

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Resposta antioxidativa de células *in vitro* de café (*Coffea arabica*) submetidas
aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni)**

Rui Alberto Gomes Junior

**Tese apresentada para obtenção do título de doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2006**

Rui Alberto Gomes Junior
Engenheiro Agrônomo

Resposta antioxidativa de células *in vitro* de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni)

Orientador:
Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2006

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

Gomes Junior, Rui Alberto

Resposta antioxidativa de células *in vitro* de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni) / Rui Alberto Gomes Junior. - - Piracicaba, 2006.

134 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Cádmio 2. Café 3. Fitotoxicidade 4. Metal pesado 5. Níquel 6. Peroxidação
lípidica 7. Peroxidase 8. Suspensão celular I. Título

CDD 633.73

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

Dedico a minha esposa Ana Cristina Perez Gomes

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela orientação;

Aos membros da banca, Prof. Dr. Paulo Mazzafera, Profa. Dra. Elis Eleutherio, Profa. Dra. Silvia Maria Guerra Molina, Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais e Prof. Victor Vitorello;

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera, pela concessão de células de café estabelecidas e apoio com o desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Isaias Olívio Geraldi pela supervisão em monitoria, além de outras importantes participações no meu processo de doutoramento;

Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira pela concessão de um equipamento, que permitiu desenvolver esta tese no Departamento de Genética;

Aos professores do Departamento de Genética: Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, Prof. Dr. Antonio Augusto Domingos Coelho, Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia, Prof. Dr. Claudio Lopes Souza Junior, Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey, Prof. Dr. Gerhard Bandel, Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier Oliveira, Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, Profa. Dra. Margarida Lopes Rodrigues de Aguiar-Perecin, Prof. Dr. Natal Antonio Vello, Prof. Dr. Roland Vencovsky, Profa. Dra. Silvia Maria Guerra Molina, Prof. Dr. Vicente José Maria Savino, pelos conhecimentos necessários para a conclusão da tese e minha formação profissional, transmitidos durante o decorrer do meu processo de pós-graduação, através de disciplinas, palestras e consultas pessoais;

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial a Cândida Vanderléia de Oliveira, Maidia Maria Thomaziello, Fernando Leopoldino, Neusa Maria Sarto Rocha, Valdir Próspero, Antonio de Pádua Gorga (Berdan), Carlos Roberto Macedônio, Nivaldo Laerte Pivetta, Antonio Marques Silveira Benedito, Edson Soares, Carmo Jose Bueno de Campos, Rudinei de Jesus Graciani, Carlos Alberto de Oliveira, José Antonio da Silva e Maria da Glória Eloi da Silva, pelo apoio e amizade;

Ao Dr. Esteban Gonzalez, Prof. Dr. Leandro Aguiar, Prof. Dr. Euripedes Malavolta, Prof. Dr. Paulo Sodek, Dr. Oscar Fontão, Dra. Salete Aparecida Gaziola, Dr. Guilherme J. G. Pereira, Dr. Renato Rodrigues Ferreira e Dr. Ricardo Francisco Fornazier pelas instruções e apoio dados;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, Priscila, Vanderlei, Fabrício, Yolanda, Andréia, Cileide, Alejandro, Rafael, Bertha, Ariane, José, Carol, Marina, Marston, Geórgia e Liliane, pelo convívio e apoio;

A todos os amigos, em especial a Luis Carlos Timm, Angelica Mendes, Esteban Gonzalez, Luciana Ruggiero, Carlos Moldes, Soraia, Salete Gaziola, Joubert Gatto, João André, Leonardo Baptista, Marcel Froes, Ana Claudia Perez, Cassio Marcolin, Francisco Farias, Jenifer Moura, Marcela Barbosa, Tito, Denise Pimenta, Regina Medeiros, Raul Medeiros, Jacira Medeiros, Vera, Marcos Frasson, Roberta Castro, Raqueline Cordeiro, Ricardo, Carina Martins, Moacir Emmer, Thaise Santanna, Alessandro Gordilo, Emiliano Nassau, Steve Picoli, Rogerio Barenho, Juliano Pinheiro, Tassiano, Leandro Aguiar, Liliane, Gianfranco Perazollo, Simão de Souza, Katia Medeiros, Patricia Cardoso, Alexander de Andrade, Daniela Sanjuan, Jeferson, Jocelito, Adriana, Dyeme, Matheus, Felipe Vidal, Juliano, Marcelo Hartwig, Ana Lucia Sangalli, Bianca, Diego, Thomaz, Bruna, Cristiane, Simone, Tatiane, Cristian, Adriane, Rosana, Sérgio, Landa e Adriano, por tudo que a amizade proporciona;

