

ÁCIDO ASCÓRBICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INFLUENCIAM A ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E O MOVIMENTO ESTOMÁTICO EM CAFEIEIRO

Sidnei DEUNER¹; José D. ALVES¹; Daniela D. FRIES¹; Ilisandra ZANANDREA¹; Patrícia F. P. GOULART²; Paola C. HENRIQUE²; André A. LIMA¹; Neidiquele M. SILVEIRA¹

¹ Setor de Fisiologia Vegetal/DBI/UFLA, Lavras, MG; ² Unilavras, Rua Padre José Poggel, 506, Centenário, 37200-000 Lavras (MG)

Resumo:

De maneira geral, um estresse ocasiona a formação de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e o oxigênio singleto, que são tóxicos às células causando o denominado estresse oxidativo. A destruição eficiente das espécies reativas de oxigênio requer a ação de diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio na atividade das enzimas do sistema antioxidante e suas relações com o movimento estomático. Para tanto, mudas de Catuaí IAC 99 foram cultivadas em sala de crescimento, sendo pulverizadas com ácido ascórbico (20 mM) e peróxido de hidrogênio (1 mM). Em intervalos de uma hora, por um período de 4 horas, foram avaliadas a resistência estomática e taxa de transpiração, bem como a coleta de folhas para posterior análise das enzimas APX, CAT, GR e SOD. A aplicação de peróxido de hidrogênio aumentou a resistência estomática e conseqüentemente diminuiu a taxa transpiratória em relação as plantas controle. Também promoveu uma maior atividade das enzimas em estudo. Já a aplicação do ácido ascórbico promoveu uma menor resistência estomática e uma maior transpiração e diminuiu a atividade de todas as enzimas analisadas.

Palavras-chave: Ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio, estômatos.

ASCORBIC ACID AND HYDROGEN PEROXIDE INFLUENCE ENZYMES ACTIVITIES FROM ANTIOXIDANT SYSTEM AND STOMATIC APERTURE IN COFFEE.

Abstract:

Usually the stress causes a formation of reactive species of oxygen, like superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and the singlet oxygen, that are toxic to cells causing the oxidative stress. The efficient destruction of reactivities oxygen species need the action of various antioxidant enzymes acting in synchrony. In this way, this research aimed to evaluate the exogenous application of ascorbic acid and hydrogen peroxide on enzymes activities of antioxidant system and their relation with stomatic aperture. For this purpose, seedlings of Catuai IAC 99 were cultivated in growth chamber, being sprayed with ascorbic acid (20 mM) and hydrogen peroxide (1mM). Each hour during a period of 4 hours, there were evaluated the stomatic resistance and transpiration rate, and also the sampling for the enzymes APX, CAT, GR and SOD analysis later. The application of hydrogen peroxide increased the stomatic resistance and consequently decreased the transpiration rate in relation to control plants. The enzyme activities also increased with this treatment. The spraying with ascorbic acid promoted a lower stomatic resistance and a higher transpiration and decreased the activity of all enzymes analyzed.

Key words: ascorbic acid, hydrogen peroxide, stomata.

Introdução

O café é considerado um dos mais importantes produtos agrícolas no mercado internacional e muitos países estão envolvidos na sua produção, consumo e comercialização. O Brasil é o maior produtor de café, responsável por, aproximadamente, 30% da produção mundial, o que gira em torno de 115 milhões de sacas comercializadas anualmente nas últimas safras. Atualmente, a cafeicultura gera mais de cinco milhões de empregos e uma receita anual da ordem de 4 bilhões de dólares, dos quais a metade é oriunda de exportações. Internamente, contribui com a fixação do homem no campo, a melhoria da renda de pequenos produtores, a distribuição de riquezas e a melhor qualidade de vida (Embrapa Café, 2005). Embora o cafeeiro possa vegetar em uma extensa área geográfica, em sua maior parte entre os trópicos, a sua produção econômica se restringe a uma área bem menor, na qual os fatores ecológicos são mais favoráveis (Alfonsi, 2000). Pode ser conduzido em ambientes de baixa luminosidade, pois apresenta uma baixa irradiância de saturação, variando de 300 a 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fahl et al., 1994).

