sistema antioxidante ativo. Para isso, outras reações enzimáticas estão envolvidas, intermediadas pela glutatona, a qual é oxidada (Biemelt et al., 1998). A manutenção do pool de glutatona reduzida para o processo depende da atividade

da redutase da glutathiona (GR). Aqui, novamente, a GR apresentou padrão de atividade semelhante ao de outras enzimas (Figura 8D).

O aumento na atividade das enzimas verificado nas plantas que estavam em suspensão gradual ou total da irrigação se deve, provavelmente, à indução do estresse oxidativo causado pela condição de deficiência hídrica. Sabe-se que, para o cafeeiro, potencial hídrico de -2,5 MPa é considerado crítico (Rena & Maestri, 2000).

Cargnelutti (2007) verificou que a atividade da SOD variou em função da concentração e do tempo de exposição ao mercúrio em plântulas de pepino, nas quais plântulas com 10 e 15 dias de idade apresentaram a maior atividade da SOD com 50 μM de HgCl_2 e a menor atividade foi observada com 250 μM de HgCl_2 . Entretanto, a atividade da CAT caiu em todas as concentrações de HgCl_2 testadas.

De acordo com Zhang & Kirkham (1996), a capacidade de manutenção, em níveis elevados, da atividade da SOD, da CAT e da APX, sob condições de estresses ambientais, é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção do H_2O_2 do ambiente intracelular. Segundo Cakmak & Horst (1991), a redução na atividade da CAT e o aumento nas atividades das peroxidases indicam que, em plantas mantidas sob condições de estresse, o H_2O_2 gerado é mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo.

A ação dessas enzimas, além da atuação de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato, podem, efetivamente, eliminar, varrer e imobilizar as EROs (Scandalios, 1993; Siegel, 1993).

4.3.5 Teores de ácido ascórbico e dehidroascorbato

Plantas mantidas na capacidade de campo mostraram pouca variação nos teores de ácido ascórbico e dehidroascorbato (Figura 9A e B) durante os períodos de avaliação. Entretanto, plantas submetidas à suspensão gradativa da irrigação apresentaram um aumento expressivo de ácido ascórbico a partir do nono dia, tendo os maiores teores sido observados aos 18 e 21 dias. Para as plantas em suspensão total da irrigação, os valores encontrados foram semelhantes aos do tratamento anterior, no entanto, houve uma queda aos 21 dias. Para os teores do dehidroascorbato, as plantas em suspensão gradativa da irrigação (Figura 9B) também apresentaram valores superiores ao verificado nas plantas controle a partir do nono dia, entretanto, não apresentaram variações entre os dias avaliados. Já as plantas em suspensão total da irrigação apresentaram aumentos nos teores de dehidroascorbato em relação ao controle, a partir do terceiro dia de estresse. Nessas plantas, os maiores teores foram observados aos 15 e aos 18 dias, quando também apresentaram alta atividade da enzima ascorbato peroxidase.

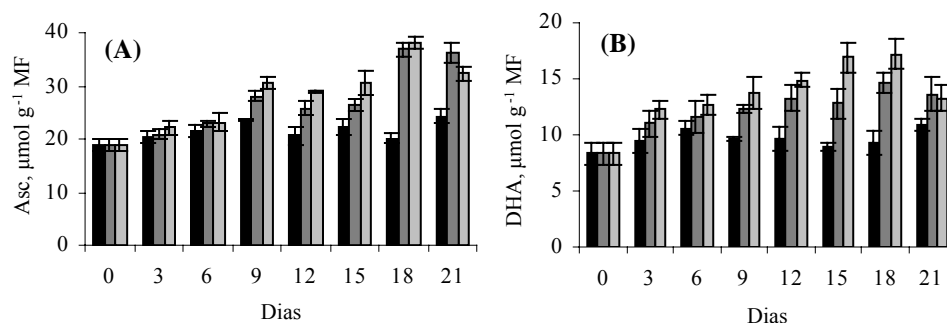


FIGURA 9. Ácido ascórbico (A) e dehidroascorbato (B) em mudas de café cv. Catuaí IAC 99 submetidas a três regimes hídricos: CC (■), SG (■) e ST (■). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

A ativação de enzimas do sistema antioxidante interfere nos teores de alguns compostos que participam dessas reações. O ácido ascórbico, além de ser um antioxidante não enzimático, atua como coenzima da APX e, portanto, seu conteúdo intercelular pode ser alterado em função de um estresse. O mesmo pode ocorrer com o dehidroascorbato, uma vez que ele é o produto da reação dessa mesma enzima (Asada, 1999).

O ácido ascórbico é componente essencial de tecidos de plantas e tem sido foco de numerosos estudos em relação às oxidações enzimáticas e não enzimáticas nos sistemas biológicos. Ele serve como um excelente antioxidante e desempenha um papel fundamental na remoção do H_2O_2 por meio do ciclo ascorbato/glutationa e produz DHA (Jiã & Wang, 2000; Sinha et al., 2005).

Cargnelutti (2007), estudando o efeito do metal mercúrio no estresse oxidativo em plântulas de pepino, verificou que os níveis de ácido ascórbico aumentaram de maneira dose dependente. O acúmulo máximo de ácido ascórbico foi observado nas plântulas tratadas com 500 μM de $HgCl_2$, em 10 dias de exposição.

As EROs estão envolvidas na oxidação do ácido ascórbico para formar dehidroascorbato, o qual é regenerado posteriormente até ácido ascórbico novamente (Fridovich & Handler, 1961). Os antioxidantes, tais como o ácido ascórbico e a glutathione, que são encontrados em concentrações altas (5-20 mM e 1-5 mM, respectivamente) nos cloroplastos e outros compartimentos celulares, são importantes para a defesa das plantas contra o estresse oxidativo (Zenk, 1996).

4.4 Efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio e ácido abscísico sobre os diâmetros polar e equatorial em estômatos de epidermes isoladas de folhas de cafeeiro

A incubação do tecido epidérmico em solução de ácido ascórbico promoveu abertura dos estômatos para todas as concentrações testadas, de maneira dose dependente (Figura 10). Os estômatos começaram a abrir uma hora após a incubação dos tecidos epidérmicos em solução de ácido ascórbico 20 mM. Para as demais concentrações, a abertura foi observada duas horas depois. Ao final do período de sete horas de observação, os estômatos de epidermes incubadas com 1 mM de ácido ascórbico apresentaram um incremento de, aproximadamente, 15% na abertura estomática, enquanto que, para as concentrações de 10 e 20 mM, esse aumento foi de 30%, aproximadamente.

Estes resultados podem ser observados na Figura 10B, na qual observa-se que, após cinco horas de incubação do tecido epidérmico em solução de ácido ascórbico 20 mM, praticamente todos os estômatos encontravam-se abertos.