Aos meus sogros Nilo Perez e Terezinha Alves Perez, pelo carinho e apoio;

Aos meus pais Rui Gomes e Renita Gomes, irmãos Luciane Gomes e Thomaz Gomes e sobrinhos Mateus e João;

Aos meus tios, Valter, Edi, Hulda, Guido, Marlei, Zuleica, Odilo, Flávia, Nilza, Valmor e Lauro;

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Departamento de Genética – ESALQ, pela formação profissional e realização pessoal;

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Poluição ambiental	13
1.2 Fitotoxicidade dos metais pesados	16
1.3 Estresse Oxidativo	17
1.4 Resposta das plantas ao estresse	23
1.5 Mecanismos de defesa antioxidante	24
1.5.1. Sistema antioxidante não enzimático	25
1.5.2 Sistema antioxidante enzimático	29
1.5.2.1. Superóxido dismutase (SOD)	33
1.5.2.2 Catalase (CAT)	37
1.5.2.3 Ascorbato peroxidase (APX)	39
1.5.2.4 Glutathione redutase (GR)	42
1.5.2.5 Guaiacol peroxidase (GOPX)	43
1.6 Aspectos gerais da espécie <i>Coffea Arabica</i> e da cv. Catuaí Vermelho	44
1.7 Suspensão celular como modelo de estudo	45
Referências	47
2 METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE CULTURAS DE CÉLULAS DE CAFÉ EM SUSPENSÃO EM RESPOSTA AO CÁDMIO (Cd)	72
Resumo	72
Abstract	73
2.1 Introdução	74
2.2 Resultados	76
2.2.1 Efeito do CdCl ₂ no crescimento celular, acúmulo de Cd nas células e indução do estresse oxidativo	76
2.2.2 Atividade da SOD	78
2.2.3 Atividade da CAT	79
2.2.4 Atividade da GR	79

2.2.5 Atividade da APX	81
2.2.6 Atividade da GOPX	81
2.3 Discussão	83
2.4. Material e métodos	89
2.4.1 Precultura das células de café	89
2.4.2 Tratamento das células	89
2.4.3 Crescimento celular	90
2.4.4 Acúmulo de Cd	90
2.4.5 Peroxidação lipídica	90
2.4.6 Extração enzimática	91
2.4.7 Ensaio da CAT	91
2.4.8 Ensaio da GR	91
2.4.9 Ensaio da APX	92
2.4.10 Ensaio da GOPX	92
2.4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	92
2.4.12 Revelação para atividade da GR	93
2.4.13 Revelação para atividade da CAT	93
2.4.14 Revelação para atividade da SOD	93
2.4.15 Determinação da concentração de proteína	94
2.4.16 Delineamento experimental	94
Referências	95
3 O NÍQUEL PROVOCA UMA RESPOSTA ANTIOXIDANTE RÁPIDA EM CÉLULAS DE <i>Coffea arabica</i>	104
Resumo	104
Abstract	105
3.1 Introdução	106
3.2 Resultados	108
3.2.1 Crescimento celular, acúmulo de Ni e indução de estresse oxidativo	108
3.2.2 Atividade da SOD	110
3.2.3 Atividade da CAT	111
3.2.4 Atividade da GR	111

3.2.5 Atividade da APX	113
3.2.6 Atividade da GOPX	113
3.3. Discussão	115
3.4. Material e Métodos	123
3.4.1 Suspensão celular	123
3.4.2 Tratamento das células e crescimento celular	123
3.4.3 Acúmulo de Ni	124
3.4.4 Peroxidação lipídica	124
3.4.5 Extração enzimática	124
3.4.6 Ensaio da CAT	125
3.4.7 Ensaio da GR	125
3.4.8 Ensaio da APX	125
3.4.9 Ensaio da GOPX	125
3.4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	126
3.4.11 Revelação da atividade da SOD	126
3.4.12 Revelação da atividade da CAT	127
3.4.13 Revelação da atividade da GR	127
3.4.14 Determinação da concentração de proteínas	127
3.4.15 Delineamento experimental	127
Referências	128