O cafeeiro, embora possua característica umbrófila, típica de ambiente de sub-bosque, apresenta elevada produção quando cultivado a pleno sol. Em razão dessa característica, é comum a fotoinibição provocada pela saturação do aparelho fotossintético sob elevada irradiância (DaMatta & Maestri, 1997).

Plantas em ambiente com alta intensidade luminosa normalmente sofrem a fotoxidação, processo que causa danos celulares e pode provocar morte de células, comprometendo a produção final do cafezal. Quando a absorção de energia luminosa captada pela planta ultrapassa a capacidade de utilização durante a fotossíntese, há a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e oxigênio singleto (O_2^1), que são tóxicos às células e destroem a clorofila, as membranas, DNA e outras organelas (Drinnan & Menzel, 1995). Sob condições normais de crescimento, o acúmulo de EROs nas células é baixo. Entretanto, fatores ambientais adversos que perturbam a homeostase celular induzem a produção de EROs, levando ao estresse oxidativo (Fidalgo et al., 2004; Anza et al., 2005).

A destruição eficiente das EROs requer a ação de diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia. Os principais mecanismos de eliminação das EROs das plantas incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR) e guaiacol peroxidase (GOPX) (Gratão et al., 2005). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs, sendo responsável pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ para formar H_2O_2 e O_2 (Gratão et al., 2005). A CAT, a APX e a GOPX são enzimas que catalisam a conversão do H_2O_2 à água e O_2 (Igamberdiev et al., 2002). A GR catalisa a redução dependente de NADPH da glutatona oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (Mullineaux et al., 1997). A APX e a GR, assim como a GSH, são importantes componentes do ciclo ascorbato/glutatona, responsável pela remoção do H_2O_2 em diferentes compartimentos celulares (Foyer et al., 2005).

O sistema antioxidante não enzimático da célula vegetal é essencialmente composto de concentrações de ascorbato, glutatona e α -tocoferol relativamente altas, que são eficientes consumidores de oxiradicais (Bowler et al., 1992). O ascorbato é um antioxidante principal que reage com as EROs (Smirnoff et al., 2001), sendo que todas as plantas podem sintetizá-lo, e este pode ser acumulado em tecidos fotossintéticos e não fotossintéticos. O ascorbato é um antioxidante primário principal, reagindo diretamente com $\bullet OH$, $O_2^{\bullet-}$ e O_2^1 . 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 ascorbato desempenha um papel na preservação da atividade de enzimas que contém íons metálicos prostéticos de transição (Noctor & Foyer, 1998). No sistema antioxidante, o ascorbato é utilizado pela APX para converter H_2O_2 a água. Entretanto, dado o papel do ascorbato como um "limpador" do H_2O_2 , mudanças no seu estado redox podem alterar o movimento estomático, particularmente sob as circunstâncias em que os sinalizadores, ABA ou H_2O_2 ativam o fechamento dos estômatos. Estudos mais recentes mostraram que o fechamento estomático, induzido pelo H_2O_2 foi revertido pela aplicação de ácido ascórbico, um dos mais abundantes antioxidantes produzidos pelas plantas (Zhang et al., 2001). Este trabalho objetivou avaliar efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio sobre o movimento estomático a atividade de enzimas do sistema antioxidante em cafeeiro.

Material e Métodos

Mudas de café (*Coffea arabica*) cultivar Catuaí IAC 99 com oito meses de idade foram mantidas em sala de crescimento com irradiância de aproximadamente $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes. Após uma semana de adaptação, foram realizadas aplicações exógenas de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio nas concentrações de 20 mM e 1 mM, respectivamente. A cada solução foi adicionado 0,1% de Triton-X para auxiliar na absorção pelas folhas pulverizadas. A testemunha permaneceu sem aplicação. De hora em hora, por um período de 4 horas, foram realizadas leituras de transpiração e resistência estomática através de porômetro de difusão e feita a coleta de folhas para posterior avaliação da atividade das enzimas APX, CAT, GR e SOD.