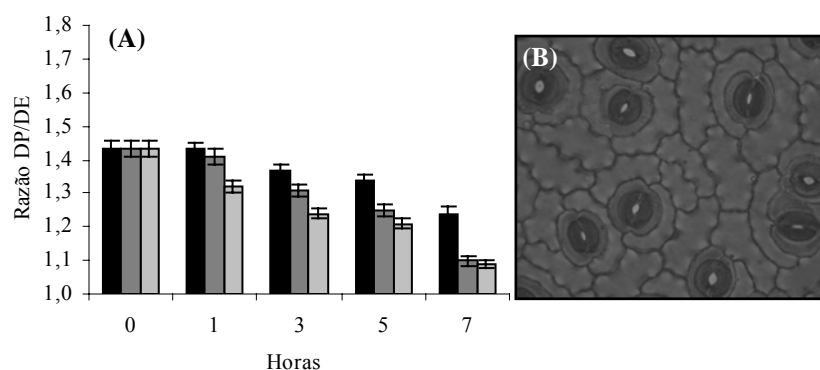


FIGURA 10. (A) Efeito do ácido ascórbico (■ 1 mM), (■ 10 mM) e (■ 20 mM) na razão diâmetro polar/equatorial em estômatos de epidermes de cafeeiro. O tempo zero representa o controle incubado em tampão por três horas. (B) Fotomicrografia da epiderme abaxial incubada por 5 horas em tampão contendo 20 mM de ácido ascórbico. As barras representam o erro padrão da média de 50 estômatos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

De maneira geral, ao contrário do efeito observado pela incubação de tecido epidérmico em solução de ácido ascórbico, o ácido abscísico (ABA) aumentou a relação entre DP e DE já na primeira hora de incubação, o que resulta em estômatos mais elipsóides, conseqüentemente mais fechados (Figura 11). Esse aumento na relação DP/DE foi praticamente linear ao aumento da concentração do ABA no meio de incubação. Para as concentrações de 25 e 50 μM de ABA, foram verificados os menores aumentos, aproximadamente 10% e 12%, respectivamente, após sete horas de observação, em relação ao controle. Entretanto, o maior incremento foi verificado para a concentração de 100 μM de ABA, em que, após sete horas de incubação, a relação DP/DE aumentou aproximadamente 16% em relação ao controle. Esses resultados mostram que o ácido abscísico atuou no fechamento dos estômatos, em todas as concentrações testadas (Figura 11A e B).

O ABA, que é extensamente aceito como sinalizador de estresse, induz uma redução na abertura estomática de maneira dose dependente (Schroeder et al., 2001).

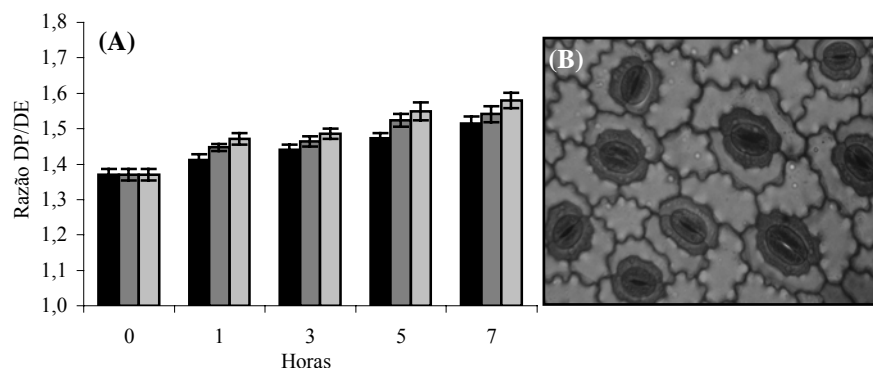


FIGURA 11. (A) Efeito do ABA (■ 25 μM), (■ 50 μM) e (■ 100 μM) na razão diâmetro polar/equatorial em estômatos de epidermes de cafeeiro. O tempo zero representa o controle incubado em tampão por três horas. (B) Fotomicrografia da epiderme abaxial incubada por 5 horas em tampão contendo 25 μM de ABA. As barras representam o erro padrão da média de 50 estômatos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também atua no fechamento estomático (Chen et al., 2003). As diferentes concentrações testadas mostraram uma resposta mais significativa que o ABA no fechamento dos estômatos e todas elas, assim como o ABA, também promoveram aumentos na relação DP/DE, uma hora após o início de incubação (Figura 12). Com o tempo, os estômatos foram se fechando proporcionalmente à concentração de H_2O_2 . Ao final do período de sete horas de incubação, os estômatos sob efeito de 10 mM de H_2O_2 apresentaram um fechamento cerca de 25% maior que o controle.

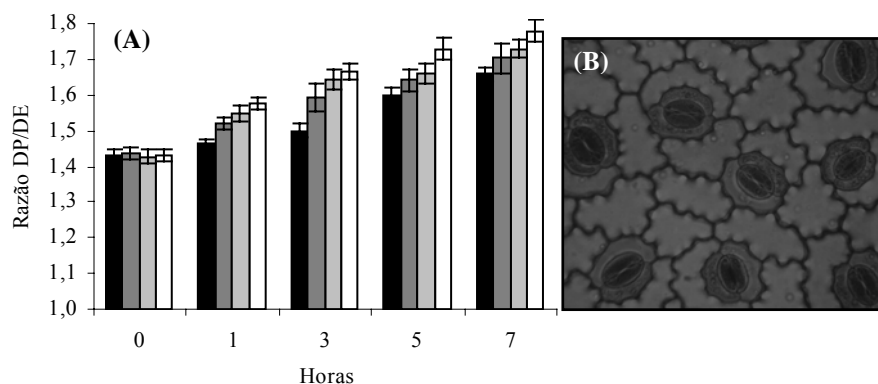


FIGURA 12. (A) Efeito do H_2O_2 (■ 0,01 mM), (■ 0,1 mM), (■ 1 mM) e (□ 10 mM) na razão diâmetro polar/equatorial em estômatos de epidermes de cafeeiro. O tempo zero representa o controle incubado em tampão por três horas. (B) Fotomicrografia da epiderme abaxial incubada por 5 horas em tampão contendo 1 mM de H_2O_2 . As barras representam o erro padrão da média de 50 estômatos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Esses resultados mostram que a aplicação exógena desses compostos interfere na abertura e no fechamento dos estômatos, podendo a biossíntese dos mesmos estar relacionada à tolerância ou à susceptibilidade à seca do cafeeiro.

Segundo Rocha (2005), a razão entre os diâmetros polar e equatorial fornece um bom indicativo do formato dos estômatos, na medida em que quanto maior esta razão, mais elipsóide é o formato estomático.