RESUMO

Resposta antioxidativa de células *in vitro* de café (*Coffea arabica*) submetidas aos metais pesados cádmio (Cd) e níquel (Ni)

Foi investigada a resposta antioxidante de culturas em suspensão celular de café (*Coffea arabica* L.) ao cádmio (Cd) e níquel (Ni). As células de café foram tratadas por doze dias com zero (controle), 0,05 e 0,5 mM de NiCl₂ ou CdCl₂. O Cd e o Ni acumularam rapidamente nas células e este acúmulo foi diretamente correlacionado com o aumento na concentração de metal no meio externo. Em 0,05 mM CdCl₂ e 0,05 mM NiCl₂, o crescimento foi estimulado, mas em 0,5 mM CdCl₂ e 0,5 mM NiCl₂ a taxa de crescimento foi reduzida. As alterações no metabolismo do oxigênio ativo foram detectadas pela análise visual, assim como pelo aumento na peroxidação lipídica, nos tratamentos com 0,5 mM CdCl₂ e 0,5 mM NiCl₂. As atividades das enzimas catalase (CAT; EC 1.11.1.6), glutathione redutase (GR; EC 1.6.4.2) e superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) aumentaram após exposição ao Cd, particularmente na maior concentração de CdCl₂. A atividade da ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) foi elevada por 0,05 mM CdCl₂, mas não pode ser detectada em células cultivadas na maior concentração de CdCl₂ após 24 h de cultivo, enquanto que a guaiacol peroxidase (GOPX; EC 1.11.1.7) não demonstrou um padrão claro de resposta ao tratamento com Cd. As atividades das enzimas CAT, GR, APX, GOPX e SOD foram aumentadas, particularmente nos períodos iniciais de exposição ao NiCl₂ e as atividades foram maiores na dosagem 0,5 mM NiCl₂, na maioria dos tempos de exposição testados. A análise em PAGE não desnaturante seguido pela revelação da atividade enzimática, apresentou uma isoenzima da CAT, nove isoenzimas da SOD e quatro isoenzimas da GR. As isoenzimas da SOD foram diferencialmente afetadas pelo tratamento com CdCl₂ e NiCl₂ e uma isoenzima da GR mostrou responder especificamente ao CdCl₂ e ao NiCl₂. Os resultados sugerem que 0,5 mM CdCl₂ e 0,5 mM NiCl₂ podem levar ao estresse oxidativo. O CdCl₂ e o NiCl₂ a 0,05 mM não induziram peroxidação lipídica e a principal resposta aparenta ser via indução das atividades das enzimas SOD, CAT e APX nas células tratadas com Cd e das enzimas SOD, CAT, GOPX e APX nas células tratadas com Ni, para a remoção das espécies ativas de oxigênio (EAOs), e pela indução da GR para garantir a disponibilidade de glutathione reduzida. A síntese de peptídeos de ligação ao Cd, deve também estar relacionada com a inibição da atividade da APX, provavelmente devido ao esgotamento da glutathione e ascorbato na maior concentração de CdCl₂.

Palavras-chave: *Coffea arabica*; café; estresse oxidativo; peroxidação lipídica; enzimas antioxidantes; cádmio; níquel; catalase; glutathione redutase; superóxido dismutase; guaiacol peroxidase; ascorbato peroxidase.

ABSTRACT

Antioxidant response of coffee (*Coffea arabica*) cells to cadmium (Cd) and nickel (Ni) stress

