

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Resposta antioxidativa de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostos ao metal pesado
cádmio**

Milca Bartz Rolão

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

Milca Bartz Rolão
Bacharel em Biotecnologia

Resposta antioxidativa de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostos ao metal pesado cádmio

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Rolão, Milca Bartz

Resposta antioxidativa de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostos ao metal pesado cádmio /
Milca Bartz Rolão. - - Piracicaba, 2010.
67 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Cádmio 2. Café 3. Estresse oxidativo 4. Metais pesados 5. Poluição ambiental I. Título

CDD 633.73
R744r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, José e Waurie,
Aos meus irmãos, Naara e Tiago,
A minha tia Marilza,
que jamais mediram esforços
para que eu chegasse até aqui*

DEDICO

*Ao meu querido Thiago,
por todo incentivo,
amor, paciência, ajuda e
companheirismo,
fundamentais para essa conquista*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me permitir acordar todos os dias e me dar forças para realizar todas as minhas atividades;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela grande oportunidade, confiança e apoio;

Ao meu querido Thiago, por estar sempre ao meu lado incondicionalmente, acredita em mim e me apoiar em tudo que faço. Eu lhe agradeço por tudo;

Em especial à Gicka, por ser essa excelente amiga e sempre me dar força e apoio para continuar, estando ao meu lado nos momentos bons e ruins;

À Salete, pelas contribuições no trabalho, e pelos momentos em que me deu atenção quando precisei;

Aos amigos do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas: Xiua, Carol, Pri, Daí, Flávia, Paula, Mônica, Rogério e Lucas pela convivência e apoio, e ao Fernando pelas discussões sobre o trabalho e ajuda na análise estatística;

Às amigas e colegas: Aline, Nathália, Saly, Manu e Bere pelos momentos de confraternização;

Ao Tiago Tezotto pela grande ajuda no trabalho, principalmente na quantificação de Cd;

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela oportunidade, apoio e contribuições no desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores e funcionários do Programa;

A ESALQ e ao Departamento de Genética, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela estrutura oferecida;

À CAPES e FAPESP pela concessão das bolsas de estudo e no caso da FAPESP também pelo auxílio à pesquisa;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Metais Pesados	15
2.2 Sistema Antioxidante	17
2.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)	18
2.2.2 Catalase (CAT)	19
2.2.3 Glutathiona Redutase (GR)	19
2.3 Metais e cafeeiros	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Material vegetal	23
3.2 Modelo experimental	23
3.3 Coletas	25
3.3.1 Análise de solo	25
3.3.2 Análise de metal em folhas e ramos	25
3.3.3 Atividades enzimáticas e outras análises bioquímicas	26
3.3.4 Análises moleculares	26
3.4 Extração e determinação da concentração de proteínas totais	27
3.5 Gel SDS-PAGE	29
3.6 Peroxidação Lipídica	30
3.7 Atividade da Superóxido Dismutase - SOD	31
3.7.1 Atividade em PAGE	31
3.7.2 Determinação das isoformas de SOD	31
3.8 Atividade da Catalase - CAT	32
3.8.1 Atividade em espectrofotômetro	32
3.8.2 Atividade em PAGE	33
3.9 Atividade da Glutathiona Redutase – GR	33
3.9.1 Atividade em espectrofotômetro	34
3.9.2 Atividade em PAGE	34

3.10 Análise Estatística	34
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Análise de solo	37
4.2 Quantificação de metal em folhas e ramos	37
4.3 Aspecto visual das plantas.....	38
4.4 Peroxidação Lipídica	39
4.4.1 Quantificação de malondialdeído (MDA) em espectrofotômetro.....	39
4.5 Proteínas	40
4.5.1 Quantificação de proteínas em espectrofotômetro	40
4.5.2 Perfil protéico em SDS-PAGE	40
4.6 Análise das enzimas antioxidantes.....	42
4.6.1 Atividade da SOD em PAGE	42
4.6.2 Atividade da CAT em espectrofotômetro e em PAGE	44
4.6.3 Atividade da GR em espectrofotômetro e em PAGE.....	46
4.7 Análises moleculares	48
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Resposta antioxidativa de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostos ao metal pesado cádmio

A contaminação ambiental por metais pesados é um sério problema enfrentado atualmente pela humanidade, e tem causado grande preocupação, devido ao seu acúmulo em plantas cultivadas, podendo afetar a cadeia alimentar de homens e animais. O metal pesado Cádmio (Cd) é um dos contaminantes mais difundidos no ambiente, devido às diversas atividades humanas, e pode causar sérios danos ao metabolismo celular com a inibição de processos fisiológicos importantes. Este trabalho teve como objetivo estudar a resposta do sistema antioxidante de cafeeiros expostos às concentrações de 15, 45 e 90 mg de Cd/planta. De acordo com os resultados as plantas que receberam 90mg/planta de metal foram mais afetadas, apresentando altas taxas de peroxidação lipídica. As atividades das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione redutase (GR), foram reduzidas na presença do metal em todas as concentrações de Cd utilizadas. Os resultados sugerem que o sistema antioxidante dessas plantas responde conforme o tempo de exposição ao metal e de acordo com a concentração.

Palavras-chave: *Coffea arabica*; Estresse oxidativo; Cádmio; Poluição ambiental

ABSTRACT

Antioxidant response of coffee (*Coffea arabica*) exposed to the heavy metal cadmium

Environmental heavy metal contamination is a serious problem currently faced by humanity and has caused great concern due to its accumulation in cultivated plants, being able to affect human and animal's food chain. The heavy metal Cadmium (Cd) is one of the most widespread contaminants in the environment due to a variety of human activities and may cause severe damage to the cellular metabolism through inhibition of important physiological processes. This project aimed to study the antioxidative system response of coffee trees exposed to concentrations of 15, 45 and 90 mg of Cd per plant. According with results obtained, plants which received the higher concentration of Cd were more affected, showing great rates of lipid peroxidation. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), were reduced in the presence of the metal for each Cd concentration used. The results suggest that these enzymes respond according to time length of exposure and to the concentration of metal used.

Keywords: *Coffea arabica*; Oxidative stress; Cadmium; Environmental pollution

1 INTRODUÇÃO

O café ainda é, ao lado da soja e da cana-de-açúcar, uma das mais importantes atividades agrícolas do Brasil, gerando não só divisas ao país, mas também um grande número de empregos, quando é considerada toda a cadeia produtiva, do campo ao cafezinho no balcão.

Com o aumento do crescimento dos centros urbanos seria natural esperar que as contaminações por metais pesados começassem a se tornar uma preocupação mundial. Além disso, a falta de legislação e de consciência social para o uso e descarte de alguns materiais com alto conteúdo de metais, como baterias comuns e fluídos de baterias de automóveis. A ciência vem fazendo sua parte para controlar a quantidade de rejeitos da atividade antropogênica e uma das áreas de pesquisa que vem crescendo acentuadamente em todo o mundo é o uso de resíduos de esgoto, fonte rica de nutrientes e vários metais pesados. Paralelamente, o mundo começou a prestar mais atenção na quantidade de metais tóxicos presentes em vários produtos alimentícios. Além dos metais pesados estarem presentes nos alimentos, as plantas que os produzem passam a sofrer os efeitos negativos sobre o crescimento e a produção.

Aliado a esta temática de contaminação ambiental, os resíduos de esgoto começaram a ser empregados em cafezais, assim como ocorre em outras culturas, sem que se saiba exatamente como as plantas respondem e, principalmente, onde se acumularão, bem como que efeito terão na qualidade final do produto (RIBEIRO et al., 2005).

Como consequência, os estudos sobre biorremediação, juntamente com estudos dos mecanismos antioxidativos em plantas, tornou-se assunto prioritário de vários centros de pesquisa e universidades. Estudos anteriores demonstraram que células de café em suspensão expostas ao metal pesado Cd responderam prontamente com o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidativo (GOMES-JUNIOR et al., 2006b).

Em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa foram avaliados diversos efeitos desse metal no metabolismo antioxidativo de células de café em suspensão. O projeto proposto visou continuar estes estudos, entretanto, em plantas produzindo em condições de campo, nas quais se verificou a resposta antioxidativa pela análise da atividade das enzimas antioxidativas envolvidas no sistema de defesa das plantas, além de danos celulares através da peroxidação de lipídios.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metais Pesados

A contaminação de solos agrícolas por metais pesados é um problema mundial. Particularmente, a deposição de emissões industriais de tráfego, o uso excessivo de fertilizantes de baixa qualidade e a aplicação de resíduos biológicos como fertilizantes têm aumentado substancialmente as concentrações de metais no solo em grandes áreas agrícolas. O uso de solos contaminados para a produção de alimentos possui o risco de os contaminantes serem transferidos para o alimento e criar riscos à saúde humana e animal. Por outro lado, deixando-se de cultivar em terras de pouco a medianamente contaminadas pode se estar desperdiçando um recurso natural precioso, dada a crescente escassez de solos agrícolas férteis (FÄSSLER et al., 2010).

O termo “metal pesado” é usado para designar um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semimetais e não metais (MALAVOLTA, 1994), geralmente associados com poluição ambiental e toxicidade (GRATÃO et al., 2005). Dentre estes elementos estão nutrientes essenciais às plantas, em baixas concentrações, como o Cu, Fe, Mn, Ni, Mo, Zn, e elementos não essenciais ou que não apresentam função conhecida, caso do Al, Cd, Cr, Se, Hg e Pb (MELO et al., 1997).

Os metais pesados liberados no ambiente terrestre tendem a se concentrar, especialmente, no solo e sedimentos, que passam a se tornar um grande reservatório disponível para as raízes das plantas, as quais são vulneráveis a variações na concentração destes elementos. A disponibilidade destes para as plantas é afetada por uma série de fatores, como a textura do solo, tipo de mineral de argila, pH do solo, pH da água, potencial redox e outros parâmetros fisiológicos (PRASAD, 1995; MELO et al., 1997).

De todos os metais pesados poluentes, o Cd é um dos mais tóxicos (CHEN; KAO, 1995; BENAVIDES et al., 2005) para os seres humanos, animais e plantas, podendo se acumular no corpo humano com uma meia vida excedendo a 10 anos (SALT et al., 1995), e o que tem apresentado as mais altas taxas de emissão nas últimas décadas (NASCIMENTO; PEREIRA, 1997; NAWROT et al., 2008). A maioria dos metais pesados é persistente no solo devido a sua natureza imóvel, estando intimamente associados à terra e colóides orgânicos. Dentre os metais, o

cádmio é conhecido como sendo o de maior mobilidade e solubilidade em relação a muitos outros metais nos solos (KASHEM et al., 2010).

Embora as plantas não necessitem de Cd para crescimento e reprodução, o seu índice de bioacumulação nas plantas é alto e pode exceder o de muitos elementos essenciais. Além disso, mesmo quando em concentrações não fitotóxicas na planta, pode gerar riscos à saúde animal e humana. Portanto, este metal é um dos metais mais importantes para se considerar em termos de contaminação da cadeia alimentar (LIU et al., 2007).

Nas plantas, os sintomas gerais dos processos fisiológicos e metabólicos influenciados pelas concentrações tóxicas de Cd são: inibição do crescimento radicular e da parte aérea (BOUSSAMA et al., 1999), senescência acelerada nas folhas, redução do vigor e interferência no processo de fotossíntese (PRASAD, 1995), devido a alterações nas funções dos estômatos, no transporte de elétrons, no ciclo de Calvin, desordens na estrutura dos *grana* e na síntese de clorofila (BARCELÓ et al., 1988). O Cd pode ainda provocar danos à transpiração, translocação pelo floema, respiração, relações hídricas, reprodução, mudanças em certas organelas, rompimento estrutural e funcional das membranas celulares (PRASAD, 1995) e danos às raízes. O aparecimento de coloração marrom-avermelhada nas margens das folhas e clorose (SCHICKLER; CASPI, 1999), também têm sido apontados como os sintomas mais característicos de plantas intoxicadas por este metal (DAS et al., 1997), devido ao fato de que o Cd facilmente interage e compete com o Fe (SALT et al., 1995), Ni (BACCOUCH et al., 1998) e Cu (MOCQUOT et al., 1996) por sítios de absorção na membrana plasmática (NASCIMENTO; PEREIRA, 1997), suprimindo a absorção desses elementos e induzindo a uma deficiência de Fe neste órgão. Efeitos genéticos e citotóxicos também foram notados em plantas expostas ao metal, onde o Cd inibiu a divisão celular, promoveu alterações nos cromossomos (aberrações cromossômicas) e induziu picnose nas células das raízes (DAS et al., 1997). Para maiores informações e detalhes sobre os efeitos do Cd no metabolismo de plantas ver as revisões publicadas por Benavides et al. (2005) e Gratão et al. (2005).

2.2 Sistema Antioxidante

A presença do oxigênio (O_2) no ambiente celular constitui-se numa ameaça oxidativa constante às suas próprias estruturas e processos devido ao seu potencial de agir como redutor parcial e, assim, formar as espécies ativas de oxigênio (EAOs) (MALLICK; MOHN, 2000).

Os metais pesados, além de afetarem o crescimento e produção das plantas, podem gerar um estresse oxidativo secundário, ou seja, desequilibrar a razão entre EAOs e a defesa antioxidante, levando ao dano oxidativo de macromoléculas e, eventualmente, de estruturas celulares. Pela sua ação tóxica e mutagênica nas células as EAOs são consideradas moléculas perigosas. As células vegetais, em diferentes níveis, podem tolerar EAOs, tais como radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^{\bullet}) e oxigênio "singlet" (1O_2), através do aumento de mecanismos protetores endógenos envolvendo moléculas e enzimas antioxidantes (ANGELOVA et al., 2000; TARCHOUNE et al., 2010).