Para a atividade enzimática foram utilizados 200 mg de tecido foliar. O material foi macerado em N_2 líquido acrescido de 50% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona), homogeneizado em 1,5 mL do seguinte tampão de extração: Fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 10 min. a 4°C , o sobrenadante foi coletado e dessalizado em Coluna Sephadex G-25 (PD-10). A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi realizada 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 H_2O_2 0,1 mM. A catalase foi estimada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 2 min em um meio de reação contendo fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, e H_2O_2 12,5 mM (Havir & McHale, 1987). Para a atividade da redutase da glutatona (GR), baseou-se no método de Cakmak et al. (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH, com decréscimo na absorbância a 340 nm por 2 min, sendo utilizado o meio de reação composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, glutatona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,075 mM, que foi incubado a 28°C . A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolis & Reis, 1977) em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por 7 min. em uma caixa 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. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

Resultados e Discussão

A aplicação exógena de H_2O_2 ocasionou um aumento da resistência estomática após uma hora da sua aplicação, mantendo-a elevada até o final do experimento (Figura 1A). A taxa transpiratória acompanhou o movimento estomático, diminuindo com o aumento da resistência (Figura 1B). A indução do fechamento dos estômatos *in vivo* tem sido atribuída ao acúmulo de H_2O_2 nas células-guardas, 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 da células-guardas, 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.

Já a pulverização das folhas com ácido ascórbico diminuiu a resistência estomática, ou seja, promoveu uma maior abertura dos estômatos, após a primeira hora de aplicação em comparação às plantas controle. Em seguida aumentou, permanecendo ao nível do controle até as três horas, quando então voltou a aumentar até as quatro horas. De maneira semelhante, a taxa transpiratória acompanhou o movimento estomático de maneira inversamente proporcional. Zhang et al. (2001) verificaram que a aplicação de ácido ascórbico reverteu o efeito do fechamento estomático induzido pelo H_2O_2 .

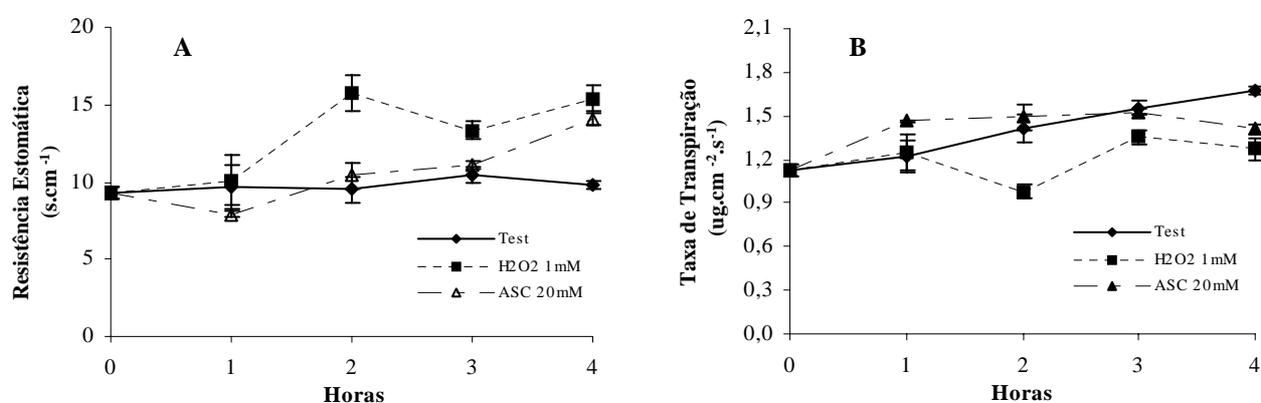


Figura 1 – Efeito da pulverização de ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na resistência estomática e taxa de transpiração em mudas de café.