Algumas evidências têm sugerido que o H_2O_2 desempenha um papel intermediário comum e crítico como sinalizador no fechamento estomático induzido pelo ABA. Zhang et al. (2001), estudando o efeito do ABA e H_2O_2 no fechamento dos estômatos em *Vicia faba*, verificaram que a aplicação exógena de H_2O_2 promoveu o fechamento dos estômatos de maneira dose dependente, tendo seu efeito na promoção do fechamento dos estômatos sido significativo em uma concentração maior ou igual a 0,01 mM. Estes autores observaram, ainda, que o máximo efeito no fechamento dos estômatos foi conseguido após duas horas de exposição ao H_2O_2 na concentração de 1 mM, onde, a abertura estomática foi 46% inferior ao valor do controle. Entretanto, para concentrações de H_2O_2 menores ou iguais a 0,01 mM, seu efeito foi revertido quando os tecidos epidérmicos foram lavados e incubados em água.

4.4.1 Efeito do ácido ascórbico sobre o ácido abscísico e peróxido de hidrogênio

Como visto anteriormente, a incubação da epiderme em solução contendo ácido ascórbico teve um efeito positivo na abertura dos estômatos; já o ABA atuou para promover o fechamento dos mesmos. A incubação das epidermes em solução de ácido ascórbico, três horas após a incubação em ABA na concentração de 100 μ M, reverteu o fechamento estomático induzido por esse último (Figura 13). A melhor resposta na reversão do fechamento estomático induzido por ABA foi observada para o tratamento 20 mM de ácido ascórbico. Os resultados mostram que após o fechamento dos estômatos induzido pelo

ABA, a exposição do tecido epidérmico ao ácido ascórbico reverteu em aproximadamente 20% o fechamento dos estômatos.

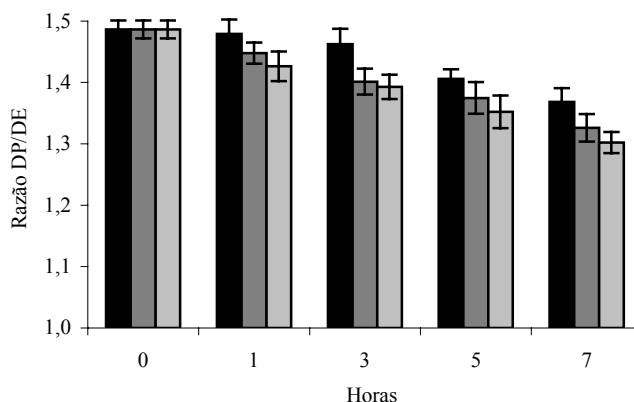


FIGURA 13. Efeito de diferentes concentrações de ácido ascórbico (■ 1 mM; ■ 10 mM e ■ 20 mM) sobre o efeito do ABA 100 µM, na razão diâmetro polar/equatorial em estômatos de epidermes de cafeeiro. O tempo zero representa o controle (ABA 100 µM) incubado por três horas. As barras representam o erro padrão da média de 50 estômatos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

A incubação das epidermes, por três horas, em H_2O_2 , seguida de sete horas em ácido ascórbico, ocasionou uma queda na relação entre DP e DE (Figura 14), como conseqüência uma abertura dos estômatos. De maneira geral, a resposta foi dose dependente e crescente com o tempo de incubação. A resposta do ácido ascórbico na concentração de 1 mM ao H_2O_2 0,01mM (Figura 14A) foi positiva somente cinco horas após sua incubação; já para o H_2O_2 10 mM (Figura 14B), essa resposta foi observada somente na última avaliação. Entretanto, as concentrações 10 e 20 mM de ácido ascórbico responderam ao H_2O_2 nas duas concentrações a partir da terceira hora de incubação. A maior concentração de ácido ascórbico, 20 mM, utilizada no meio de incubação,

reverteu o fechamento estomático em aproximadamente 20% para o H_2O_2 0,01 mM e 15% para H_2O_2 10 mM.

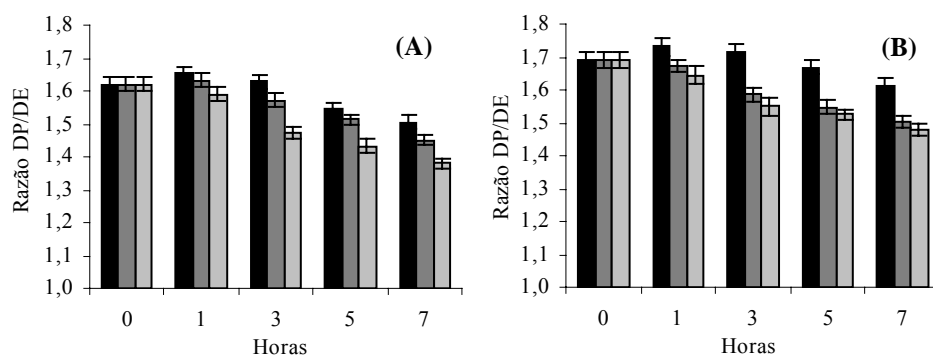


FIGURA 14. Efeito de diferentes concentrações de ácido ascórbico (■ 1 mM; ■ 10 mM e ■ 20 mM) sobre o efeito do H_2O_2 : A= 0,01 mM e B= 10 mM, na razão diâmetro polar/equatorial em estômatos de epidermes de cafeeiro. O tempo zero representa o controle (H_2O_2 0,01 e 10 mM) incubado por três horas. As barras representam o erro padrão da média de 50 estômatos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Estes resultados mostram que concentrações relativamente elevadas de ácido ascórbico na célula asseguram uma manutenção estável do estado redox celular. Zhang et al. (2001) observaram que a aplicação de ácido ascórbico e, em seguida, do H_2O_2 10 μM , reverteu por completo o fechamento estomático induzido pelo H_2O_2 .

4.5 Pulverização foliar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio em mudas de cafeeiro em sala de crescimento

4.5.1 Resistência estomática e transpiração

A resistência estomática não teve diferença para as plantas controle durante todo o período das avaliações (Figura 15A). Por outro lado, a aplicação exógena de H_2O_2 nas plantas ocasionou um aumento da resistência estomática a partir da segunda hora da pulverização, mantendo os estômatos fechados até o final do período de quatro horas de observação. Já a pulverização das folhas com ácido ascórbico diminuiu a resistência estomática, ou seja, promoveu maior abertura dos estômatos na primeira hora de sua aplicação, em comparação às plantas controle. Em seguida, a resistência estomática aumentou, permanecendo próxima aos valores encontrados para as plantas controle entre duas e três horas, chegando a valores próximos aos observados para as plantas pulverizadas com H_2O_2 na última avaliação.