A geração de EAOs faz parte do metabolismo aeróbio normal, como nas reações fotoquímicas da fotossíntese e na cadeia respiratória. Pode ser estimulada sob condições abióticas como frio, seca, sais, estresses provocados por poluentes do ar (ozônio e SO_2), extremos de temperatura e luminosidade, herbicidas (Paraquat, por exemplo) e metais pesados, e também como resposta a estresses bióticos tais como o ataque de patógenos (BOWLER et al., 1994; MALLICK; MOHN, 2000; PANDHAIR; SEKHON, 2006).

Para reduzir a concentração de metais pesados livres no citosol das células, as plantas desenvolveram alguns mecanismos, os quais incluem: a compartimentalização dos metais em estruturas subcelulares, exclusão e/ou diminuição do transporte através da membrana e a formação de peptídeos ricos em cisteínas, conhecidos como fitoquelatinas e metalotioneínas, que podem complexar os metais (LOZANO-RODRIGUEZ et al., 1997). Além das fitoquelatinas e metalotioneínas, outro mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas para tolerância à exposição aos metais pesados é a produção de um sistema oxidante de defesa, que inclui componentes de baixa massa molecular tais como glutathione e um sistema de enzimas antioxidantes capazes de remover, neutralizar ou limpar radicais livres, e que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione redutase (GR) (SCANDALIOS, 1993; 2005).

Assim, o estudo da atividade enzimática serve como um critério de avaliação da fitotoxicidade de metais pesados em plantas (MENCH et al., 1994). Uma vez sabendo-se a via preferencial de desintoxicação destes metais em plantas pode-se traçar estratégias de estudo e melhoramento genético, como por exemplo, a manipulação de enzimas que possam condicionar tanto sensibilidade como tolerância a metais em diferentes cultivares. Em todos esses casos, o parâmetro bioquímico a ser analisado poderia ser relativo aos níveis de atividade de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD e GR, e enzimas do metabolismo do nitrogênio, como glutamina sintase e glutamato sintetase (GARG et al., 2009).

2.2.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD (1.15.1.1) foi isolada e caracterizada a partir de uma ampla variedade de organismos. Está presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, e caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), consumindo-os, portanto, e assim, livrando as células do risco de oxidação por esses radicais. A SOD é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs nas células (SCANDALIOS, 2005; FOYER; NOCTOR, 2005):

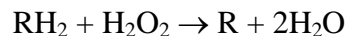


Classificam-se em classes: uma com Cu(II) mais Zn(II) no sítio ativo (Cu/ZnSOD), outra com Mn(III) (MnSOD), uma terceira com Fe(III) (FeSOD), e uma quarta com Ni(II/III) (NiSOD). As Cu/ZnSODs são geralmente encontradas no citosol de células eucarióticas, em cloroplastos, e em alguns procariotos; as MnSODs são encontradas em procariotos e mitocôndrias; as FeSODs são encontradas geralmente em procariotos, algas e em alguns cloroplastos de plantas superiores; e as NiSODs foram encontradas em *Streptomyces* (SCANDALIOS, 2005).

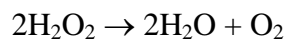
O balanço entre as atividades da SOD e APX ou CAT nas células é crucial para a determinação dos níveis de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Este balanço, juntamente com o seqüestro de íons metálicos, é importante para prevenir a formação do radical hidroxila, altamente tóxico, através das reações de Haber-Weiss (metal-dependente) ou de Fenton (MITTLER, 2002).

2.2.2 Catalase (CAT)

A catalase (EC 1.11.1.6.) é uma oxidoreductase, tetramérica constituída por 4 grupos heme que está presente em todas as células de plantas, animais e microorganismos aeróbios (SCANDALIOS, 1990; 2005) localizando-se no citoplasma, nas mitocôndrias, peroxissomos de folhas e glioxissomos (FRUGOLI et al., 1996; BAŤKOVÁ, et al., 2008). A CAT é um dos catalisadores mais ativos produzidos na natureza e é capaz de decompor H_2O_2 a uma taxa extremamente rápida, correspondendo a uma atividade catalítica de cerca de 10^7min^{-1} . Dependendo da concentração de H_2O_2 a enzima exerce uma função dupla (peroxidativas e catalíticas). Em baixas concentrações ($<1 \mu\text{M}$) de H_2O_2 , a CAT age “peroxidativamente”, ou seja, uma variedade de doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol, ácido ascórbico) pode ser oxidada da seguinte forma:



Já em altas concentrações de substrato a CAT decompõe o peróxido de hidrogênio tóxico a uma taxa extremamente rápida utilizando a reação “catalítica” na qual o H_2O_2 age tanto como acceptor como doador de moléculas de hidrogênio (SCANDALIOS et al., 2005):



Segundo Mittler (2002) a diferença de afinidade entre a Ascorbato Peroxidase (APX) (faixa de μM) e a CAT (faixa de mM) pelo H_2O_2 sugere que elas pertençam a duas classes distintas de enzimas responsivas ao H_2O_2 : APX pode ser responsável pela fina modulação das EAOs para sinalização, enquanto CAT pode ser responsável pela remoção do excesso de EAOs durante o estresse.

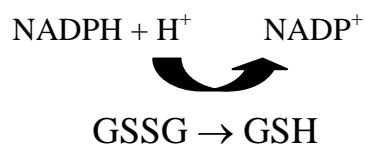
A CAT é única dentre as enzimas que degradam H_2O_2 , pois não consome equivalentes redutores celulares, além de possuir um mecanismo muito mais eficiente para remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse. Apresenta uma alta constante de Michaelis e, portanto, não é facilmente saturada por substrato (SCANDALIOS, 2005).

2.2.3 Glutationa Redutase (GR)

A enzima GR (1.6.4.2) é uma flavoproteína que catalisa a redução NADPH-dependente da glutationa oxidada (GSSG) a sua forma reduzida (GSH), a qual é um importante metabólito no

combate às EAOs (particularmente O_2^{\bullet} e H_2O_2) via o ciclo Halliwell-Asada (GRATÃO et al., 2005). A GSH participa do ciclo do ascorbato-glutationa, da manutenção de grupos sulfidríla de cisteína, do armazenamento do enxofre reduzido, e serve como substrato à reação da glutathione-S-transferase (NOCTOR et al., 2002; FOYER; NOCTOR, 2005).

A GR é de ocorrência quase universal, sendo amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (NOCTOR et al., 2002). Atua na seguinte reação:



2.3 Metais e cafeeiros

A espécie *Coffea arabica*, oriunda da Etiópia, é largamente plantada no Continente Americano, sendo o Brasil o país que tem a mais extensa área de cultivo (TOLEDO FILHO et al., 2002), onde se adaptou a diferentes condições de clima e solo. O cafeeiro é uma planta que leva, em média, dois anos para completar seu ciclo fenológico, cuja característica é a alternância entre o processo vegetativo e o reprodutivo (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

Ainda que para várias espécies vegetais de interesse esteja sendo publicado um volume muito grande de estudos enfocando o efeito do Cd, ainda há muito para se pesquisar sobre o efeito deste metal em cafeeiros. Muitos estudos têm sido dedicados a interferências dos metais pesados em processos fisiológicos associados com o crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, a produção econômica e crescimento de plantas são significativamente prejudicados quando estas crescem em solos contaminados com metais pesados (CHAOUUI et al., 1997; SMIRI, 2009).

Como o uso de adubos orgânicos em cafezais é uma prática rotineira no programa de fertilização, têm-se feito muitas especulações quanto aos efeitos, nas plantas, de resíduos industriais e urbanos. Estes resíduos podem conter concentrações altas de certos metais pesados, tais como cádmio, níquel, cromo, chumbo, cuja solubilidade aumenta em pH ácido. Embora haja algumas publicações referindo-se aos problemas de toxidez de metais em solos ácidos para

muitas espécies de plantas cultivadas, são relativamente poucos os trabalhos publicados sobre o efeito tóxico desses elementos em cafeeiros (PAVAN; BINGHAN, 1982; MAZZAFERA, 1998).

Abreu et al. (2005) estudaram o nível de alguns metais pesados em 13.416 amostras de solo de 21 estados brasileiros, sendo 58% delas originárias do estado de São Paulo, e verificaram as seguintes faixas de variação: Cd 0,00-3, 43; Cr, 0,0-42,9; Ni, 0,00-65,1; Pb, 0,00-63,9. Estes solos eram em sua maioria cultivados e entre eles, 2.29%, 0.35%, 0.19% e 19.6% estavam acima dos níveis de solos referências (não cultivados) em relação a Cd, Cr, Ni e Pb, respectivamente. Segundo os autores, o alto nível de Cd, Cr e Ni em alguns solos estaria relacionado ao uso de resíduo de esgoto tratado. O café estava entre as culturas que tiveram o solo amostrado. Os autores concluíram que as contaminações acima dos níveis normais eram resultado da ação antropogênica.

Martins et al. (2005) empregaram lodo de esgoto na fertilização de plantas de café avaliando, em seguida, a qualidade da bebida. Os autores não encontraram alterações na qualidade da bebida. Entretanto, não foram realizadas avaliações sobre o acúmulo dos metais tóxicos na planta, principalmente nos grãos. Conseqüentemente, uma boa pergunta é se em solo contaminado, os frutos poderiam reter grande quantidade de metais.

Um estudo conduzido com mudas de café Catuaí Vermelho (*C. arabica*) que receberam biosólidos, desde sua formação, mostrou que Cr, Co, Ni, Pb, Cu e Zn acumulam principalmente nas raízes, enquanto Mn acumula nas folhas (FRANCO et al., 2004). Gomes-Junior et al. (2006b) utilizando células de café em suspensão expostas ao metal pesado Cd, demonstrou que este era rapidamente absorvido pelas células e acumulado em altas concentrações.

Alyssum maritimum, uma planta hiperacumuladora de Ni e Cd, em presença de Ni, exibiu um típico mecanismo de defesa antioxidante, elevando a atividade das enzimas SOD, ascorbato peroxidase (APX) e GR (SCHICKLER; CASPI, 1999). Em plantas de feijão, algumas enzimas antioxidantes são ativadas em resposta ao estresse oxidativo induzido por Cd (CHAOUÏ et al., 1997). A atividade da peroxidase aumentou em plantas jovens de milho tratadas com Cd (LAGRIFFOUL et al., 1998). Cakmak e Marschner (1992) estimaram que sob condições normais, em cloroplastos não estressados, a fotorredução do oxigênio molecular varia entre 5 % a 27 % do fluxo total de elétrons. Porém, radicais livres podem se tornar altamente destrutivos para células e tecidos se sua produção não for controlada (RICE-EVANS et al., 1991).

Enzimas antioxidantes também foram estudadas em plantas de ervilha submetidas à ação

do herbicida paraquat. Este herbicida interrompe o transporte de elétrons na fase fotoquímica da fotossíntese e, conseqüentemente, haverá produção de EAO, uma vez que o sistema não consegue dissipar totalmente a energia via fotofosforilação cíclica. Observou-se aumento nas atividades de GR, APX e diferentes isoformas de SOD (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD e Fe-SOD) nas folhas da cultivar que apresentava grande resistência a este herbicida (DONAHUE et al., 1997).

Do ponto de vista do produto final, ou seja, a bebida preparada a partir de grãos de café torrados e moídos, o estudo da influência dos metais pesados também é de suma importância. Pesquisa conduzida nos laboratórios do CSIRO-Austrália (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) mostrou que café preparado com água contaminada com metais pesados tinha menos desses metais. Devido à alta capacidade do pó de café se ligar aos metais, parte destes ficava retida no coador, junto com o pó. A justificativa para tal seria de que as paredes celulares da semente de café seriam bastante carregadas negativamente, se ligando aos metais.

Muitos aspectos da fisiologia do cafeeiro apresentados na literatura são contraditórios, outros são ainda obscuros, o que demanda um maior número de pesquisas para sua elucidação (CHAVES FILHO, 2007). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação do metal pesado cádmio, em diferentes concentrações, no sistema antioxidante de folhas de cafeeiros adultos em produção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) e no Departamento de Fisiologia Vegetal do IB/Unicamp.

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas com aproximadamente cinco anos de idade da espécie *C. arabica* cv Obatã IAC 1669-20, instaladas no campo experimental do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ-USP. O solo da área experimental é classificado como Nitossolo Vermelho Eutroférico, latossólico, textura argilosa, A moderado. A condução da cultura como adubação, controle de pragas e doenças, foi feita de acordo com as técnicas agronômicas indicadas para a cultura. As plantas foram implantadas com espaçamento de 3,4 m x 0,9 m na respectiva área, cuja declividade é, em média, 2%.