The antioxidant responses of coffee (*Coffea arabica* L.) cell suspension cultures to cadmium (Cd) and nickel (Ni) were investigated. Coffee cells were treated for twelve days with 0 (control), 0.05 and 0.5 mM NiCl₂ or CdCl₂. Cd and Ni accumulated very rapidly in the cells and this accumulation was directly correlated with an increase in applied metal concentration in the external medium. At 0.05 mM CdCl₂ and 0.05 mM NiCl₂, growth was stimulated, but at 0.5 mM CdCl₂ and 0.5 mM NiCl₂ the growth rate was reduced. An alteration in activated oxygen metabolism was detected by visual analysis as well as by an increase in lipid peroxidation at 0.5 mM CdCl₂ and 0.5 mM NiCl₂. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6), glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) and superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity increased after Cd exposure, particularly at the higher concentration of CdCl₂. Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) activity was higher at the lower CdCl₂ concentration used, but could not be detected in cells growing in the higher CdCl₂ concentration after 24 h of growth, whilst guaiacol peroxidase (GOPX; EC 1.11.1.7) did not show a clear response to Cd treatment. CAT, GR, APX, GOPX and SOD activities were increased due to Ni treatment, particularly at earlier NiCl₂ exposure times and the activities were higher at 0.5 mM NiCl₂ for most of exposure times tested. An analysis by non-denaturing PAGE followed by staining for enzyme activity, revealed one CAT isoenzyme, nine SOD isoenzymes and four GR isoenzymes. The SOD isoenzymes were differently affected by CdCl₂ and NiCl₂ treatment and one GR isoenzyme was shown to specifically respond to CdCl₂ and NiCl₂. The results suggest that the higher concentrations of CdCl₂ and NiCl₂ may lead to oxidative stress. CdCl₂ and NiCl₂ at 0.05 mM did not induce lipid peroxidation and the main response appeared to be via the induction of SOD, CAT and APX activities in Cd treated cells and SOD, CAT, GOPX and APX activities in Ni treated cells, for the removal of reactive oxygen species (ROS), and by the induction of GR to ensure the availability of reduced glutathione. The synthesis of Cd-binding proteins may also be related to the inhibition of APX activity probably due to glutathione and ascorbate depletion at higher CdCl₂ concentration.

Keywords: *Coffea arabica*; coffee; oxidative stress, lipid peroxidation; antioxidant enzymes; cadmium; nickel; catalase; glutathione reductase; superoxide dismutase; guaiacol peroxidase; ascorbate peroxidase.

1 INTRODUÇÃO

Os metais pesados representam o maior contaminante industrial de solos, plantas e animais no ecossistema, com intensos efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos associados à sua ampla liberação no ambiente, devido às atividades antropogênicas atuais. Isto tem causado grande preocupação, devido ao acúmulo destes metais em plantas cultivadas, levando a perda na produção agrícola e podendo afetar a cadeia alimentar de animais e do homem, dependendo da concentração ingerida (SALT et al. 1995). A entrada destes na cadeia alimentar de animais e do homem tem início principalmente através de sua bioacumulação nas plantas (GHOSHROY et al., 1998).

Diferente dos animais, as plantas são sedentárias e são vulneráveis a variação na concentração de metais. Todavia, as plantas devem se adaptar as condições impostas para sua sobrevivência, resultando na aquisição de uma ampla gama de mecanismos de tolerância a metais, com variação genotípica tanto entre as espécies quanto dentro das espécies e ao tipo de metal. Devido a isto, tem ocorrido um aumento significativo em pesquisas relacionadas a contaminação de metais pesados no ambiente e seus efeitos sobre as plantas. Entretanto, são relativamente poucos os trabalhos publicados sobre o efeito tóxico desses elementos em cafeeiros (MAZZAFERA, 1998).

Neste trabalho foram estudados dois metais, cádmio (Cd) e níquel (Ni). Estes dois metais foram escolhidos em função de sua importância toxicológica e de seu comportamento químico diferenciado. Estes metais diferem quanto a sua afinidade por vários quelantes bem como possíveis mecanismos de indução de estresse oxidativo (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996; COBBETT, 2000; PERALTA-VIDEA et al., 2002).

É de se esperar que as propriedades químicas de cada metal determinem mecanismos diferentes de estresse oxidativo e de resposta à exposição ao mesmo, conforme demonstrado por Cuypers; Vangronsveld e Clijsters (1999). Por ser elemento de transição, o Ni pode participar de reações de Haber-Weiss (BRIAT; LEBRUN, 1999), gerando radicais livres diretamente. Dos dois, é o único que possui diferentes estados de oxidação. O Cd possui apenas um estado de oxidação (2^+) e não é elemento de transição (embora o Cd seja freqüentemente tratado como tal), pelo menos quanto ao critério de ter um elétron não pareado no seu orbital de valência. Estas propriedades influenciam o mecanismo com o qual cada metal gera estresse oxidativo. Além disto, nenhum deles é cofator de enzimas antioxidantes, como é o caso de Fe, Mn, Cu e Zn.