A taxa transpiratória acompanhou o movimento estomático, diminuindo com o aumento da resistência (Figura 15B). Somente para as plantas controle, nas quais a resistência estomática não mostrou variação, a transpiração apresentou uma elevação linear do início para o final das avaliações. A transpiração observada após a pulverização das plantas com H_2O_2 teve um comportamento inversamente proporcional à resistência estomática, ou seja, conforme aumentou a resistência estomática, a transpiração diminuiu. Esse mesmo comportamento foi observado após a aplicação do ácido ascórbico, entretanto, ao contrário do H_2O_2 , o ácido ascórbico refletiu em aumentos da transpiração na primeira hora da sua aplicação e, para os períodos posteriores, houve ligeira diminuição.

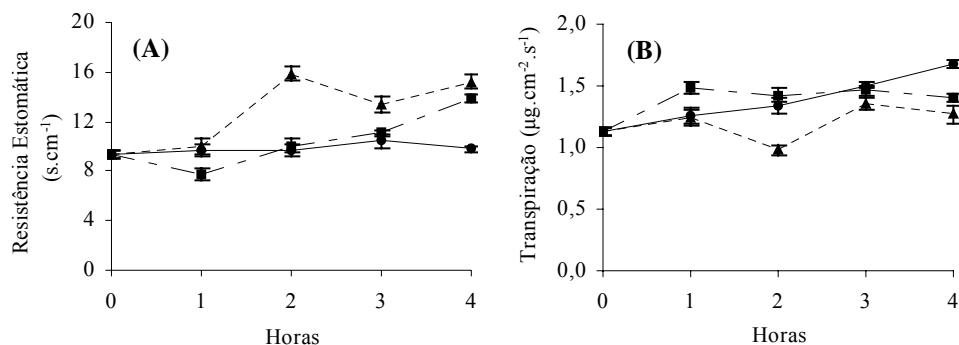


FIGURA 15. Efeito da pulverização foliar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio na resistência estomática e taxa de transpiração em mudas de cafeeiro. Controle (—●—), ácido ascórbico (---■---) e peróxido de hidrogênio (---▲---). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

De maneira geral, observou-se que o H_2O_2 teve maior efeito, tanto na resistência estomática quanto na transpiração, duas horas após a sua aplicação; para os períodos posteriores, seu efeito foi reduzido. Já o ácido ascórbico foi mais responsivo na primeira hora após sua aplicação.

A indução do fechamento dos estômatos *in vivo* tem sido atribuída ao acúmulo de H_2O_2 nas células-guarda, cuja produção é ativada pelo ácido abscísico. Uma vez acumulado nas células, o H_2O_2 ativa os canais de passagem de cálcio na membrana do vacúolo, aumentando a sua concentração no citosol (Kohler & Blatt, 2002), levando, com isso, a uma despolarização das células-guarda, efluxo de potássio, perda de turgor e, como consequência, o fechamento dos estômatos (Schroeder et al., 2001).

Zhang et al. (2001), estudando o efeito do H_2O_2 no fechamento estomático em *Vicia faba*, verificaram que a aplicação exógena de H_2O_2 promoveu o fechamento dos estômatos de maneira dose-dependente, observando um fechamento 54% maior que o controle. Esses autores ainda observaram que a

aplicação de ácido ascórbico reverteu o efeito do fechamento estomático induzido pelo H_2O_2 .

4.5.2 Atividade de enzimas do sistema antioxidante

De maneira geral, todas as enzimas do sistema antioxidante aqui analisadas apresentaram o mesmo comportamento em relação ao controle quando pulverizadas com H_2O_2 (Figura 16). A atividade da SOD (Figura 16A), CAT (Figura 16B), APX (Figura 16C) e GR (Figura 16D) aumentou a partir da primeira hora de pulverização, permanecendo até as quatro horas com valores acima do observado nas plantas controles. Esse aumento era esperado para CAT e APX, uma vez que o H_2O_2 participa diretamente da reação dessas enzimas. Ao mesmo tempo, a GR, por ser componente do ciclo do ascorbato/glutationa, tem sua atividade aumentada, devido à sua atuação na reciclagem do ascorbato. Por outro lado, como o H_2O_2 é um radical livre, seu excesso poderia, indiretamente, induzir a formação de superóxido e, conseqüentemente, uma maior atividade da SOD.

Sob influência do ácido ascórbico, a SOD e a GR permaneceram durante todo período de avaliação com atividade próxima ao controle. Por outro lado, CAT e APX mostraram atividades menores ao controle, a partir da primeira hora de observação.

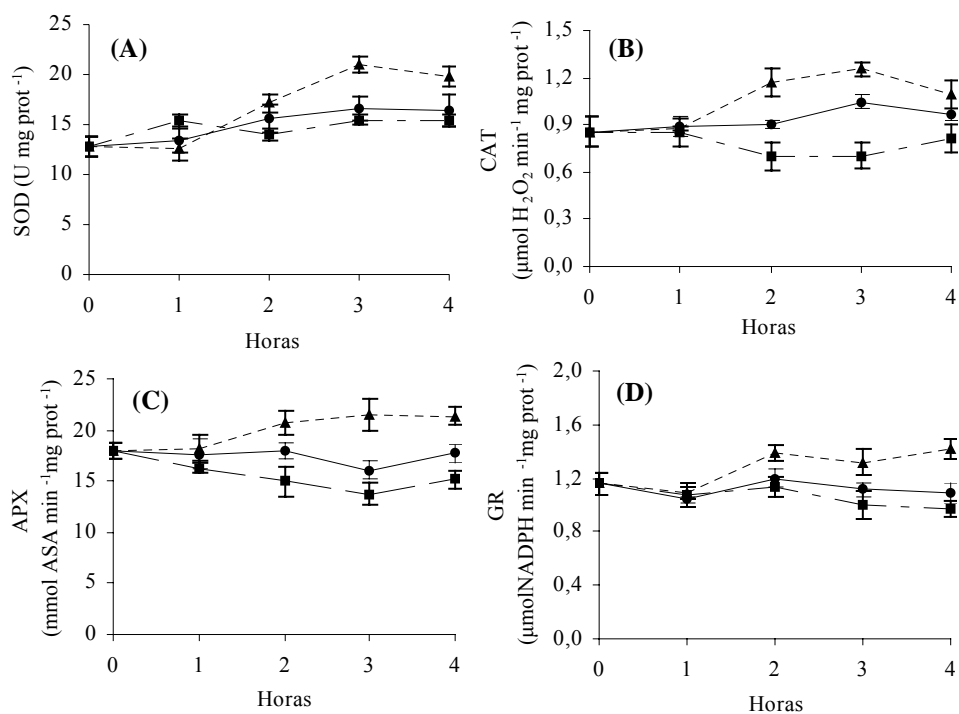


FIGURA 16. Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), APX (C) e GR (D) em mudas de cafeeiro cv Catuaí IAC 99 pulverizadas com ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio. Controle (—●—), ácido ascórbico (---■---) e peróxido de hidrogênio (---▲---). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

No sistema antioxidante, o ácido ascórbico é utilizado pela APX para converter H₂O₂ à água, e o ascorbato pode diretamente limpar os radicais superóxido, hidroxila e o oxigênio singlete. Esses fatores podem explicar a menor atividade das enzimas quando da aplicação do ácido ascórbico.