3.2 Modelo experimental

Segundo Abreu et al. (2005) não existem para os solos brasileiros níveis definidos de contaminação por metais pesados. Assim, estes autores agruparam seus dados de forma comparativa com solos que ainda não haviam sido cultivados, logo, sem ação antropogênica. A projeção da copa, no solo, de cada planta de café corresponde a, aproximadamente, $1,5 \text{ m}^2$. Como se pretende que o metal se movimente até a profundidade de 0,5 m, na zona de maior concentração de raízes dessas plantas (GINDEL, 1961; HUXLEY et al., 1974), o volume de solo será igual a $1,5 \text{ m}^3$ ($3,0 \text{ m}^2 \times 0,5 \text{ m}$). Cada tratamento será composto por cinco plantas, de acordo com a figura 1. Admitindo que o nível fitotóxico de Cd varia de 5 a 30 mg/kg de solo (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000), foram feitos os cálculos seguintes:

Nível fitotóxico de Cd: 5 a 30 mg/kg de solo

Quantidades usadas: Cd – 22,5, 67,5 e 135 mg/kg (CdSO_4 – massa = 208,47 / massa Cd = 112,4)

Considerando-se que o espaçamento é de quase 1 m entre plantas, largura de saia de 1,5 e profundidade de 0,5 m, totalizando 750 m^3 (=750 Kg), cada planta recebeu:

Nível 1 = 16,88 g = **11 g de Sulfato de Cd (3 x 11 g)**

Nível 2 = 50,63 g = **99 g de Sulfato de Cd (3 x 33 g)**

Nível 3 = 101,25 g = **198 g de Sulfato de Cd (3 x 66 g)**



Figura 1 - Esquema de distribuição das plantas no campo. Cada quadrado representa 5 plantas. Os níveis 1, 2 e 3 correspondem as doses de 15, 45 e 90 mg/kg de solo ou g/planta

As aplicações e as coletas foram feitas de acordo com o esquema abaixo, sendo a primeira em 15 de dezembro de 2007, a segunda em 15 de fevereiro de 2008 e a terceira em 15 de março de 2008. Para isto, cada quantidade de cada metal foi diluída em 10 L de água, sendo distribuídos uniformemente 5 L de cada lado da plantas, sobre o solo sob a copa do cafeeiro. A aplicação foi feita lentamente permitindo-se que a solução infiltra-se no solo evitando escoamento. Para evitar a contaminação de metais entre os tratamentos, foram dados espaçamentos consideráveis entre as plantas.

dez 07	fev 08	mar 08	abril 08
Aplicação 1	Aplicação 2	Aplicação 3	-----
Coleta 1	Coleta 2	-----	Coleta 3
Metal Solo	Bioquímica (tempo 1) Solo	-----	Metal Bioquímica (tempo 2) Molecular
ORGANIZAÇÃO DAS COLETAS * - para metal coletar folhas Coletar folhas do 3º ou 4º par de folhas As folhas devem ser de ramos na porção média da planta ** - para bioquímica coletar folhas Coletar folhas do 3º ou 4º par de folhas As folhas devem ir para N ₂ líquido As folhas de enzimas vão para -80°C *** - para molecular coletar folhas e frutos Coletadas folhas novas, ou seja, do primeiro par e imediatamente em N ₂ Em laboratório devem ir para -80°C **** - para solo Coletar 3 amostras de cada tratamento, entre as plantas 1 e 2, 3 e 4, e 4 e 5			

3.3 Coletas

3.3.1 Análise de solo

As amostras de solo foram coletadas, no início e final do experimento em ambos os lados das plantas, com trado para profundidades 0-5 cm, 5-15 cm, 15-25 cm, 25-50 cm e 50-100 cm. Após secagem do solo em estufa a 60°C e a passagem por peneira 20 mesh, o solo foi encaminhado ao Centro de Solo do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) para a determinação de Cd (mg dm⁻³).

3.3.2 Análise de metal em folhas e ramos

A cada mês durante o ano, a contar da primeira aplicação de metais, foram amostrados ramos e folhas de ramos do terço médio, sendo elas do primeiro (folhas novas) e do terceiro par de folhas. Os ramos e folhas foram coletados e secos em estufa a 60°C por uma semana. Depois foram moídas em moinho de facas, passadas por peneira (35 mesh), homogeneizadas e armazenadas em frascos plásticos em dessecador até análises no ICP-OES.

Foi realizada uma digestão nitro-perclórica segundo Malavolta et al. (1997). Mediu-se 250mg de material seco e moído e colocou-se em tubo. Posteriormente, adicionou-se 2,5 mL de

ácido nítrico concentrado sob temperatura ambiente. Após o repouso por uma noite, os tubos foram aquecidos em bloco digestor (80-100°C) por aproximadamente 3 horas e 30 minutos, para evaporar o ácido nítrico. Em seguida, foi adicionado 500 µL de ácido perclórico concentrado (72%) e a temperatura foi gradativamente aumentada até atingir 200°C, prosseguindo a digestão até a dissipação de vapores emanados do tubo. Posteriormente, foram adicionados 25 mL de água ultrapura e realizadas as leituras.

As concentrações de Cd foram determinadas em fotômetro de absorção atômica com chama Perkin Elmer – modelo 3110, equipado com lâmpada catodos oco de cádmio, com comprimento de onda de 229 nm, fenda 0,7 nm, corrente de lâmpada 4 mA e chama de ar e acetileno. Os valores de concentração foram expressos em mmol por grama de tecido seco.

As análises foram realizadas no Centro de Solos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Brasil.

3.3.3 Atividades enzimáticas e outras análises bioquímicas

Foram coletadas 4 folhas de 4 ramos do terço médio das plantas (3° ou 4° pares), coletando folhas de 5 plantas, imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o processamento.

3.3.4 Análises moleculares

Foram coletadas 15 folhas novas do terço médio de cada planta e 30 frutos de cada planta e imediatamente congelados em N₂ líquido e depois armazenado em freezer -80°C. As folhas novas foram escolhidas por apresentarem maiores quantidades de mRNA. A extração de RNA total nos materiais selecionados foi feita com reagente Trizol da Invitrogen e a primeira fita de cDNA foi obtida usando-se kit da Boehringer Mannheim – “1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)” e o primer B26 (FROHMANN et al., 1988). Para a produção de cDNA o RNA foi quantificado por UV em 260nm e também em gel de agarose e coloração com brometo de etídio. Para controle, foi usado nas reações de RT-PCR um gene house-keeping de actina de café, que vem sendo empregado no laboratório correntemente. As análises de expressão de genes codificando para enzimas antioxidativas foram feitas por RT-PCR semiquantitativo (MELO;

MAZZAFERA, 2004). Para isto, fez-se o estudo de todas as seqüências encontradas no banco EST-Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) para as enzimas que se pretendia avaliar.

3.4 Extração e determinação da concentração de proteínas totais

As amostras de cada tratamento foram maceradas em mortar com nitrogênio líquido até formar uma farinha, onde posteriormente foi adicionado o tampão de extração (1 g de tecido/ 3 mL de tampão), conforme a composição abaixo. O homogeneizado foi centrifugado a 10000 rpm por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado, passado por coluna PD-10 (Sephadex G-25) para retirar compostos fenólicos, dividido em alíquotas e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

O uso da coluna PD-10 foi essencial à qualidade tanto dos extratos para a quantificação de proteínas como para a determinação da atividade de algumas enzimas, como é o caso da Catalase. Sua atividade é determinada por espectrofotometria a 240nm, a mesma faixa de comprimento de onda dos fenóis. Deste modo, foi eliminada qualquer interferência destes compostos sobre a atividade da CAT.

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“*bovine serum albumin*”) como padrão, por espectrofotometria (Beckman, modelo J2-MC) a 595 nm.

Tampão de extração: Tampão tris-HCl 100 mM (pH7,5), acrescido de 7% sacarose, 14 mM β -mercaptoetanol, 250 mM ácido ascórbico, 20 mM DTT, 1% albumina bovina, 20 mM metabissulfito sódio, 200 mM tetraborato de sódio, 10% PVPP.

Outros tampões foram testados para o processo de extração das proteínas totais do material vegetal, tendo como parâmetro a oxidação das amostras após a extração e a quantidade de proteínas extraídas para cada um deles, determinada de acordo com Bradford (1976). A seguir, a composição de todos os tampões testados:

Tampão 1: Tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5); suplementado por 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 5% PVPP. Este tampão não foi eficiente para o processo de extração, pois a oxidação das amostras foi elevada.

Tampão 2: Tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5); suplementado por 1 mM EDTA, 2 mM β -mercaptoetanol, 5% PVPP. Embora a oxidação não tenha sido tão rápida, também ocorreu.

Tampão 3: Tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0); suplementado com 2% de ácido ascórbico, 5 mM de DTT, 5 mM de PMSF e 10% PVPP. O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Tampão 4: Tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0); suplementado por 2% ácido ascórbico e 20% PVPP. O extrato foi mantido durante 30 minutos a 4°C com agitação ocasional. Após centrifugação a 13000 rpm, por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recuperado e dessalinizado em PD-10 Sephadex G-25, usando 50 mM de fosfato de sódio pH 6,0 para eluir as proteínas. Para 1 g material, foram utilizados 10 mL do tampão.

Tampão 5: Tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) contendo 2% ácido ascórbico, 100 mg PVPP e 14 mM β -mercaptoetanol. Após agitação por 10 minutos em banho de gelo o sobrenadante foi filtrado em coluna PD-10 Sephadex G-25. A eluição das proteínas foi feita com tampão fosfato 0,025 M pH 6,0.

Tampão 6: Tampão tris-HCl 100 mM (pH 7,5), acrescido de 7% sacarose, 14 mM β -mercaptoetanol, 250 mM ácido ascórbico, 20 mM DTT, 1% albumina bovina, 20 mM metabissulfito sódio, 200 mM tetraborato de sódio, 10% PVPP. Também foram testados detergentes como o tween 80 e triton x100, e 10 mM KCl ou $MgCl_2$.

Tampão 7: Tampão tris-base 100 mM (pH 7,0), 250 mM sacarose, 10% glicerol, 100 mM KCl, 5 mM EDTA. Na hora do uso foram adicionados: 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 0,4% PVPP e 0,3% BSA. Foi mantida a proporção de 1:1 entre amostra (g) e tampão (mL). Os extratos foram centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C.

Os melhores tampões, quanto à ausência de oxidação do material vegetal foram o 3, 5 e 6. Para o tampão 6, foram encontradas maiores quantidades de proteína solúveis totais, porém a dúvida era a possível influência do ácido ascórbico nas quantificações das atividades enzimáticas de APX e GR, já que o mesmo é utilizado como um dos substratos nas análises, e ainda também uma possível influência da albumina bovina na quantidade de proteínas quantificadas. Por estas razões, foram elaborados 4 testes de extração de proteínas e oxidação com o tampão 6, que se seguem abaixo:

Testes	Ácido ascórbico	Albumina bovina
A	Composição completa do tampão	
B	Ausência	Ausência
C	Ausência	Presença
D	Presença	Ausência

Nos testes B e C houve oxidação do material vegetal, devido à ausência do ácido ascórbico no meio de extração, o que não ocorreu nos testes A e D. Portanto, concluiu-se que o ácido ascórbico era essencial para a prevenção da oxidação do material, devido ao seu caráter antioxidante. Já a albumina, parece não ter influenciado a qualidade das extrações. Como seu uso é atribuído à maior estabilidade das proteínas e ao bloqueio da ação das proteases sobre as proteínas de interesse, ela foi mantida na formulação do tampão.

3.5 Gel SDS-PAGE

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, cuja função é quebrar as ligações dissulfeto (LAEMMLI, 1970).

As proteínas das amostras bacterianas foram separadas utilizando o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. A concentração do gel foi de 10% de poliacrilamida. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 2,5 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9 e 5 mL de água e 100 µL de SDS 10%. Como catalisadores foram utilizados

19 μL de TEMED e 25 μL de persulfato de amônio (1%). Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 μL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água e 50 μL de SDS 10%. Para a polimerização foram utilizados 10 μL de TEMED e 50 μL de persulfato de amônio (1%).

A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de corrida (5X concentrado) contém 25 mM TRIS, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina e 1% de SDS 10%.

O tampão de amostra contém 3 mL de água destilada, 1 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de SDS (10%), 400 μL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 400 μL de mercaptoetanol.

Para cada gel foram aplicados 4 μL de padrão BenchMark - Protein Ladder – Invitrogen e 20 μg de proteína por canaleta. Os géis foram corados com uma solução de Comassie Blue (0,5 g de Comassie Blue R-250 em 500 mL de solução descorante) por 12 horas e posteriormente repassados para a solução descorante (400 mL de Metanol p.a., 70 mL de ácido acético glacial, completando o volume para 1000 mL de água destilada), até a perfeita visualização das bandas. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.6 Peroxidação Lipídica

O dano oxidativo aos lipídeos foi estimado pelo conteúdo de substâncias reativas com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), expresso na forma de malondialdeído (MDA), obtido por espectrofotometria a 535 e 600 nm, adaptado de Heath e Packer (1968). Foram macerados 300 mg de material fresco em nitrogênio líquido até a textura de pó fino e homogeneizados em 3 mL de uma solução 0,1% TCA, na presença de 4% de PVPP. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 12 minutos 250 μL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL da solução contendo 20% TCA + 0,5% TBA e a mistura foi aquecida a 95°C por 30 minutos. Após resfriamento em banho de gelo por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e as leituras foram realizadas a 535 e 600 nm. A concentração de MDA, em nmol/g massa fresca, foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção da reação:

$$\eta\text{mol MDA} = [(A_{535} - A_{600}) / 155000] * 10^6$$

$$\eta\text{mol MDA/g MF} = (\eta\text{mol MDA}) / 0,3$$

3.7 Atividade da Superóxido Dismutase - SOD

A atividade da SOD foi determinada unicamente em gel não denaturante (PAGE).

3.7.1 Atividade em PAGE

A eletroforese em PAGE (12%) foi realizada nas mesmas condições como descrito para CAT (item 3.6.2). Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de SOD de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 20 µg de proteína dos extratos protéicos. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada de acordo com Gomes-Junior et al. (2006b).