Os metais pesados Cd e Ni são elementos que podem causar sérios danos ao metabolismo celular, incluindo o estresse oxidativo, devido à intensificação na produção de espécies ativas de oxigênio. Plantas expostas aos metais pesados apresentam alterações nas atividades de enzimas antioxidantes. Portanto, o estudo dessas alterações pode fornecer dados importantes relativos aos níveis de tolerância, especificidade da resposta e níveis dos metais no meio. Todavia, o estresse de Cd e Ni não podem ser entendidos sem os processos integrados envolvendo outros ciclos e cadeias metabólicas.

Este trabalho envolve o estudo detalhado da resposta antioxidativa de células de café em suspensão submetidas aos tratamentos com os metais pesados Cd e Ni, pela análise da peroxidação lipídica, através da quantificação das TBARS, que é um índice do estresse oxidativo, e pelas atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GOPX), que estão entre as principais do sistema de defesa antioxidante enzimático. Os sistemas antioxidantes tem a capacidade de interromper as cascatas de oxidação descontrolada. Além disso, foi avaliado o efeito destes metais pesados sobre o crescimento celular, assim como o estudo dos sintomas visuais decorrentes da toxidez dos metais às células de café.

Considerando a utilização de células de café em suspensão como modelo de estudo, o objetivo deste trabalho foi obter informações em relação às concentrações desses metais, o nível de estresse oxidativo causado e as respostas das enzimas antioxidantes testadas, de forma a caracterizar a relação entre ambos, para que eventualmente estas informações sejam utilizadas tanto ao nível de compreensão da resposta antioxidante a metais, como para a elaboração de estratégias para manipulação genética ou programas de melhoramento, objetivando a obtenção de plantas que proporcionem uma maior segurança alimentar e que não sofram quedas na produtividade devido à toxidez destes metais. Além disso, foi considerado o uso benéfico destes metais, em cultura de tecidos de plantas, de forma a elevar a eficiência de sistemas de cultivo de células.

1.1 Poluição ambiental

A poluição ambiental tem se tornado um problema sério em todo o mundo, de forma que diferentes poluentes apresentam-se em áreas distintas, de acordo com características industriais e as atividades humanas desenvolvidas.

Atualmente existe uma grande preocupação com relação aos efeitos a curto e longo prazo que muitos poluentes químicos possam ter sobre a saúde pública e o meio ambiente, pois a crescente industrialização das últimas décadas tem exposto animais e vegetais a muitos elementos químicos potencialmente tóxicos. Entre estes, os metais pesados representam o maior contaminante industrial de solos, corpos de água, plantas e animais no ecossistema (GHOSHROY et al., 1998), de tal forma que o estudo da toxidez de metais pesados em plantas e microrganismos vem atraindo a atenção de muitos cientistas.

O termo “metal pesado” é aplicado a um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semimetais e não metais (MELO; DOS SANTOS; RAMALHO, 1997), que possuem número atômico maior que 20 ou peso específico maior que 5 g.cm^{-3} (MALAVOLTA, 1994). Alguns deles são nutrientes essenciais aos vegetais, como o Cu, Fe, Mn, Ni, Mo e Zn, outros são benéficos ao crescimento das plantas, como o Co, e outros não são essenciais ou não apresentam função, caso do Al, Cd, Cr, Se, Hg e Pb (MELO; DOS SANTOS; RAMALHO, 1997). São também conhecidos por “elementos traços” ou ainda “metais traços”, por serem naturalmente encontrados em concentrações de poucas partes por milhão (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994).

A importância de se estudar estes metais, deve-se aos seus intensos efeitos tóxicos ao homem e outros seres vivos, associados à sua ampla liberação no ambiente. Com o aumento nas atividades industriais, a poluição do ambiente com metais pesados tóxicos tem ocorrido em todo o mundo (DÖNMEZ; AKSU, 1999), levando à deterioração de alguns ecossistemas (VEGLIO; BEOLCHINI, 1997). Para ilustrar a importância da poluição por metais no ambiente, pode-se citar que dentre as 20 substâncias tóxicas com maior risco de causar danos aos seres humanos, em locais contaminados, conforme levantamento realizado pela ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) e EPA (Environmental Protection Agency) do governo dos Estados Unidos da América (E.U.A.), cinco são metais, incluindo os três primeiros lugares da lista (ASTDR, 1997 e 1999).