Segundo Chen & Gallie (2004), mudanças diurnas no estado redox do ácido ascórbico e na concentração do H₂O₂ são inversamente correlacionadas sugerindo a possibilidade de um contrapeso, ou seja, a alteração na concentração de um afetaria a concentração do outro.

4.6 Pulverização foliar de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio em mudas de cafeeiro em casa de vegetação, sob diferentes regimes hídricos

Plantas cultivadas em diferentes regimes hídricos apresentaram comportamento distinto para características relacionadas ao movimento estomático quando pulverizadas com ácido ascórbico e H_2O_2 em relação ao controle (Figura 17). Para as plantas em capacidade de campo, a pulverização com H_2O_2 promoveu aumento na resistência estomática a partir das 16 horas, quando comparadas ao controle. Quando aplicado ácido ascórbico às 16 horas, ou seja, duas horas após o H_2O_2 , esse aumento foi revertido. Já a pulverização com ácido ascórbico, isoladamente, mostrou uma queda na resistência estomática uma hora após sua aplicação, entretanto, perdeu seu efeito após duas horas. A transpiração correspondeu ao fechamento estomático (Figura 17B).

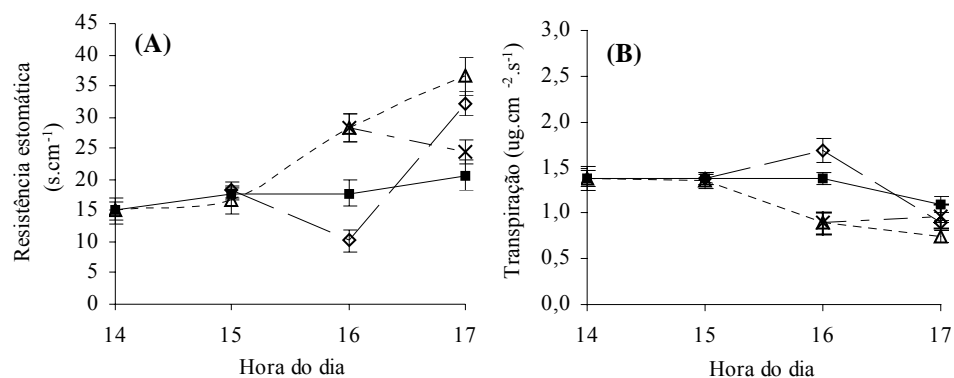


FIGURA 17. Resistência estomática (A) e transpiração (B) em mudas de cafeeiro, sob capacidade de campo, pulverizadas com diferentes soluções: —■— Controle (sem pulverização);▲..... H_2O_2 (pulverizado às 14h); -- x -- H_2O_2 + Asc (H_2O_2 pulverizado às 14h seguido de ácido ascórbico às 16h) e —◆— Asc (pulverizado às 15h). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Nas plantas em suspensão gradual da irrigação, em que os estômatos estavam mais fechados, o H_2O_2 foi mais eficiente, aumentando três vezes a resistência até às 17 horas (Figura 18A). A aplicação de ácido ascórbico após o H_2O_2 reverteu sua ação, voltando aos valores observados inicialmente. E, isolado, teve efeito semelhante ao verificado nas plantas em capacidade de campo.

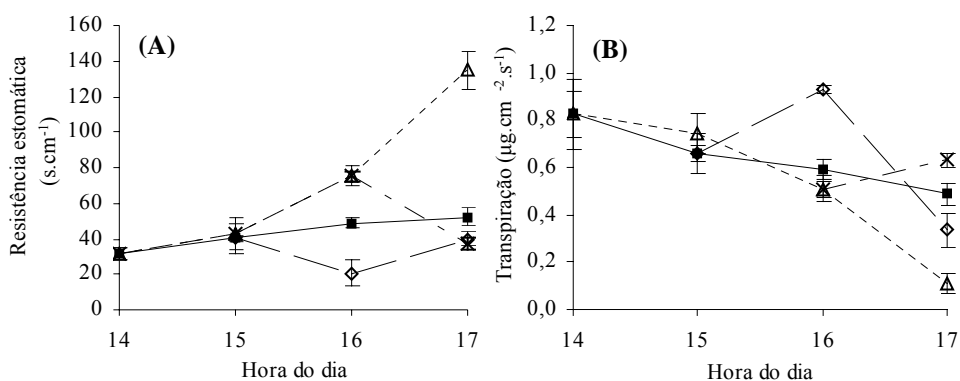


FIGURA 17. Resistência estomática (A) e transpiração (B) em mudas de café, após 12 dias de suspensão gradativa da irrigação, pulverizadas com diferentes soluções: —■— Controle (sem pulverização);▲..... H_2O_2 (pulverizado às 14h); -- x -- H_2O_2 + Asc (H_2O_2 pulverizado às 14h seguido de ácido ascórbico às 16h) e -◆- Asc (pulverizado às 15h). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Apesar de apresentar um efeito semelhante ao dos outros regimes hídricos para todas as pulverizações, verificou-se, nas plantas que estavam em suspensão total da irrigação, que o efeito do H_2O_2 não foi tão proeminente, uma vez que os estômatos já estavam mais fechados em função da deficiência hídrica (Figura 19A). Em contrapartida, o ácido ascórbico foi eficiente na reversão da ação do H_2O_2 e, quando aplicado isoladamente, manteve maior abertura estomática durante todo o período. A pulverização com ácido ascórbico,

principalmente para as plantas em suspensão total da irrigação, mostrou expressivo aumento na transpiração, o que pode não ter sido um resultado positivo para essas plantas, uma vez que a maior transpiração aumenta a perda de água.