Os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro a temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis foram enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas brancas sob fundo roxo. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel, propiciando a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes à atividade de SOD permanecem sem se fotoxidar, promovendo uma revelação negativa, assim como para CAT. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.7.2 Determinação das isoformas de SOD

Para a determinação das isoformas de SOD foi realizada uma eletroforese com 300 µg de proteína da amostra tratada com Cd que mais apresentou bandas no gel de atividade de SOD e de uma amostra controle, nas mesmas condições descritas anteriormente para SOD (item 3.7.1). Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira parte foi mantida

a 4°C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo 2 mM de KCN e 0,0292 g de EDTA. A terceira, imersa em 100 mL do referido tampão contendo 5 mM de H₂O₂ e 0,0292 g de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro.

Após 20 minutos nestas soluções, os géis foram submetidos à revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente no item 3.7.1. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H₂O₂. As isoformas foram então classificadas como MnSOD, FeSOD ou Cu/ZnSOD. MnSOD é resistente a ambos os inibidores (KCN e H₂O₂), FeSOD é resistente ao KCN e inibida por H₂O₂ e Cu/ZnSOD é inibida por ambas as substâncias (AZEVEDO et al., 1998).

3.8 Atividade da Catalase - CAT

A atividade da CAT foi determinada por espectrofotometria e em gel não denaturante (PAGE).

3.8.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da CAT foi determinada como descrito por Kraus et al. (1995) com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998).

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a catalase foi determinada a 25°C em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (solução de 0,25%) preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

3.8.2 Atividade em PAGE

A atividade de CAT em PAGE não denaturante foi determinada através dos extratos protéicos, cujas proteínas foram separadas por eletroforese em gel 12%. Foi utilizado o sistema Mini Protean II da Bio-Rad. O gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 3 M (hidroximetil)-aminometano (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 μ L de TEMED e 25 μ L de persulfato de amônio (1%).

Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 μ L de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 10 μ L de TEMED e 50 μ L de persulfato de amônio (1%).

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo foi TRIS 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X e reutilizado até 2 vezes. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 20 μ g de proteína dos extratos protéicos.

A revelação para a atividade de CAT foi realizada após a lavagem do gel por 45 minutos em água deionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em 0,003% de H₂O₂, à temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃ 1% (p/v) e K₃Fe(CN)₆ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.9 Atividade da Glutathione Redutase – GR

A atividade da GR foi determinada por espectrofotometria e em gel não denaturante (PAGE).

3.9.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade da Glutathione Redutase foi determinada como descrito por Gomes-Junior et al. (2006b), com algumas modificações.

Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a GR foi determinada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de DTNB (2-ácido nitrobenzóico), 1 mM de GSSG (glutathione oxidada) e 0,1 mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 30 µL de extrato protéico. A atividade da GR foi estimada pela redução de glutathione oxidada acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a 412 nm por 1 minuto. Os valores de atividade foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

3.9.2 Atividade em PAGE

Foi realizada a eletroforese em PAGE não-desnaturante (12%) nas mesmas condições como descrito para CAT (item 3.9.1.2). Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de GR de fígado de boi – Sigma (1 unidade) e 20 µg de proteína dos extratos protéicos.

Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de GR foi determinada como descrito por Lee & Lee (2000). Após a corrida, os géis foram lavados em água deionizada (2 x 15 minutos) e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos em uma solução de 0,25 M de TRIS em pH 7,5, 10 mg MTT; 10 mg DPIP; 3,4 mM GSSG (glutathione oxidada) e 0,5 mM NADPH para 50 mL de água. O gel foi lavado rapidamente em água deionizada e a reação foi fixada em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.10 Análise Estatística

Para a análise dos dados quantitativos foi realizada análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan (5%). A homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e a normalidade dos resíduos pelo teste de

Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965). Os dados de CAT, GR e MDA foram transformados com $X^{0.38}$, $(X+1)^{0.45}$, $(X+0,5)^{0.5}$, respectivamente. Todas as análises foram feitas usando o software R (<http://www.r-project.org/>).

4 RESULTADOS

4.1 Análise de solo

A análise de solo mostrou nitidamente que houve aumento da concentração de metal no solo e que este incremento foi crescente à medida que se aumentou a dose do metal aplicada (Tabela 1). Foram realizadas análises em dezembro de 2007 – antes da aplicação do metal – e em abril de 2008 – um mês após a última aplicação.

Tabela 1 - Teor de Cd no solo antes e após a aplicação (profundidade de 0-20 cm)

Tratamento	Cd µg/g massa seca	
	Dezembro 2007	Abril 2008
Controle (0)	<0,001	0,2
15 g Cd/planta	<0,001	37,8
45 g Cd/planta	<0,001	96,7
95 g Cd/planta	<0,001	124,3

4.2 Quantificação de metal em folhas e ramos

De acordo com a tabela 2 pode-se observar que o Cd não acumulou nas folhas, mas somente nos ramos, sendo este de forma muito similar para todas as concentrações do metal.

Tabela 2 - Teor de Cd nas várias partes da planta

Tratamento		Cd µg/g massa seca	
		Dezembro 2007	Abril 2008
Controle (0)	folhas	--*	--*
	ramos	<0,4	<0,4
15 g Cd/planta	folhas	--*	--*
	ramos	<0,4	4,50 ± 3,11
45 g Cd/planta	folhas	--*	--*
	ramos	<0,4	4,47 ± 2,92
95 g Cd/planta	folhas	--*	--*
	ramos	<0,4	6,35 ± 1,06

* abaixo do limite detectável

As análises foram realizadas em dezembro de 2007 – antes da aplicação do metal – e em abril de 2008 – um mês após a última aplicação.

4.3 Aspecto visual das plantas

A figura 2 mostra as plantas em janeiro de 2009. As plantas tratadas com 90g/planta de Cd apresentavam sintomas de alta toxicidade após 10 meses de finalizada a última aplicação do metal. Os sintomas eram de murcha apical e morte de folhas, descendo pelo perfil das plantas. As plantas de 45g/planta de Cd começaram a apresentar os mesmos sintomas alguns meses depois das plantas da maior dose.



Figura 2 - Aspecto visual das plantas de café no campo tratadas com Cd em três doses crescentes, em janeiro de 2009

4.4 Peroxidação Lipídica

Deste ponto em diante será feito referência ao tempo 1 e tempo 2, dezembro de 2007 e abril de 2008 respectivamente, sendo que no tempo 1 as plantas haviam recebido 2/3 da quantidade de metal proposta inicialmente e, no tempo 2 havia 1 mês que receberam a quantidade total proposta.

4.4.1 Quantificação de malondialdeído (MDA) em espectrofotômetro

De acordo com a quantificação de um dos compostos formados durante a peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), os tratamentos com Cd apresentaram altos danos oxidativos (Figura 3). Não foi observada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan entre os tratamentos no tempo 1, enquanto que no tempo 2 as concentrações de 15 e 90g Cd/planta se mostraram maiores que o controle.

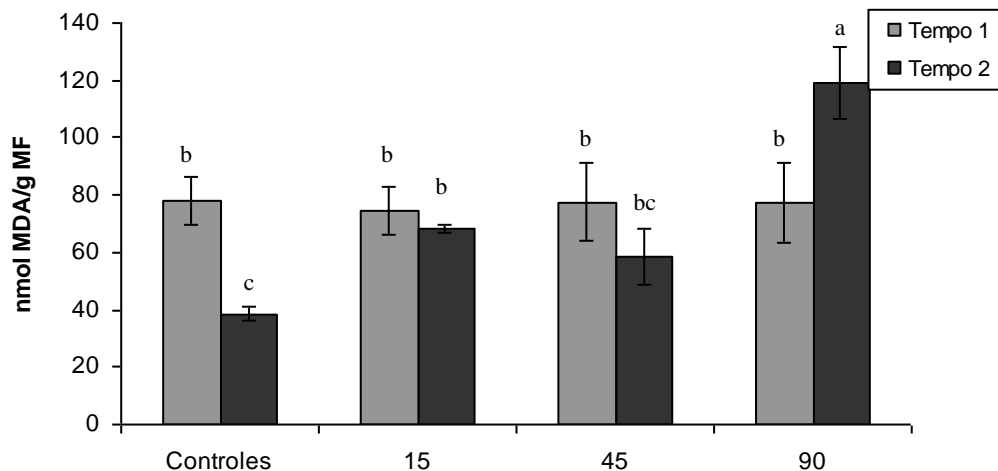


Figura 3 – Quantidade de MDA (nmol/g massa fresca) para os tratamentos de concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta. Tempo 1 – fevereiro de 2008 e Tempo 2 – abril de 2008. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. CV: 13,0%

4.5 Proteínas

4.5.1 Quantificação de proteínas em espectrofotômetro

Os teores de proteína solúveis totais não apresentaram diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan entre as doses e seus controles tanto no tempo 1 como no tempo 2 (Figura 4).

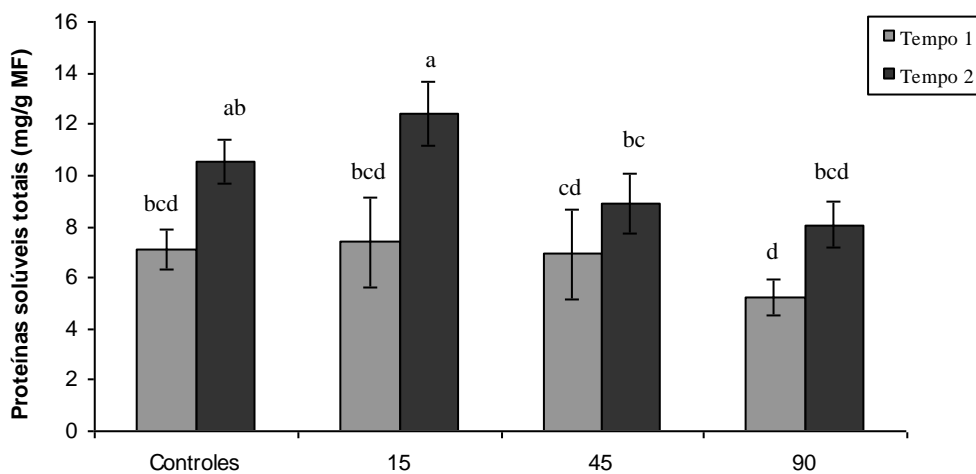


Figura 4 – Teor de proteína (mg/g massa fresca) para os tratamentos de concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Tempo 1 – fevereiro de 2008 e Tempo 2 – abril de 2008. CV: 28,2%

4.5.2 Perfil protéico em SDS-PAGE

Na análise de SDS-PAGE do tempo 1 (Figura 5) não foram observadas alterações nos tratamentos em relação aos controles. Já o gel do tempo 2 (Figura 6) apresentou leves mudanças no perfil protéico de intensidade de bandas. As bandas I e II, de aproximadamente 55kDa e 25kDa respectivamente, apresentaram redução de intensidade, principalmente para a concentração intermediária de Cd, entretanto, a banda II, com efeito mais pronunciado nas três concentrações de Cd em relação aos controles.

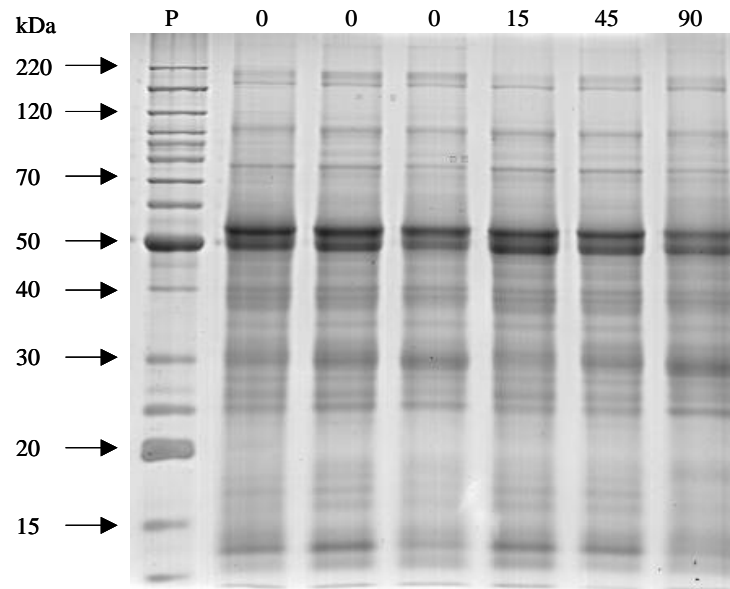


Figura 5 – Proteína em gel SDS-PAGE para o tempo 1 (fevereiro de 2008). Padrão (P) BSA; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta.