O acúmulo de Cd em determinados tecidos da planta pode levar a uma rejeição comercial de certos cultivares (VÖGELLI-LANGE; WAGNER, 1996; YANG et al., 2004), além de se tornar perigoso à saúde humana (WAGNER, 1993). Rauser (1995) relata que mais de 70% do Cd absorvido pelo homem tem origem na ingestão de vegetais. Desta forma, as plantas constituem-se o principal ponto de ligação entre metais pesados e o homem, via cadeia alimentar (GALLI; SCHUEPP; BRUNOLD, 1996), tornando-se necessário o estudo do efeito dos metais pesados em plantas. Sabe-se que em animais a exposição prolongada ao Cd provoca distúrbios renais, enfisemas pulmonares, desmineralização óssea, destruição dos eritrócitos e câncer (GHOSHROY et al., 1998). Este metal pode se acumular no corpo humano por um período superior a 10 anos (SALT et al., 1995).

Em animais e humanos, o Ni danifica os vasos do músculo cardíaco, rins e sistema nervoso central, reduz a imunocapacidade do organismo animal (POULIK, 1997), causa danos ao DNA devido a inibição do reparo do DNA (LYNN et al., 1997) e pode levar a morte celular (CHEN; WANG; LIN, 2003). O Ni também induz a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (CHEN; WANG; LIN, 1998), que é envolvido nos mecanismos moleculares da toxidez e carcinogenicidade do Ni em animais (CHEN; WANG; LIN, 2003).

No Brasil, o monitoramento dos diferentes poluentes ainda é extremamente limitado a áreas metropolitanas e aos principais sistemas hídricos, não existindo um levantamento abrangente ou estimativas confiáveis do grau do problema da contaminação por metais pesados. No entanto, em função do modelo de crescimento industrial, bem como do tipo de indústrias instaladas no país, principalmente no estado de São Paulo, não há motivos para se supor que o problema seja menor do que em países industrializados. Além disto, existem diversos estudos localizados ou regionais que demonstram que a contaminação por metais é um problema sério em algumas regiões, como é o caso do estuário de Santos/São Vicente no estado de São Paulo (SP) e as baías de Guanabara e de Sepetiba no estado do Rio de Janeiro (RJ) (AMADO FILHO et al., 1999; CARVALHO; LACERDA, 1991; NETO; SMITH; MCALLISTER, 2000; PERIN et al., 1997).

Talvez o único levantamento mais sistemático e abrangente de contaminação por metais seja o monitoramento que a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) realiza nas águas superficiais do estado de São Paulo, mas faltavam informações sobre o problema de contaminação de solos. Neste sentido, a CETESB recentemente realizou um estudo

para determinar valores orientadores quanto à contaminação de poluentes no solo e declarou-se a intenção de se realizar levantamentos sistemáticos (CASARINI et al., 2001). De qualquer modo, a preocupação da CETESB com metais pesados é evidente. Nesse último estudo, das 37 substâncias estudadas, 18 são metais pesados. Além disto, dos 27 parâmetros químicos usados pela CETESB para avaliar a qualidade de águas superficiais do estado, 11 se referem à análise de metais pesados. Os níveis de Cd e Ni no ambiente estão extremamente elevados de acordo com dados da CETESB e vários eventos de contaminação também aconteceram recentemente no Brasil (CETESB, 2005). Entretanto, o estudo relacionado a esta tese não visou aspectos de monitoramento ou controle.

Quantidades naturais de metais pesados no ambiente são geralmente baixas, porém atividades antropogênicas podem aumentar drasticamente estes níveis. As principais fontes de poluição com metais pesados são as diversas atividades de metalurgia, incluindo a mineração, fundição e galvanoplastia (CHAOUI et al., 1997), curtumes (JORDÃO et al., 1999), gases liberados pela queima de combustíveis fósseis, pesticidas (GIMENO-GRACÍA; ANDREU; BOLUDA, 1996; LAGRIFFOUL et al., 1998), utilização de lodo de esgoto para fertilização na agricultura (CHAOUI et al., 1997), aplicação de fertilizantes com impurezas (CHEN; KAO, 1995; GALLI; SCHUEPP; BRUNOLD, 1996; IRETSKAYA; CHIEN; MENON, 1998; SCHICKLER; CASPI, 1999) e a fabricação e descarte de baterias (PRASAD, 1995; KEFALA; ZOUBOULIS; MATIS, 1999).