De maneira geral, a aplicação de H_2O_2 nas folhas das plantas aumentou significativamente a atividade das enzimas estudadas (Figura 2). Para a SOD, CAT e GR esse aumento iniciou a partir de uma hora após a aplicação do H_2O_2 , sendo que com duas horas a diferença em relação ao controle já estava significativa. Já para a APX, esse aumento foi verificado logo após a exposição ao H_2O_2 . Esta resposta imediata provavelmente se deve ao fato desta enzima ser a principal responsável pela eliminação do H_2O_2 nas plantas pela sua redução a água.

Embora a SOD faça parte de um primeiro ajuste da tolerância de plantas ao estresse oxidativo, o H_2O_2 , produto da ação dessa enzima, é também um radical livre e seu acúmulo é tão prejudicial quanto o do superóxido. A eliminação do H_2O_2 pode ser realizada tanto por catalases quanto por peroxidases (Asada, 1999; Willekens et al., 1995). Uma vez que a ação da SOD resulta na formação de H_2O_2 , ela está também intimamente ligada com a atividade da catalase e peroxidases, mantendo, portanto, a interação com essas e outras enzimas antioxidantes, para garantir um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos (Junior, 2006).

Já a aplicação de ácido ascórbico, promoveu uma redução na atividade das enzimas, sendo que essa redução foi mais expressiva na atividade da CAT quando comparado às plantas controle. A SOD apresentou uma diminuição em sua atividade após uma hora da aplicação do ácido ascórbico. Esse decréscimo nas atividades da CAT, APX e GR ocorreu desde o início do experimento. No sistema antioxidante, o ácido ascórbico é utilizado pela APX para converter H_2O_2 a água, e o ascorbato pode diretamente limpar os radicais superóxido, hidroxila e o oxigênio singlete. Esses fatores podem explicar essa menor atividade das enzimas quando da aplicação do ácido ascórbico.

Segundo Chen & Gallie (2004) mudanças diurnas no estado redox do ascorbato e na concentração do H_2O_2 são inversamente correlacionadas sugerindo a possibilidade de um contrapeso, ou seja, a alteração na concentração de um afetaria a concentração do outro.