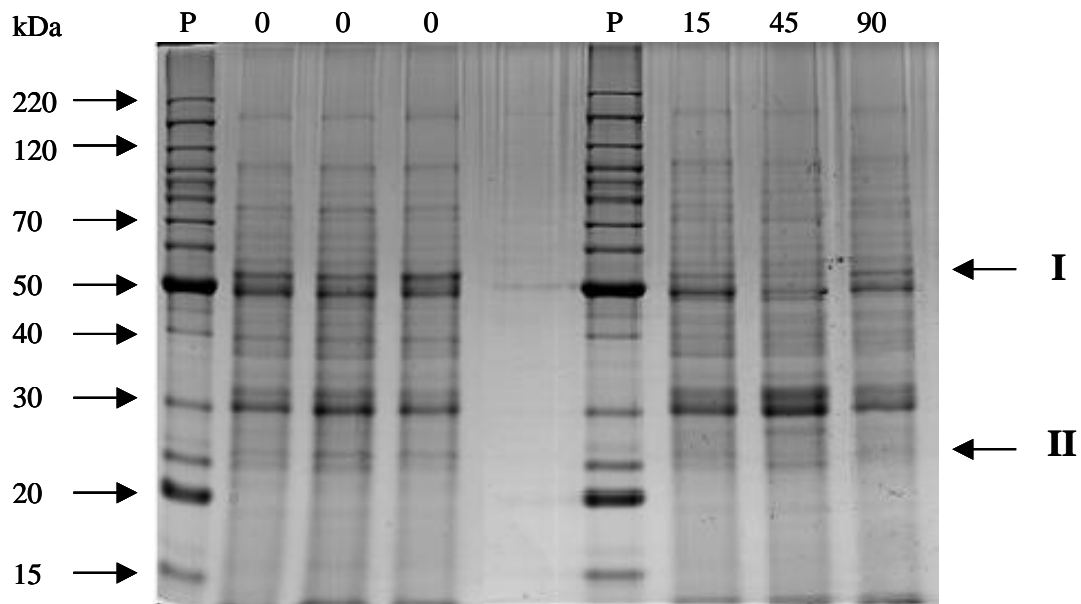


Figura 6 – Proteína em gel SDS-PAGE para o tempo 2 (abril de 2008). Padrão (P) BSA; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta. As setas representam as alterações observadas

4.6 Análise das enzimas antioxidantes

4.6.1 Atividade da SOD em PAGE

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EAOs agindo contra o radical superóxido, transformando-o em H_2O_2 e H_2O . A SOD foi analisada através de gel de poliacrilamida não denaturante (PAGE).

Foram observadas 7 isoformas ativas de SOD em todas as amostras, sendo a isoforma I de menor atividade em relação às demais independentemente dos tratamentos (Figuras 7 e 8). A única diferença nítida ocorreu no tempo 2, em que a isoforma IV foi inibida nas plantas que receberam Cd (Figura 8).

As isoformas I, II e III foram classificadas como MnSOD (resistentes à presença de KCN e H_2O_2) e as demais isoformas como FeSOD (resistentes a KCN e inativadas na presença de H_2O_2) como apresentado nas figuras 9 e 10.

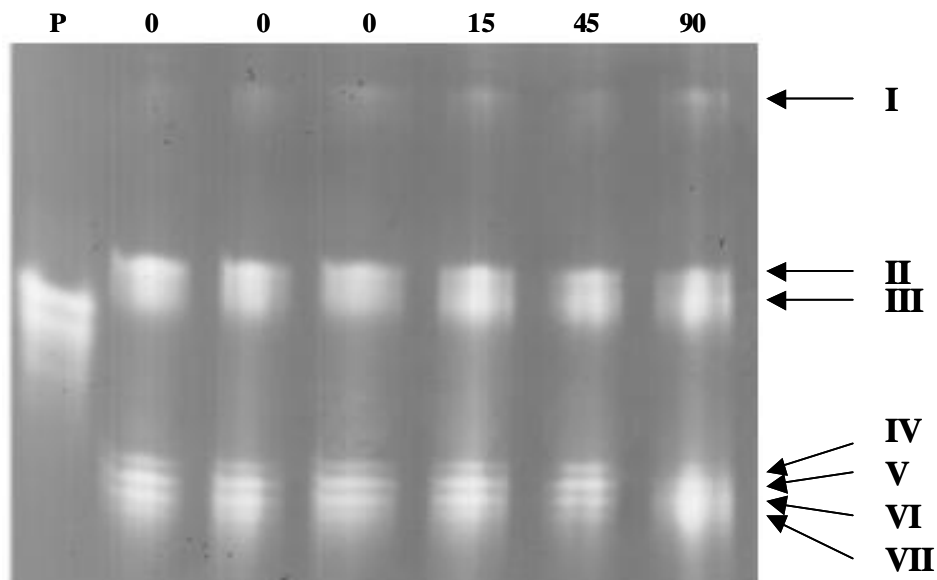


Figura 7 – Atividade específica de SOD em PAGE no tempo 1 (fevereiro de 2008). Padrão (P) SOD bovino; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta. As setas representam as isoformas de SOD

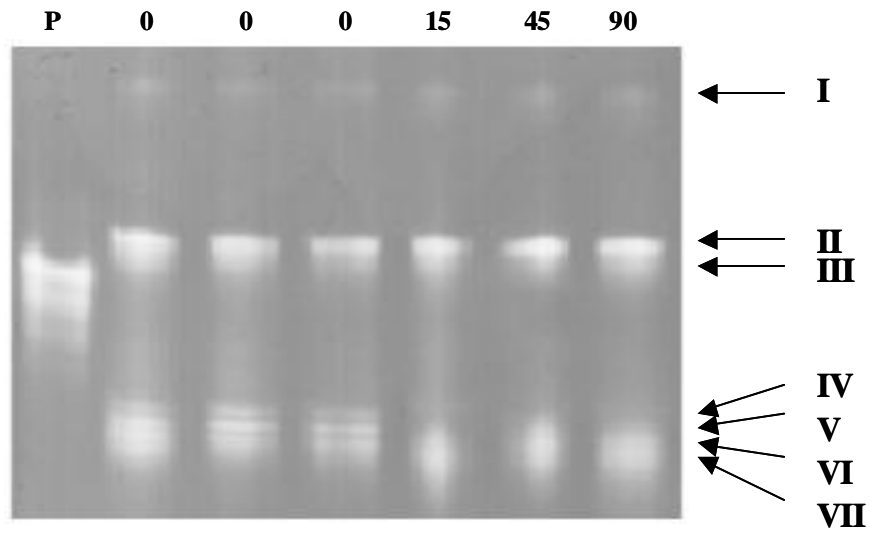


Figura 8 – Atividade específica de SOD em PAGE no tempo 2 (abril de 2008). Padrão (P) SOD bovino; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta. As setas representam as isoformas de SOD

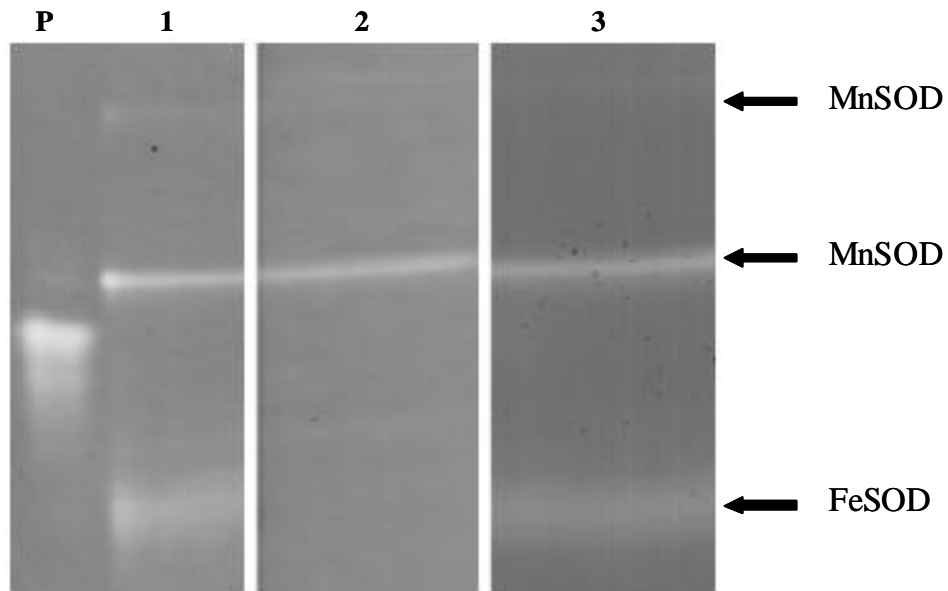


Figura 9 – Determinação das isoformas de SOD em PAGE. Padrão (P) SOD bovino; (1) tratamento sem Cd; (2) tratamento sem Cd + H₂O₂ e (3) tratamento sem Cd + KCN (abril de 2008)

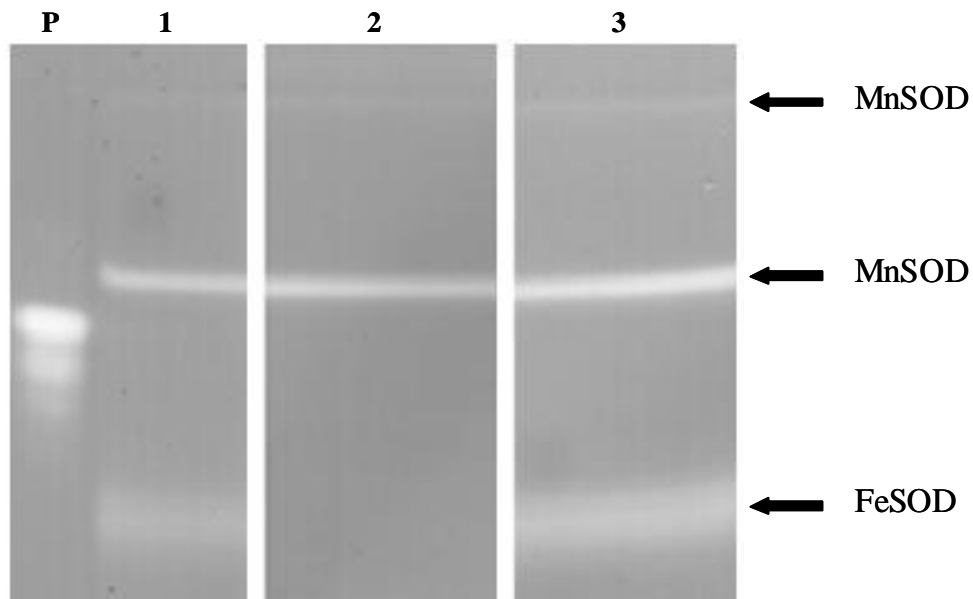


Figura 10 – Determinação das isoformas de SOD em PAGE. Padrão (P) SOD bovino; (1) tratamento com Cd 90 g Cd/planta; (2) tratamento com Cd + H₂O₂ e (3) tratamento com Cd + KCN (abril de 2008)

4.6.2 Atividade da CAT em espectrofotômetro e em PAGE

A CAT está localizada nos peroxissomos e metaboliza o H₂O₂ em O₂ e H₂O. A atividade desta enzima foi estudada em gel de poliacrilamida não denaturante (PAGE) e em espectrofotômetro, e o cálculo baseado na quantificação de proteínas totais.

Conforme o teste de Duncan a 5% de probabilidade para a análise de atividade enzimática de CAT todas as concentrações de Cd diferiram do controle no tempo 1, porém todas elas apresentaram atividades de CAT semelhantes. No tempo 2 observou-se menor atividade nos tratamentos em relação ao controle, entretanto esse efeito foi mais pronunciado para a menor dose, diferindo das demais (Figura 11).

Para a atividade da CAT em PAGE (Figuras 12 e 13) foi observada a presença de apenas uma isoforma ativa (II) no tempo 1 e, o surgimento de outra isoforma (I) somente nos controles no tempo 2. Além de redução na intensidade da banda (II) das plantas tratadas com Cd.

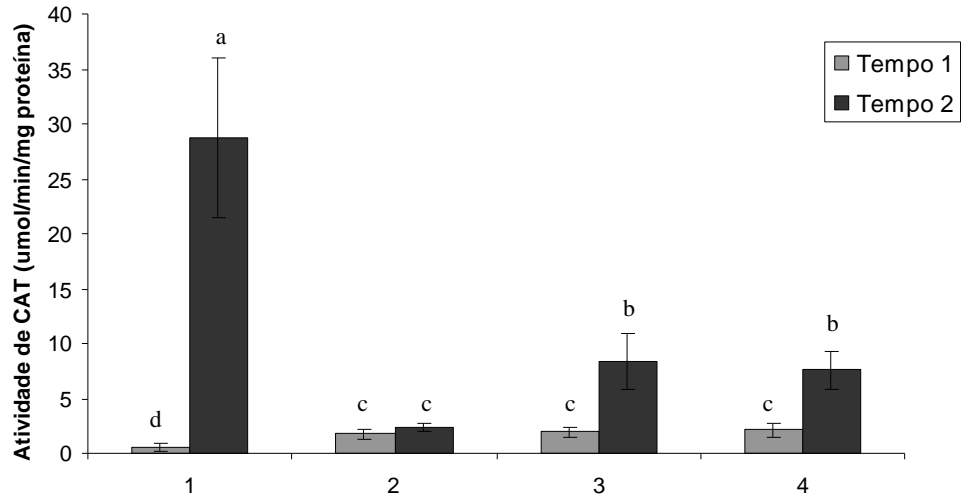


Figura 11 – Atividade específica de CAT (umol/min/mg proteína) para os tratamentos de concentrações 0, 15, 45 e 90 g/planta de Cd. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Tempo 1 – fevereiro de 2008 e Tempo 2 – abril de 2008. CV: 41,73%