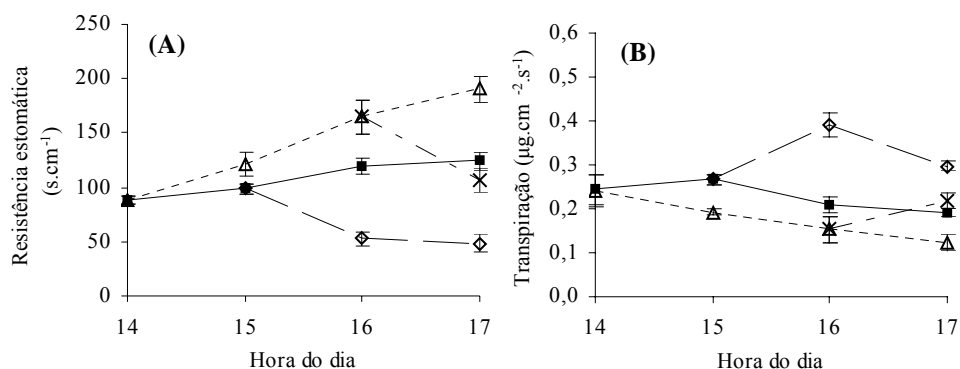


FIGURA 19. Resistência estomática (A) e transpiração (B) em mudas de cafeeiro, após 12 dias de suspensão total da irrigação, pulverizadas com diferentes soluções: —■— Controle (sem pulverização);▲..... H₂O₂ (pulverizado às 14h); - - x - - H₂O₂ + Asc (H₂O₂ pulverizado às 14h seguido de ácido ascórbico às 16h) e - -◆- - Asc (pulverizado às 15h). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

O ascorbato é o mais abundante antioxidante encontrado nas plantas e contribui para o estado redox da célula (Smirnoff, 2000), estando envolvido diretamente no controle do movimento estomático (Chen & Gallie, 2004). O decréscimo em seu estado redox pela repressão da expressão da redutase do dehidroascorbato aumenta o fechamento estomático sob condições normais de crescimento, seguido de um estresse hídrico.

Chen et al. (2003) observaram que mudanças no movimento estomático estavam inversamente correlacionadas ao nível de H₂O₂ presente nas células-guarda, o qual foi mais baixo em células-guarda com elevado estado redox de ascorbato. O papel do ascorbato no funcionamento das células-guarda pode ser

compreendido pela sua ação como limpador de H_2O_2 uma vez que o balanço entre a produção de H_2O_2 e o estado redox do ascorbato estabelece qual a concentração de H_2O_2 pode provocar o fechamento dos estômatos.

De maneira geral, a pulverização das plantas com ácido ascórbico, H_2O_2 e ácido ascórbico após o H_2O_2 não causou aumentos expressivos na atividade das enzimas para o regime hídrico capacidade de campo, quando comparada à não pulverização (Figura 20). Para o regime suspensão gradativa, enquanto a pulverização com H_2O_2 praticamente não influenciou na atividade das enzimas, a presença do ácido ascórbico promoveu aumentos na atividade da SOD e da APX. A GR mostrou aumento somente para a pulverização de ácido ascórbico após o H_2O_2 . Para essas plantas, a reversão da ação do H_2O_2 com ácido ascórbico ou ele sozinho, ao promover maior abertura estomática, parece aumentar a intensidade do estresse oxidativo, uma vez que as atividades da SOD e da APX foram maiores que o controle ou que a pulverização com H_2O_2 , respectivamente.

Para as plantas em suspensão total da irrigação, novamente, o ácido ascórbico promoveu aumentos na atividade da SOD e APX (Figura 20A e C). A pulverização com H_2O_2 , embora não tenha sido tão expressivo, apresentou tendência a reduzir a atividade dessas enzimas. A CAT mostrou pequena variação, apresentando diferença somente entre a pulverização com H_2O_2 e com ácido ascórbico. Já para a GR, observou-se maior atividade para a pulverização de ácido ascórbico após o H_2O_2 e para o ácido ascórbico isoladamente.

Esses resultados permitem sugerir que a atuação do H_2O_2 exógeno no fechamento estomático pode reduzir os danos causados pelo estresse, apresentando efeito contrário ao do ácido ascórbico. Dessa forma, o aumento do estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado à perda de água e uma maior eficiência no fechamento estomático pode permitir a tolerância das plantas por mais tempo, em condições de deficiência hídrica.

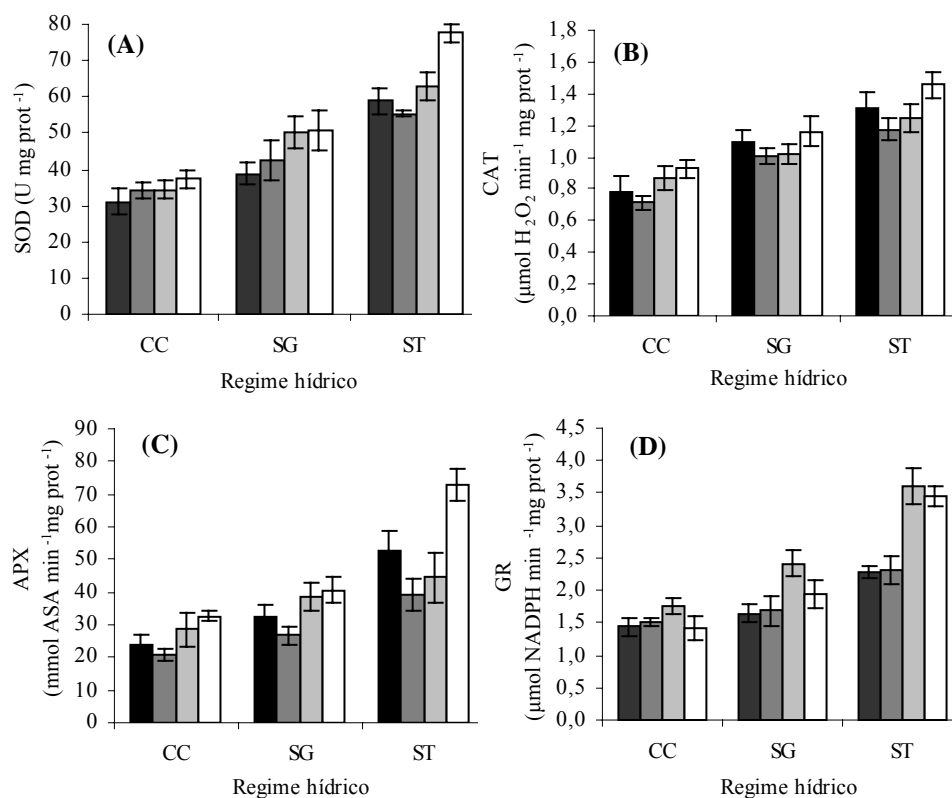


FIGURA 20. Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), APX (C) e GR (D) em mudas de café cv. Catuaí IAC 99 submetidas a três regimes hídricos: CC (capacidade de campo); SG (suspensão gradativa da irrigação) e ST (suspensão total da irrigação) e pulverizadas com diferentes soluções após dose dias de estresse: Controle (■); H₂O₂ (■); ácido ascórbico duas horas após o H₂O₂ (■) e ácido ascórbico (□). As barras representam o erro padrão da média de três repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

A relação entre os diâmetros polar e equatorial para as plantas em capacidade de campo, foi superior para a pulverização com H₂O₂, quando essas plantas foram comparadas as plantas controle não pulverizadas (Figura 21). Quando pulverizadas com H₂O₂ seguido de ácido ascórbico, essas plantas não diferiram do tratamento controle. Para as plantas pulverizadas com ácido

ascórbico, houve pequena redução na relação DP/DE, apresentando-se os estômatos mais abertos em relação aos demais tratamentos.