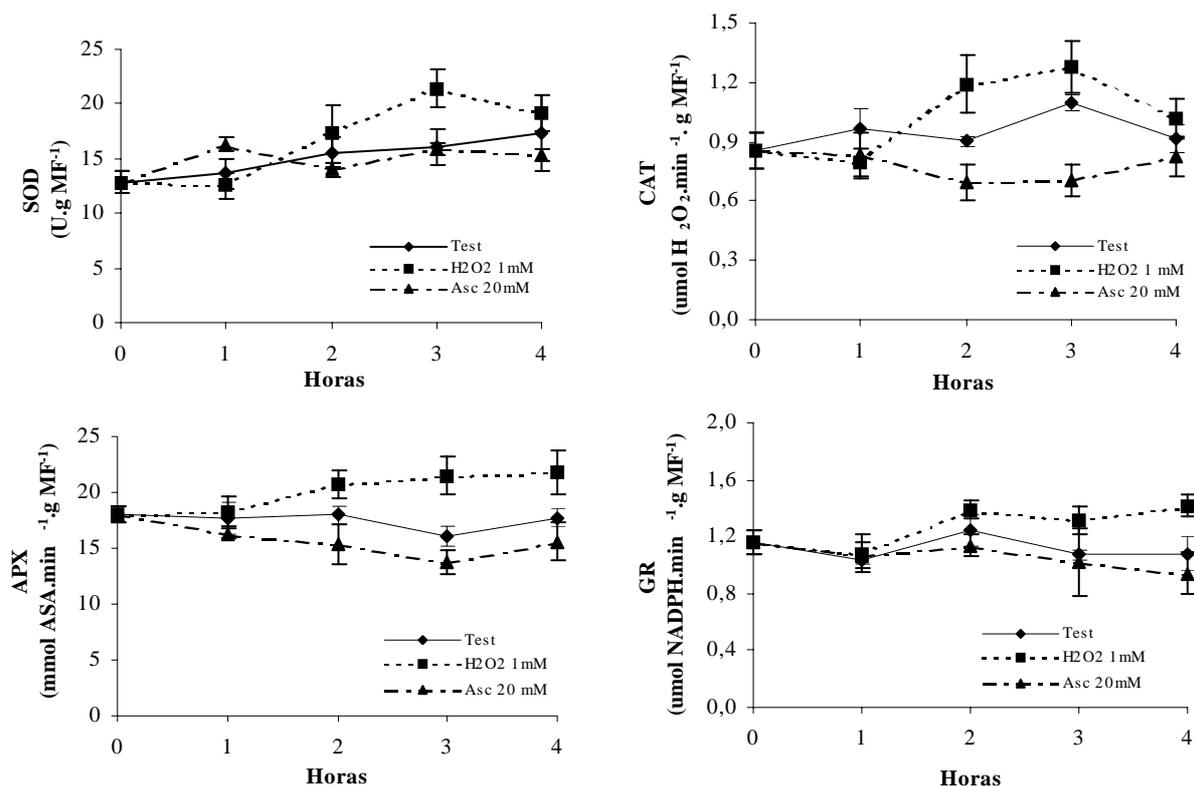


Figura 2 – Atividade específica das enzimas APX, CAT, GR e SOD em plantas jovens de café cv Catuaí, pulverizadas com ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

O ascorbato é o mais abundante antioxidante 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 no estado redox do ascorbato pela repressão da expressão da redutase do dehidroascorbato aumenta o fechamento estomático sob condições normais de crescimento e seguido de um estresse hídrico.

Conclusões

O peróxido de hidrogênio aumentou a resistência estomática, diminuindo a taxa transpiratória e aumentou a atividade das enzimas do sistema antioxidante.

O ácido ascórbico promoveu abertura estomática e maior transpiração, além de diminuir a atividade de todas as enzimas.

Agradecimentos

Financiado pela FAPEMIG.

Referências Bibliográficas

EMBRAPA. Café. Disponível em: <http://www21.sede.embrapa.br/linhas_de_ação/alimentos/café/getView>. Acesso em: 9 nov. 2005.

ASADA, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.

BOWLER, C.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.

- CAKMAK, I.; DRAGANA, S. and HORST, M. (1993). Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **J. Exp. Bot.** **44**, 127–132.
- CHEN, Z.; GALLIE, D.R. (2004). The Ascorbic Acid Redox State Controls Guard Cell Signaling and Stomatal Movement. **The Plant Cell**, v. 16, p. 1143–1162.
- DRINNAN, J.E.; MENZEL, C.M. Temperature affects vegetative growth and flowering of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Horticultural Science*, v.70, p.25-34, 1995.
- FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1866-1875, 2005.
- GAINNAPOLITIS, C.N. AND PIES, S.K. (1977). Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** **59**, 309–314.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, v.84, p.450-455, 1987.
- IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 651-674, 2002.
- JUNIOR, R. A. G. Resposta antioxidante de células *in vitro* de café (*coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni). 2006. 135 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – ESALQ/USP, Piracicaba, SP.
- KOHLER, B., AND BLATT, M.R. (2002). Protein phosphorylation activates the guard cell Ca²⁺ channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. **Plant J.** **32**, 185–194.
- MULLINEAUX, P. M.; CREISSEN, G. P. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: SCANDALIOS, J. C. (Ed.). **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 667-713, 1997.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, p. 867-880, 1981.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49 p. 249-279, 1998.
- SCHROEDER, J.I.; KWAK, J.M.; AND ALLEN, G.J. (2001). Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. **Nature** **410**, 327–330.
- SMIRNOFF, N. (2000). Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multifaceted molecule. **Curr. Opin. Plant Biol.** **3**, 229–235.
- SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P. L.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52 p. 437-467, 2001.
- WILLEKENS, H.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; LANGEBAEDEL, C.; and SANDERMANN, H. (1995) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. **Plant Physiol.** **106**:1007-1014
- ZHANG, X.; ZHANG, L.; DONG, F.; GAO, J.; GALBRAITH, D.W., AND SONG, C.P. (2001). Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiol.** **126**, 1438– 1448.