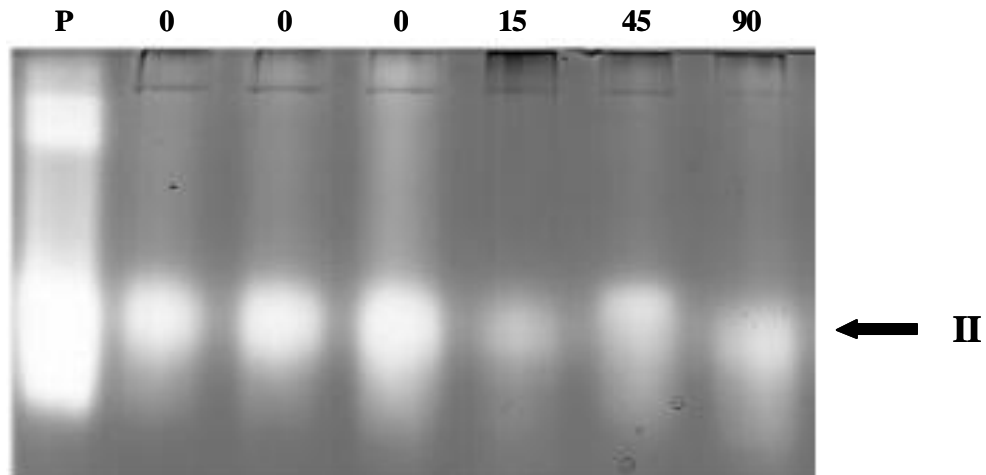


Figura 12 – Atividade específica de CAT em PAGE no tempo 1. Padrão (P) CAT bovino; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta. Tempo 1 – fevereiro de 2008 e Tempo 2 – abril de 2008. As setas representam as isoformas de CAT

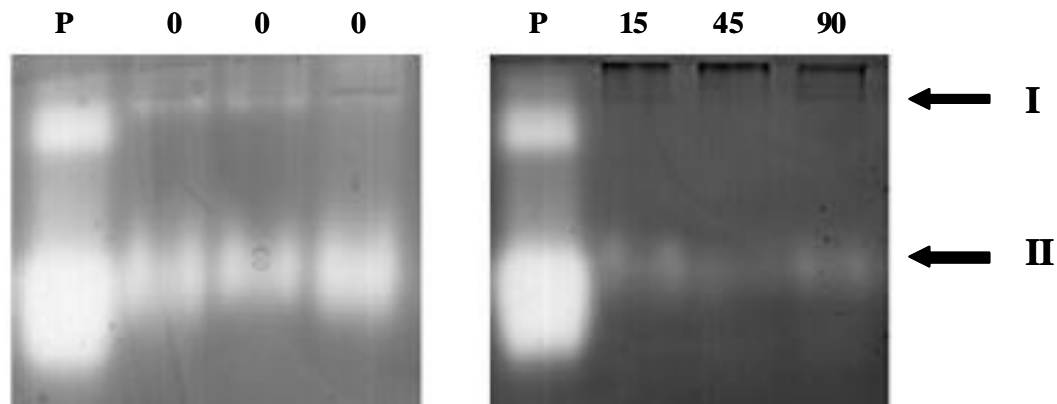


Figura 13 – Atividade específica de CAT em PAGE no tempo 2. Padrão (P) CAT bovino; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g Cd/planta. Tempo 1 – fevereiro de 2008 e Tempo 2 – abril de 2008. As setas representam as isoformas de CAT

4.6.3 Atividade da GR em espectrofotômetro e em PAGE

A GR age de forma indireta no combate às EAOs, através do ciclo Halliwell-Asada, regenerando a glutathiona reduzida (GSH) a partir de sua forma oxidada (GSSG).

Para a atividade de GR no tempo 1 não se verificou diferenças significativas com o teste de Duncan a 5% de probabilidade entre controle e tratados com Cd, enquanto que no tempo 2 todas as concentrações diferiram do controle, porém não entre si (Figura 14).

Para a atividade da GR em PAGE no tempo 1 (Figura 15) foi observado a presença de duas isoformas (II e III) tanto nos controles como nos tratamentos com Cd, enquanto no tempo 2 (Figura 16) observou-se o surgimento de uma terceira isoforma (I) somente nos controles.

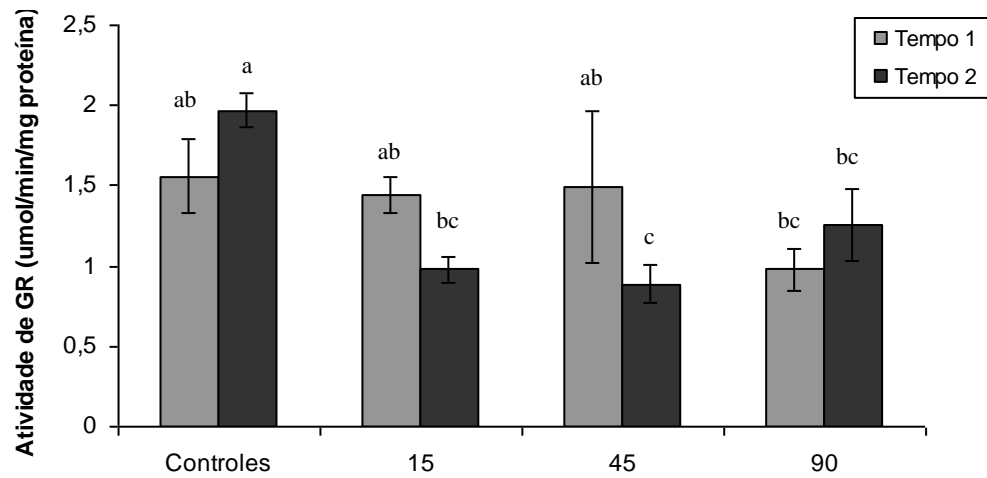


Figura 14 – Atividade específica de GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) para os tratamentos de concentrações 0, 15, 45 e 90 g/planta de Cd. Médias com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Tempo 1 – fevereiro de 2008 e Tempo 2 – abril de 2008. CV: 7,79%

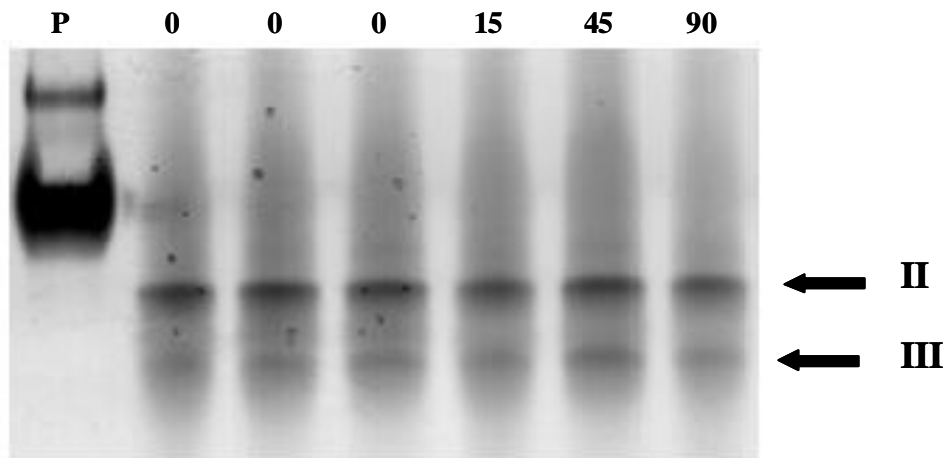


Figura 15 – Atividade específica de GR em PAGE no tempo 1 (fevereiro de 2008). Padrão (P) GR bovino; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g/planta de Cd. As setas representam as isoformas de GR

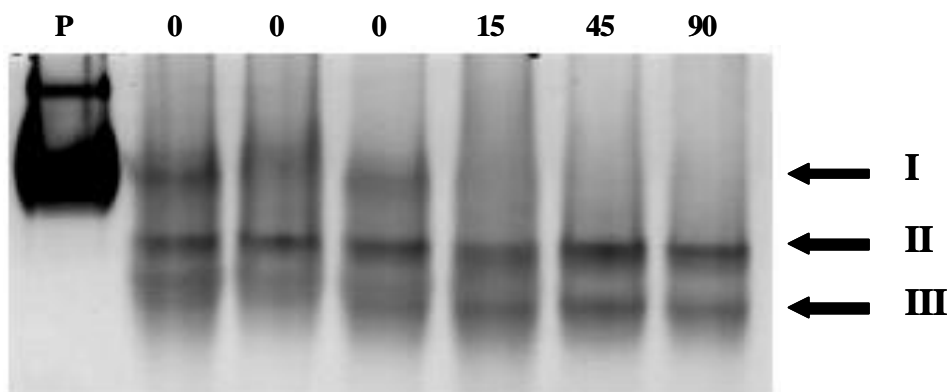


Figura 16 – Atividade específica de GR em PAGE no tempo 1 (fevereiro de 2008). Padrão (P) GR bovino; 0, 15, 45 e 90 representam as concentrações 0, 15, 45 e 90 g/planta de Cd. As setas representam as isoformas de GR

4.7 Análises moleculares

Como resultado de análises prévias a tabela abaixo resume todas as seqüências de genes identificados (contigs) formados de CAT, SOD e GR.

Tabela 3 - Contigs das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GR

Contigs	Total de Reads	Localização	Pares de bases e aminoácidos (aa)
Catalase			
Contig CAT1	301		1479 pb [492 aa]
Contig CAT2	47		1479 pb [492 aa]
Superóxido Dismutase			
Contig SOD2	52	Cu/Zn - citoplasmática	459 [152 aa]
Contig SOD3	18	Cu/Zn - citoplasmática	459 [152 aa]
Contig SOD4	23	Mn - mitocondrial	687 [228 aa]
Contig SOD5	24	Cu/Zn - cloroplastidial	675 [224 aa]
Contig SOD6	25	Fe – cloroplastidial	816 [271 aa]
Contig SOD7	4	Cu/Zn - citoplasmática	492 [163 aa]
Glutathione Redutase			
Contig GR1	17		870 [289 aa]
Contig GR2	3		876 [291 aa]

Abaixo estão os pares de primers desenhados com base nas análises acima e usados nas análises por RT-PCR semiquantitativo. As seqüências de cada gene não serão apresentadas por inteiro por simplesmente ainda não poderem ser liberadas pelo Consórcio Café, que coordena o programa EST-Genoma Café. Os números indicam os genes identificados. Por exemplo, GR1 significa o primer do contig 1 para esta enzima.

Glutathione Redutase

GR1-F 5'-CTCGGACAAACATACCTAGC-3'

GR1-R 5'-GACCACACATAGATGCTCCT-3'

GR2-F 5'-TGGACGGTTTCTCTCATATC-3'

GR2-R 5'-TTTATGGCCTGTTCTTCAGT-3'

Superóxido Dismutase

SOD2-F 5'-AAGGCTGTTGCAGTTCTTAG-3'

SOD2-R 5'-TGAGTTCATGTCCTCCTCTC-3'

SOD3-F 5'-TGTTAAGGGCACCATCTACT-3'

SOD3-R 5'-ACCATGGACAACACTACAGCTC-3'
 SOD4-F 5'-TACGTCACCAATTTCAACAA-3'
 SOD4-R 5'-ATCAATACCAAGCAGAGGAA-3'
 SOD5-F 5'-CTTCGCCTTCTTCTTTATCA-3'
 SOD5-R 5'-GACGGACATCATCTTTAGGA-3'
 SOD6-F 5'-CCAATTTCTGCTTTTCTCAC-3'
 SOD6-R 5'-CCATTGTTGTATGTGACTCG-3'
 SOD7-F 5'-TATTCATGCTCTTGGTGACA-3'
 SOD7-R 5'-TGATTGAATCCCAATAATCC-3'

Catalase

CAT1-F 5'-TGCTCATCACAACAATCACT-3'
 CAT1-R 5'-GTAGCCATTTTCTGACCAAG-3'
 CAT2-F 5'-CCATGACGGTTTTATGAACT-3'
 CAT2-R 5'-GCAAGCTTCTGACCTAGAGA-3'

Apesar de terem sido seguidos certos parâmetros no desenho dos primers (foi usado o programa Primer3 v. 0.4.0, disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/>), foram testadas as melhores temperaturas de anelamento para os diversos pares de primers. Desta forma, o programa básico usado no termociclador para os RT-PCRs foi: desnaturação inicial: 94°C/3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação 94°C/45 seg; anelamento: (depende do primer) °C/30 seg; extensão: 72°C/60 s. As temperaturas dos primers estão abaixo:

51°C –SOD 4 / CAT 2 / SOD 6 / SOD 7 / SOD 5 / GR 2 / CAT 1

52°C - SOD 2

54°C - GR 1 / SOD 3

Nas análises de RT-PCR foi usada a actina como normalizadora, sendo seus primers:

ACTIN_F – 5' – GAC CTC ACA GAT CAC CTC AT – 3'

ACTIN_R – 5' – GTA GTC TCG TGG ATA CCA CG – 3'

Após a realização dos PCRs a intensidade de cada banda foi determinada em um processador de imagens (Gel-DOC/ BioRad) que foi então normalizada com a intensidade da

reação com os primers de actina (sempre corridos juntos com as outras amostras). Para se ter valores acima de 1, os valores obtidos pela divisão das intensidades de bandas foi dividido pelo menor valor obtido. Para cada reação foram feitas 3 repetições. As figuras abaixo mostram os resultados das amplificações do tempo 2 para os primers de CAT, SOD e GR nas plantas. Não são mostrados os dados do tratamento 90g Cd/planta, simplesmente pelo fato de não ter sido possível extrair RNA das folhas que estavam muito debilitadas.