Para o regime de suspensão gradativa da irrigação, plantas pulverizadas com H₂O₂ não diferiram do controle. Entretanto, quando pulverizadas com H₂O₂ seguido de ácido ascórbico e somente ácido ascórbico, principalmente, observou-se um expressivo aumento na abertura dos estômatos observado pela menor relação DP/DE. Resultado semelhante foi observado para as plantas em suspensão total da irrigação. Isso mostra que, mesmo em condição de estresse hídrico, quando normalmente, os estômatos encontram-se mais fechados, o ácido ascórbico atua na abertura dos estômatos.

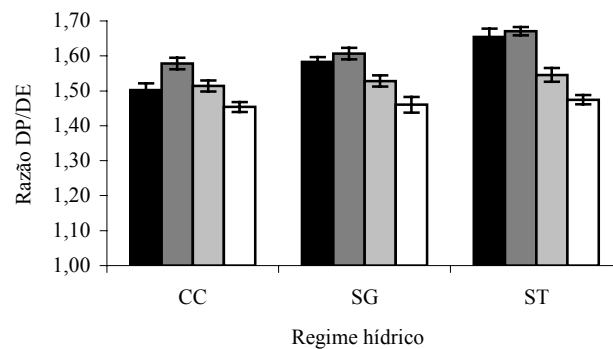


FIGURA 21. Relação diâmetro polar equatorial em mudas de café cv Catuaí IAC 99 submetidas a: CC (capacidade de campo), SG (suspensão gradativa da irrigação) e ST (suspensão total da irrigação) e pulverizadas com diferentes soluções após dose dias de estresse: controle (■); H₂O₂ (■); ácido ascórbico duas horas após o H₂O₂ (■) e ácido ascórbico (□). As barras representam o erro padrão da média de 50 repetições. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Estudos prévios têm sugerido que o estresse oxidativo resultante da exposição ao H₂O₂ tem um efeito marcado na abertura estomática (McAinsh et al., 2000; Pei et al., 2000). Entretanto, o ácido ascórbico tem a habilidade de atuar limpando o H₂O₂, cuja presença induz o fechamento dos estômatos (Schroeder et al., 2001; Chen et al., 2003).

5 CONCLUSÕES

Sob estresse hídrico, as mudas de cafeeiros mostraram uma eficiente atividade do sistema antioxidante de modo a atenuar os seus efeitos.

O peróxido de hidrogênio e o ácido ascórbico exógenos aceleraram o fechamento e abertura estomática, respectivamente, principalmente em plantas sob estresse hídrico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Molecular Biology of the Cells**. Nova Iork: Garland, 1983. p. 67-80.

ALONSO, A.; QUEIROZ, C. S.; MAGALHÃES, A. C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1323, p.75-84, 1997.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology**, v. 90, p. 109-116, 1989.

ARAKAWA, N.; TSUTSUMI, K.; SANCEDA, N.G.; KURATA, T.; INAGAKI, C. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agric. Biol. Chem.**, v. 45, p. 1289-1290, 1981.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. **Photoinhibition**, p. 227-287, 1987.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.

AZIZ, A.; LARHER, F. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassic nappus* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 153, n. 5/6, p. 754-762, Nov. 1998.

BARROS, R. S.; MOTA, J. W.; DaMATTA, F. M.; MAESTRI, M. Decline of vegetative growth in *Coffea arabica* L. in relation to leaf temperature, water potential and stomatal conductance. **Field Crops Res.**, v. 54, p. 65-72, 1997.

- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.
- BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 48-254, 1976.
- BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.
- BROWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.
- BUCKNER, B.; JOHAL, G. S.; JANICK-BUCKNER, D. Cell death in maize. **Physiology Plant**, v. 108, p. 231-239, 2000.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of Al on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glicine max* L.). **Physiologia Plantarum**, v. 834, p. 463-468, 1991.
- CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 260, p. 127-132, 1993.

CARGNELUTTI, D. **Efeito do mercúrio no estresse oxidativo, na atividade da delta-ala-d e no crescimento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.)**. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

CHEN, Z.; GALLIE, D. R. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. **The Plant Cell**, v. 16, p. 1143-1162, 2004.

CHEN, Z.; YOUNG, T. E.; CHANG, S.; GALLIE, D. R. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 3525-3530, 2003.

CRAWFORD, R. M. M. Effects of environmental stress on lipid metabolism in higher plants. **Agrochimica**, Pisa, v. 29, n. 1, p. 51-63, 1985.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants**. Boca Raton, FL: CRC, 1994. p.343-364.

DaMATTA, F. M. **Desempenho fotossintético do cafeeiro em resposta a tensões abióticas**. 1995. 55 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal d Viçosa, Viçosa, MG.

DaMATTA, F. M. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. **Field Crops Research**, v. 86, p. 99-114, 2004.

DaMATTA, F. M.; SILVEIRA, J. S. M.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M. E. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Brasília. **Expanded Abstracts...** Brasília: EMBRAPA Café, 2000. p. 907-910.

EDREVA, A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 106, p. 135-146, 2005.

ELSTNER, E. F. Metabolism of activated oxygen species. In: DAVIES, D. D. **Biochemistry of plants**. Londres: Academic, 1987. v. 11, p. 253-315.

ELSTNER, E. F.; OSSWALD, W. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. In: CRAWFORD, R. M. M.; HENDRY, G. A. F.; GOODMAN,

B. A. (Ed.). **Oxygen and environmental stress in plants**. Edinburgh: Royal Society of Edinburgh, 1994. p. 131-154.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Café**. Disponível em: <http://www21.sede.embrapa.br/linhas_de_acao/alimentos/cafe/getView>. Acesso em: 9 nov 2005.

ERDEI, L.; SZEGELETES, Z. S.; BARABAS, K. N.; PESTENACZ, A.; FULOP, K.; KALMAR, L.; KOVACS, A.; TOTH, B.; DER, A. Environmental stress and the biological clock in plants: Changes of rhythmic behaviour of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, p. 265-271, 1998.

ESKLING, M.; ARVIDSSON, P. O.; AKERLUND, H. E. The xanthophylls cycle, its regulation and components. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 806-816, 1997.

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

FOYER, C. H; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, Oxford, v. 146, p. 359-388, 2000.

FRIDOVICH, I.; HANDLER, P. Detection of free radicals generated during enzymic oxidation by the initiation of sulphite oxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, p. 1836-1840, 1961.