De acordo com a figura 17 pode-se notar que CAT1 apresentou maior expressão que CAT2 nos controles, e ambas têm expressão diminuída no tratamento 15 e 45g Cd/planta em relação ao controle, conforme observado para atividade. Já a CAT2 mostrou-se menor que o controle somente na menor dose de Cd.

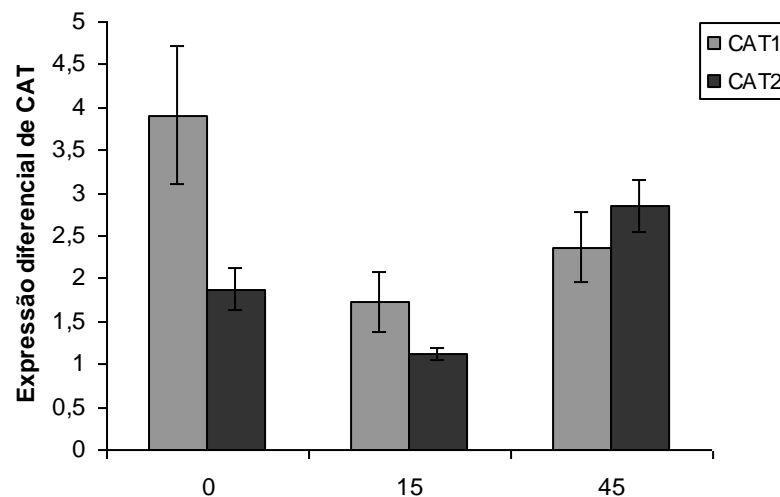


Figura 17 – Expressão diferencial de CAT para os tratamentos de concentrações 0, 15 e 45 g Cd/planta no tempo 2

Para a expressão de SOD (Figura 18) observou-se que a SOD7 se destaca como sendo o gene de maior expressão nas duas concentrações de Cd. E com exceção de SOD6 e SOD4, todos os outros genes apresentaram expressão aumentada na dose 45g Cd/planta ao comparar-se ao controle. Enquanto que na dose 15g Cd/planta, com exceção de SOD7, todos os genes apresentaram expressão diminuída em relação ao controle.

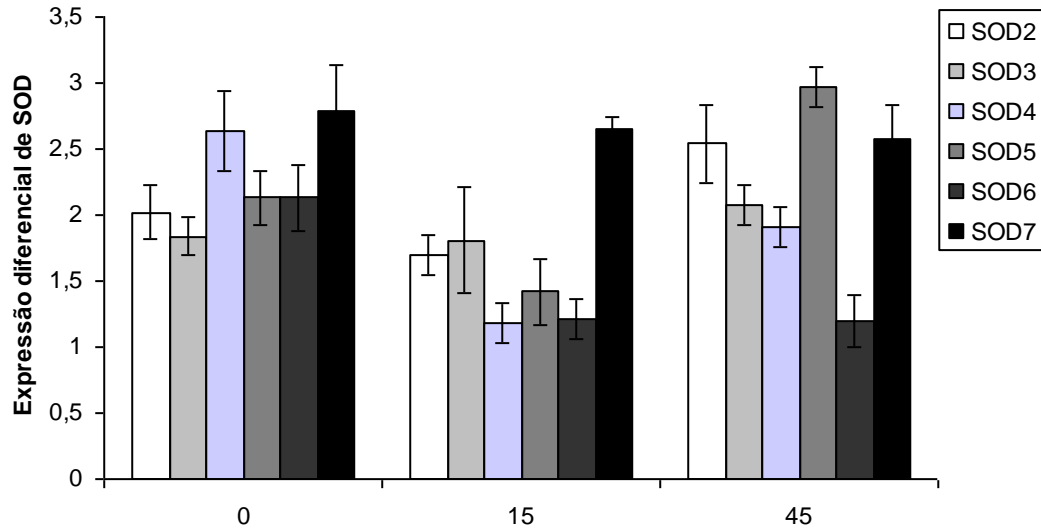


Figura 18 – Expressão diferencial de SOD para os tratamentos de concentrações 0, 15 e 45 g Cd/planta no tempo 2

Como se pode perceber na figura 19, GR1 e GR2 apresentaram expressões semelhantes, e ambas tiveram expressão diminuída nas duas doses de Cd em relação ao controle.

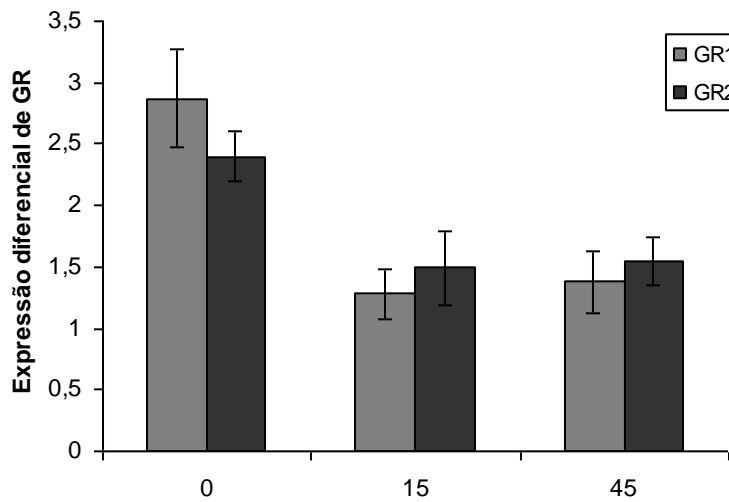


Figura 19 – Expressão diferencial de GR para os tratamentos de concentrações 0, 15 e 45 g Cd/planta no tempo 2

5 DISCUSSÃO

Nas plantas, as EAOs são produzidas continuamente como subprodutos indesejáveis de diversas vias metabólicas localizadas em mitocôndrias, cloroplastos e nódulos de fixação de nitrogênio (GARG; MANCHANDA, 2009). Nos cloroplastos, os locais de maior produção de EAOs estão localizados especificamente nos fotossistemas I e II (ASADA, 2006).

O cádmio (Cd) é um dos elementos traço mais tóxicos no solo, inibindo o crescimento e desenvolvimento de plantas podendo levar à morte mesmo em baixas concentrações. Estudos demonstram que o Cd induz o acúmulo de espécies ativas de oxigênio (EAOs), resultando em peroxidação lipídica das membranas e levando ao colapso da clorofila nas plantas (XU et al., 2010). O dano celular causado por este metal deve-se em especial às alterações produzidas na funcionalidade das membranas celulares, seja pela indução de alterações na sua composição lipídica ou pela influência nas atividades enzimáticas associadas a elas (SANDALIO et al., 2001).

A manutenção do balanço das EAOs necessita da ação de diversas enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), além de moléculas não enzimáticas, como a prolina e a glutatona, as quais podem realizar a detoxificação de radicais livres diretamente (XU et al., 2010).

Este estudo utilizou plantas de cafeeiros (*Coffea arabica*) adultas em condições de produção para analisar a resposta antioxidante ao metal pesado Cd nas seguintes concentrações: 0 (controle), 15, 45 e 90g de Cd por planta.

A quantificação do metal em ramos e folhas mostrou que o Cd é transportado de forma bastante diferente para esta espécie. O Cd não acumulou em níveis detectáveis nas folhas, mas sim nos ramos. As plantas demonstraram estar sendo afetadas pelos efeitos do metal, que provavelmente estava agindo a um nível mais radicular. Em gramíneas o Cd é transportado das folhas para os ramos e se acumula nos grãos quando estes se formam (HARRIS; TAYLOR, 2001; GREGER; LOFSTEDT, 2004). No entanto, o transporte é limitado e pouco Cd se acumula nos grãos de arroz (LIU et al., 2007). Já em trabalho com *Phaseolus vulgaris*, Patel et al. (1980) mostraram que o acúmulo de Cd seguia exatamente o mesmo padrão observado aqui para as plantas de café.

Conforme observado para as plantas em janeiro de 2009 (Figura 2), aquelas que receberam a maior dose de Cd apresentaram sintomas de alta toxicidade após 1 ano de finalizada a última aplicação do metal. Os sintomas eram de murcha apical, indícios de clorose e morte de folhas, descendo pelo perfil das plantas. As plantas da dose 45g Cd/planta começaram a apresentar os mesmos sintomas após 6 meses da última aplicação. Dados os baixos níveis de Cd detectados nas folhas, cabe a pergunta do porque das plantas terem morrido. Isto pode estar relacionado com o tipo de ação do metal, sendo que neste caso o Cd deve afetar mais severamente mecanismos celulares. Curiosamente, o sintoma de murcha pode ser uma indicação de que o metal estaria afetando bastante as raízes. A ação do Cd sobre as raízes altera bruscamente seu desenvolvimento, limitando a absorção de água e nutrientes, e conseqüentemente, a sua translocação à parte aérea, podendo os sintomas citados acima serem um efeito indireto do Cd. Dados de colaboradores (Sara Adrián López de Andrade e Paulo Mazzafera – *Physiological responses of mycorrhized coffee to zinc and copper* – em preparação, previamente apresentado em ANDRADE et al., 2008) mostraram que café suporta altas doses de metais no solo em função da presença de micorrizas, as quais possuem a capacidade não só de reter metais como também proporcionar um melhor desenvolvimento na planta, de tal forma que ela passa a suportar maiores doses de metal em seus tecidos. Convém ainda mencionar que na maior parte das plantas analisadas o Cd parece ficar concentrado no sistema radicular sendo a quantidade que é translocada para outras partes da planta variável, mas ainda, a maior parte do Cd ficaria retida no sistema radicular (VITÓRIA et al., 2001; PEREIRA et al., 2002). Isso sugere que futuros estudos com esta espécie devam também focar em fitoquelatinas, pois não é possível no momento discutir o quanto do Cd que entrou no sistema ficou retido ou foi complexado pelas fitoquelatinas nas raízes.

Como a aplicação do metal foi dividida em 3 vezes (dezembro de 2007, fevereiro de 2008 e março de 2008), foram feitas duas coletas para as análises bioquímicas, em fevereiro de 2008 (tempo 1) com um terço da quantidade final de Cd e em abril de 2008 (tempo 2), correspondendo a um mês após a última aplicação.

Neste estudo as proteínas solúveis totais foram quantificadas em espectrofotômetro, e o perfil protéico analisado por SDS-PAGE. Embora a quantidade de proteínas não tenha sido significativamente diferente entre quaisquer dos tratamentos, a análise do gel apresentou redução de intensidade de algumas bandas para os tratamentos com Cd. Esta variação provavelmente está

relacionada ao estresse provocado pelo metal. Ainda, não pudemos observar claramente qualquer alteração maior que indicasse a indução ou repressão de qualquer banda protéica. É possível que na verdade isso ocorra e que o sistema SDS-PAGE não tenha sido suficiente para detectá-las. Uma análise por 2D-PAGE seria certamente mais poderosa para identificar tais alterações, assim como a coloração com prata permitisse a visualização de outras bandas de menor concentração que pudessem ter sido afetadas.

A alta produção de EAOs afeta diretamente os ácidos graxos poliinsaturados de membranas, desencadeando o processo de peroxidação lipídica. Esses ácidos graxos são degradados em uma grande variedade de produtos como aldeídos, porém, um dos mais intensivamente estudados é o malondialdeído (MDA) (CABISCOL et al., 2000). Segundo Georgieva (2005), a peroxidação de lipídeos é um dos melhores preditores do nível de EAOs induzidas em situações de estresse. A peroxidação da membrana celular afeta severamente sua funcionalidade tanto por oxidação de aminoácidos quanto afetando sua integridade e, pode produzir danos irreversíveis às funções celulares. O H_2O_2 , por exemplo, acumula-se em tecidos de plantas em que a atividade de enzimas antioxidantes como peroxidases, CATs e SODs esteja suprimida (SCANDALIOS, 2005).

Os resultados de peroxidação lipídica, a partir do tempo 2, mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) dos tratamentos com Cd em relação ao controle. Shi et al. (2010) apresentaram resultados similares para cártamo, com doses de 25, 50 e 100 mg Cd / kg em que, somente na dose intermediária, a quantidade de MDA não se alterou em relação ao controle. Em conformidade com dados visuais que indicaram severos danos às plantas na presença de Cd, confirmou-se que as concentrações utilizadas de $CdSO_4$ causaram peroxidação lipídica. Como a produção de MDA é considerada um marcador para a ocorrência do estresse oxidativo, pode-se afirmar que todas as plantas que receberam a concentração proposta do metal se mostraram em estado de estresse oxidativo.

Os metais pesados podem afetar o metabolismo de nitrogênio em diversas espécies de plantas. Hernández et al. (1995) mostraram que o Cd não só inibe a absorção e o transporte de nitrato, como também afeta a assimilação do nitrato, pela inibição da atividade da nitrato redutase. O tratamento com Cd pode resultar em um aumento de amônio endógeno através da desaminação de alguns aminoácidos livres e de outras formas de nitrogênio. Os aminoácidos sob condições de estresse podem ser acumulados em concentrações elevadas e podem contribuir para

a habilidade da cultivar tolerar o estresse devido à exposição ao metal pesado. De fato, muitos aminoácidos são considerados antioxidantes não enzimáticos participando do metabolismo oxidativo da célula. Além disso, as alterações observadas podem também estar correlacionadas a processos de oxidação de proteínas, proteólise ou mesmo incremento na biosíntese de aminoácidos para suprir demanda por síntese *de novo* de proteínas em resposta ao estresse.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima importante cuja atividade pode afetar a concentração celular de O_2 e H_2O_2 fazendo parte do primeiro ajuste de tolerância das plantas ao estresse oxidativo, porém o H_2O_2 , produto da ação dessa enzima, é também uma EAO e seu acúmulo é tão prejudicial quanto ao do superóxido (GRATÃO et al., 2005).