GOODMAN, B. A. The involvement of O₂-derives free radical in plant-pathogen interactions. In: CRAWFORD, R. M. M.; HENDRY, G. A. F.; GOODMAN, B. A. (Ed.). **Oxygen and environmental stress in plants**. Edinburgh: Royal Society of Edinburgh, 1994. p. 155-165.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Sidney, v. 32, p. 481-494, 2005.

GUTIERREZ, M.V.; MEINZER, F.C.; GRANTZ, D.A. Regulation of transpiration in coffee hedgerows: Covariation of environmental variables and apparent responses of stomata to wind and humidity. **Plant Cell and Environment**, v. 17, p. 1305-1313, 1994.

HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chem. Phys. Lipids**, v. 44, p. 327-340, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford University, 1989.

HEGEDÜS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, v. 160, p. 1085-1093, 2001.

HENRIQUES, A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

HOREMANS, N.; FOYER, C. H.; ASARD, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 263-267, 2000.

ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDO, P. R.; ARRESE-IGOR, C.; BECANA, M. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology**, v. 116, p. 173-181, 1998.

JIAO, H.; WANG, Y. S. Correlation of Antioxidant Capacities to Oxygen Radical Scavenging Enzyme Activities in Blackberry. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 5672-5676, 2000.

KNOX, J. P.; DODGE, A. D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, v. 24, p. 889-896, 1985.

KOHLER, B.; BLATT, M. R. Protein phosphorylation activates the guard cell Ca channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. **Plant Journal**, v. 32, p. 185-194, 2002.

LABOURIAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell). Toledo I. Comportamento na estação chuvosa nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 237-257, out./dez. 1961.

LAWLOR, D. H. The effects of water deficit on photosynthesis. In: SMIRNOFF, N. (Ed.). **Environment and plant metabolism-flexibility and acclimation**. Oxford: BIOS Scientific, 1995. p. 129-156.

LEÓN, A. M.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R. M.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 813-820, 2002.

LEVITT, J. Response of plants to environmental stress. In: _____. **Water, radiation, salt and other stress**. New York: Academic, 1980. 606 p.

LIMA, A. L. S.; DaMATTa, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions, **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of alga cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, p. 183-193, 2000.

MATZNER, S.; COMSTOCK, J. The temperature dependence of shoot hydraulic resistance: implications for stomatal behaviour and hydraulic limitation. **Plant Cell and Environment**, v. 24, p. 1299-1307, 2001.

McAINSH, M. R.; CLAYTON, H.; MANSFIELD, T. A.; HETHERINGTON, A. M. Changes in stomatal behavior and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 111, p. 1031-1042, 2000.

McKERSIE, B. D.; LESHEM, Y. Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994.

MIQUEL, J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In: MIQUEL, J.; QUINTANILHA, A. T.; WEBER, H. (Ed.). **Hand book of free radicals and oxidants in biomedicine**. Boca Raton, FL, CRC, 1989. p. 3-11.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591, 2001.

MONTEITH, J. L. A reinterpretation of stomatal response to humidity. **Plant Cell Environmental**, v. 18, p. 357-364, 1995.

MORITA, S.; TASAKA, M.; FUJISAWA, H.; USHIMARU, T.; TSUJI, H. A. cDNA encoding a rice catalase isozyme. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1015-1016, 1994.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C. H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1283-1304, 2002.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, v. 129, p. 460-468, 2002.

PEI, Z. M.; KUCHITSU, K.; WARD, J. M.; SCHWARZ, M.; SCHROEDER, J. I. Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis wild-type* and *abi1* and *abi2* mutants. **Plant Cell**, v. 9, p. 409-423, 1997.

PEI, Z. M.; MURATA, Y.; BENNING, G.; THOMINE, S.; KLUSENER, B.; ALLEN, G. J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J. I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. **Nature**, v. 406, p. 731-734, 2000.

PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R. Al effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative

metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p. 137-143, 1999.

PINHEIRO, H. A.; DaMATTA, F. M.; CHAVES, A. R. M.; LOUREIRO, M. E.; DUCATTI, C. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, v. 96, p. 101-108, 2005.

QUEIROZ, C. G. S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.; MAGALHÃES, A. C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. **Biology Plant**, v. 41, p. 403-413, 1998.

QUEIROZ, C. G. S.; GARCIA, Q. S.; LEMOS, J. P. F. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do sertão sob stresse hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 4, n. 1, p. 59-63, 2002.

RANIERI, A.; LENCIONI, L.; SCHENONE, G.; SOLDATINI, G. F. Glutathione-ascorbic acid cycle in pumpkin plants grown under polluted air in open-top chambers. **Journal of Plant Physiology**, v. 142, p. 286-290, 1993.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Relações hídricas no cafeeiro. **ITEM**, Brasília, v. 48, p. 34-41, set. 2000.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. **Techniques in free radical research**. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. v. 22, 291 p.

ROCHA, H. S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã"**: alterações morfoanatômicas. 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SCANDALIOS, J. G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, v. 28, p. 1-41, 1990.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCHMIDT, A.; KUNERT, K. J. Lipid peroxidation in higher plants. The role of glutathione reductase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 3, p. 700-702, Nov. 1986.

SCHROEDER, J. I.; ALLEN, G. J.; HUGOUVIEUX, V.; KWAK, J. M.; WANER, D. Guard cell signal transduction. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 627-658, 2001.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidase: an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 303-312, 1993.

SINHA, S.; GUPTA, M.; CHANDRA, P. Biocumulation and biochemical effects on mercury in the plant *Bacopa monnieri* (L.). **Environmental Toxicol. Water Qual. Nat. Inter. Journal**, v. 11, p. 105-112, 1996.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation the plants of *Pistia stratiotes* L.: **Role of antioxidants and antioxidant enzymes. Chemosphere**, v. 58, p. 595-604, 2005.

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

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion on Plant Biology**, v. 3, p. 229-235, 2000.

VANTOAI, T. T. Extraction and determination of seed adenine nucleotides by different methods for anaerobic stress evaluation. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 17, n. 3, p. 439-451, 1989.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v. 164, p. 645-655, 2003.

VIANA, M. C. M. **Déficit hídrico em genótipos de milho com tolerância diferencial à seca**. 2002. 75 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Moleculr Breeding**, v. 1, n. 3, p. 207-228, 1995.

YAN, B.; DAI, Q.; LUI, X.; HUANG, S.; WNAG, Z. Flooding-induce membrana damage, lipid oxidation and oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, v. 79, p. 261-268, 1996.

ZENK, M.H. Heavy metal detoxication in higher plants, a review. **Gene**, v. 179, p. 21-30, 1996.

ZHANG, J.; KIRKAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, v. 149, p. 498-493, 1996.

ZHANG, X.; ZHANG, L.; DONG, F.; GAO, J.; GALBRAITH, D. W.; SONG, C. P. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiol**, v. 126, p. 1438-1448, 2001.