Na análise da atividade específica de SOD em gel não denaturante pode-se observar a presença de sete isoformas, embora já tenham sido descritas dez isoformas para cultura de células de café expostas a Se (GOMES-JUNIOR et al., 2007). A única isoforma que diferiu entre os controles e os tratamentos foi a isoforma IV no tempo 2, tendo reduzido sua atividade ou até mesmo sendo inibida com o tratamento. Na análise de expressão de SOD, alguns genes tiveram sua expressão reduzida em relação ao controle, e possivelmente podem estar relacionados com a inibição de bandas observada em PAGE não denaturante. Estes resultados também foram observados em cártamo por Shi et al. (2010), em que o tratamento com altas concentrações de Cd levou a um declínio na atividade de SOD. A caracterização destas isoformas revelou tratar-se de apenas MnSODs e FeSODs, resultados estes compatíveis com o apresentado por Gomes-Junior et al. (2007).

A atividade específica da CAT em espectrofotômetro foi aumentada em todos os tratamentos em relação ao controle no tempo 1. Porém, no tempo 2 o inverso foi observado, em que todos os tratamentos com Cd apresentaram diminuição da atividade quando comparados ao controle. A análise em PAGE não denaturante mostrou bandas de menor intensidade nos tratamentos em relação aos controles em ambos os tempos, e a indução de uma nova isoforma nos controles no tempo 2. Essa diminuição da atividade de CAT nos tratamentos com Cd no tempo 2 pode estar relacionada à diminuição da expressão de CAT1. Entretanto, em estudos com células de café em suspensão foi encontrada apenas uma isoforma de CAT, a qual aumentou de atividade em resposta ao Cd (GOMES-JUNIOR et al., 2006). Os dados sugerem que o excesso de Cd pode estar causando estresse oxidativo nas plantas, e que a catalase pode estar sendo compensada pela ação de outras peroxidases ou mesmo que essa enzima não seja a principal

responsável pela resposta antioxidativa em plantas de café nas condições, tecido e situações testadas.

A glutathione redutase (GR) apresentou atividade reduzida nos tratamentos com o metal quando comparados aos controles no tempo 2. Na análise de atividade em gel, assim como para a CAT nos controles no tempo 2 ocorreu o aparecimento de uma isoforma nos controles. Os dados obtidos por espectrofotômetro estão de acordo com o observado em PAGE e na expressão dos genes. A GR parece não responder com aumento de atividade em resposta a um potencial estado de estresse que claramente foi visualmente observado para o metal pesado Cd. Pode-se ainda inferir que alterações ao nível de raiz possam ter ocorrido e que afetam diretamente a ação da GR, principalmente pela utilização da glutathione (GSH) para a síntese de fitoquelatinas.

Apesar das alterações e padrões observados, novamente, observou-se uma redução de atividade de uma enzima antioxidante, neste caso a GR, para o Cd. É importante notar que em trabalhos com cultura de células em suspensão de café uma isoenzima específica de GR foi induzida por Ni, Cd e Se nas primeiras horas de tratamento, no entanto com plantas adultas e com tecido diferenciado apenas duas isoformas de GR foram observadas, ao contrário de trabalhos anteriores para células em suspensão quando até 4 isoenzimas foram identificadas (GOMES-JUNIOR et al., 2006a, 2006b, 2007).

As presentes observações sugerem que em determinadas concentrações de metais, a atividade de algumas enzimas pode aumentar, porém em concentrações mais elevadas, a atividade reduz drasticamente. De modo geral, as concentrações de Cd utilizadas foram tóxicas às plantas, levando à peroxidação lipídica e não permitindo que as enzimas antioxidantes se manifestassem eficazmente, acarretando mais tarde na morte das plantas. De outra forma, pode ser que a ineficiência dessas enzimas ou o excesso de Cd estejam além da capacidade de resposta destas enzimas. Não podemos ainda descartar o papel de outras enzimas antioxidantes no processo.

6 CONCLUSÃO

- 1 Não foram observadas diferenças significativas nas respostas entre as diferentes concentrações de Cd. Com exceção da peroxidação lipídica que foi maior em relação aos demais, nas plantas da dose de 90 g Cd/planta, nas quais o Cd causou a morte.
- 2 Do ponto de vista enzimático, principal foco dessa dissertação, o estresse oxidativo gerado pelo Cd resultou em uma atividade inicial pelas enzimas antioxidantes, que mais tarde, ao se atingir a concentração final proposta, reduziu drasticamente.
- 3 O estresse causado pelo Cd elevou as taxas de peroxidação lipídica, provavelmente devido às baixas atividades das enzimas, indicando que provavelmente a resposta pelas enzimas analisadas não tenha sido suficiente para combater o nível de estresse gerado.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.A.; VAN RAIJ, B.; ABREU, M.F.; GONZÁLEZ, A.P. Routine soil testing to monitor heavy metals and boron. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 564-571, 2005.

ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 1, p. 299-351, 2000.

ANDRADE, S.A.L.; MAZZAFERA, P.; SCHIAVINATO, M.A.; SILVEIRA, A.P. Arbuscular mycorrhiza and copper uptake and toxicity in coffee plants. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE DA INTERNATIONAL SCIENTIFIC ASSOCIATION ON COFFEE, 22., 2008, Campinas. 1 CD-ROM.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 544-549, 2000.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, p. 391-396, 2006.

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

BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, p. 689-694, 1998.

BARCELÓ, J.; VÁSQUES, M.D.; POSCHENRIEDER, C. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 108, p. 37-49, 1988.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series A, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

BAŤKOVÁ, P.; POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 52, n. 3, p. 413-422, 2008.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 17, p. 5-52, 2005.

BOUSSAMA, N.; OUARITI, O.; SUZUKI, A.; GHORBAL, M.H. Cd-stress on nitrogen assimilation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 310-317, 1999.

BOWLER, C.; VANCAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 13, p. 199-218, 1994.

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**, New York, v. 72, p. 248-259, Jan. 1976.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, Lleida, v. 3, p. 3-8, 2000.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 98, p. 1222-1227, 1992.

CAMARGO, A.P. de; CAMARGO, M.B.P. de. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, 2001.

CHAOU, A.; MAZHOUDI, S.; GHORGBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Limerick, v. 127, p. 139-147, 1997.

CHAVES FILHO, J.T. Novos paradigmas na cultura do cafeeiro. **Documentos IAC**, Campinas, n. 80, p. 67-74, 2007.

CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 16, p. 49-252, 1995.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, London, v. 98, p. 29-36, 1997.

DONAHUE, J.L.; OKPODU, C.M.; CRAMER, C.L.; GRABAU, E.A.; ALSCHER, R.G. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 113, p. 249-257, 1997.

FÄSSLER, E.; ROBINSON, B.H.; GUPTA, S.K.; SHULIN, R. Uptake and allocation of plant nutrients and Cd in maize, sunflower and tobacco growing on contaminated soil and the effect of soil conditioners under field conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 87, p. 339-352, 2010.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, p. 696-717, 1997.

FRANCO, E.; MIGLIORANZA, E.; FONSECA, E.P. High metal contents in coffee plant organs developed in tubets with different proportions of biosolid composts and carbonized rice hulls. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 503-510, 2004.

FROHMANN, M.A.; DUSH, M.K.; MARTIN, G.R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts by amplification using a single genetic specific oligonucleotide primer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 85, p. 8998-9002, 1988.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; MCCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.). **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, p. 327-336, 1996.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems**, Florença, v. 143, n. 1, p. 81-96, Mar. 2009.

GEORGIEVA, N.V. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2005.

GINDEL, I. Ecological behaviour of the coffee plant under semi-arid conditions. **Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles**, The Hague, v. 8, p. 329-362, 1961.

GOMES-JUNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34, p. 449-456, 2007.

GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.; DELITE F.S.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, p. 420-429, 2006a.

GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.; GRATAO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, Nov. 2006b.

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**, Victoria, v. 32, p.481-494, Jun. 2005.

GREGER, M.; LOFSTEDT, M. Comparison of uptake and distribution of cadmium in different cultivars of bread and durum wheat. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 501-507, 2004.

HARRIS, N.S.; TAYLOR, G.J. Remobilization of cadmium in maturing shoots of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1473-1481, 2001.

- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.
- HERNÁNDEZ, J.A.; OLMOS, E.; CORPAS, F.J.; SEVILLA, F.; DEL RÍO, L.A. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. **Plant Science**, Limerick, v. 105, p. 151-167, 1995.
- HUXLEY, P.A.; PATEL, R.Z.; KABAARA, A.M.; MITCHELL, H.W. Tracer studies with ³²P on the distribution of functional roots of Arabica coffee in Kenya. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 77, p. 159-180, 1974.
- KASHEM, A.; KAWAI, S.; KIKUCHI, N.; TAKAHASHI, H.; SUGAWARA, R.; SINGH, BR. Effect of Iherzolite on chemical fractions of Cd and Zn and their uptake by plants in contaminated soil. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 207, p. 241-251, 2010.
- KRAUS, T.E.; EVANS, R.C.; FLETCHER, R.A.; PAUL, S.K.P. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 797-806, June 1995.
- LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 200, p. 241-250, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Paris, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber; in gel enzyme activity assays. **Plant Sciences**, Chicago, v. 159, p. 75-85, Oct. 2000.
- LIU, J.G.; QIAN, M.; CAI, G.L.; YANG, J.C.; ZHU, Q.S. Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 143, p. 443-447, 2007.
- LOZANO-RODRIGUEZ, E.; HERNÁNDEZ, L.E.; BONAY, P.; CARPENA-RUIZ, R.O. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 123-128, 1997.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Produquímica, 1994. 153 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.
- MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MARTINS, D.R.; CAMARGO, O.A.; BATAGLIA, O.C. Qualidade do grão e da bebida em cafeeiros tratados com lodo de esgoto. **Bragantia**, Campinas, v. 64, p. 115-126, 2005.

MAZZAFERA, P. Growth and biochemical alterations in coffee due to selenite toxicity. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, p. 189-196, 1998.

MELO, G.A.; MAZZAFERA, P. Control of chlorogenic acid formation in leaves and endosperm of coffee fruit of *Coffea arabica*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore. **Proceedings...** Paris: Association Scientifique Internationale du Café, 2004.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E. Uso de resíduos sólidos urbanos na agricultura e impactos ambientais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBCS, 1997. p. 1-28.

MENCH, M.; MARTIN, E.; SOLTA, P. After effects of metals derived from a highly metalpolluted sludge on maize (*Zea mays* L.). **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 75, p. 277-291, 1994.

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

MOCQUOT, B.; VANGRONVELD, J.; CLIJSTERS, H.; MENCH, M. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. **Plant and Soil**, The Hague, v. 182, p. 287-300, 1996.

NASCIMENTO, C.W.A.; PEREIRA, J.B.M. Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 1303-1308, 1997.

NAWROT, T.S.; HECKE, E.V.; THIJS, L.; RICHART, T.; KUZNETSOVA, T.; JIN, Y.; VANGROSVELD, J.; ROELS, H.A.; STAESSEN, J.A. Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. **Environment Health Perspectives**, North Carolina, v. 116, p. 1620-1628, 2008.

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

PANDHAIR, V.; SEKHON, B.S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 15, p. 71-78, 2006.

PATEL, P.M.; WALLACE, A.; HARTSOCK, T.; ROMNEY, E.M. Zinc, nickel, and cadmium uptake and translocation to seed pods and their effects on gas exchange rates of bush bean plants grown in calcareous soil from the Northern Mojave Desert. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 2, p. 67-72, 1980.

PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T. Toxidez de Metais em plantas II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 323-328, 1982.

PEREIRA, G.J.G.; MOLINA, S.M.G.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 239, p. 123-132, 2002.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, p. 525-545, 1995.

RIBEIRO, D.M.; CAMARGO, O.A.; BATAGLIA, O.C. Qualidade do grão e da bebida em cafeeiros tratados com lodo de esgoto. **Bragantia**, Campinas, v. 64, p. 115-126, 2005.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: BURDON, R.H.; VAN KNIPPENBERG, P.H. (Ed.). **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 22.

SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I.J.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 109, p. 1427-1433, 1995.

SANDALIO, L.M.; DALURSO, H.C.; GÓMEZ, M; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RIO, L.A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, 2001.

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

_____. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 101, p. 7-12, 1993.

_____. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, Jul. 2005.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 39-44, 1999.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SHI, G.; LIU, C.; CAI, Q.; LIU, Q.; HOU, C. Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 85, p. 256-263, July 2010.

SMIRI, M.; CHAOUI, B.; FERJANI, E.E. Respiratory metabolism in the embryonic axis of germinating pea seed exposed to cadmium. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 166, p. 259-269, 2009.

TARCHOUNE, I.; SGHERRI, C.; IZZO, R.; LACHAAL, M.; OUERGHI, Z.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 772-777, 2010.

TOLEDO FILHO, J.A.; THOMAZIELLO, R.A.; OLIVEIRA, E.G.; COSTA, T.E. Cultura do café. **Boletim Técnico CATI**, Campinas, n. 193, p. 1-103, 2002.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 701-710, 2001.

XU, J.; YIN, X.; LIU, X.; LI, X. Salt affects plant Cd-stress responses by modulating growth and Cd accumulation. **Planta**, Berlin, v. 231, p. 449-459, 2010.