Os metais pesados liberados no ambiente terrestre tendem a se concentrar no solo e sedimentos, que passam a se tornar um grande reservatório disponível para as raízes das plantas, que são muito vulneráveis a variação de concentrações destes elementos. Em ambientes aquáticos estes elementos se disponibilizam tanto para as raízes quanto para a parte aérea (PRASAD, 1995). A disponibilidade desses elementos 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; DOS SANTOS; RAMALHO, 1997), ressaltando a vantagem de se utilizar suspensão celular como modelo de estudo.

1.2 Fitotoxidez dos metais pesados

O efeito danoso dos diferentes tipos de poluentes tem sido estudado com muita atenção nos últimos anos. No entanto, estes estudos com plantas concentram-se principalmente no efeito no crescimento e na produção. A análise detalhada de aspectos fisiológicos e bioquímicos ainda demanda muita investigação. Em plantas, a presença do Cd e do Ni pode diminuir o crescimento, reduzir a taxa de fotossíntese e provocar alterações tanto nas atividades enzimáticas quanto metabólicas (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996; COBBETT, 2000; PERALTA-VIDEA et al., 2002).

O Cd é o principal contaminante ambiental e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (CHEN; KAO, 1995). Este elemento químico pertence ao grupo II-B da tabela periódica, juntamente com o Zinco (Zn) e o Mercúrio (Hg) (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). Na planta, o Cd pode provocar alterações nas funções dos estômatos, transporte de elétrons, Ciclo de Calvin e desordens na estrutura dos grana e na síntese de clorofila (BARCELO; VASQUES; POSCHENRIEDER, 1988). O Cd também afeta a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (KESSELER; BRAND, 1995). O Cd pode causar inibição da divisão celular e alterações nos cromossomos (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997; SOBKOWIAK; DECKERT, 2003). Este metal também pode se ligar a grupos sulfidríla (SH) de enzimas, inibindo sua atividade (LAGRIFFOUL et al., 1998).

Outro contaminante ambiental de plantas e animais é o Ni que pertence ao grupo VIII da tabela periódica, juntamente com Ferro e Cobalto (MATTIAZZO-PREZOTTO, 1994). Em altas concentrações, este elemento gera efeitos tóxicos na plantas, sendo que os sintomas mais comuns são clorose, inibição da fotossíntese e respiração (SCHICKLER; CASPI, 1999), redução da biomassa e da produção de sementes (MALAN; FARRANT, 1998). Outros sintomas da fitotoxidez do Ni incluem a danificação do sistema radicular, diminuição da atividade respiratória, distúrbios da divisão celular, diminuição do teor de ferro, zinco e manganês nas folhas (PALACIOS et al., 1998) e interferência na absorção de nutrientes (YANG, 1996). Este metal possui alta mobilidade no vegetal, encontrando-se altos níveis em todos os tecidos de plantas tratadas com o metal, principalmente nas sementes (MALAN; FARRANT, 1998). Pesquisas em plantas mostraram que o Ni é capaz de inibir um grande número de enzimas, como as do Ciclo de Calvin, biossíntese de clorofila, metabolismo de nitrogênio, glicólise e assimilação

de sulfato (BOUSSAMA et al., 1999). Entretanto, os mecanismos que governam a toxidez do Ni, ainda não estão bem esclarecidos (SCHICKLER; CASPI, 1999).

O Ni, apesar de ser um sério poluente ambiental (SAJWAN et al., 1996) e fitotóxico em altas concentrações (L'HUILLIER et al., 1996; PERALTA-VIDEA et al., 2002), é considerado menos tóxico a organismos vivos que o Cd. Alguns pesquisadores consideram o Ni um micronutriente essencial em certas espécies vegetais, especialmente quando cultivadas em meios com uréia (BROWN; WELCH; CARY, 1987), pois o Ni é constitutivo da enzima urease (WITTE et al., 2005), e sua deficiência leva a redução da atividade da urease em tecidos de soja, arroz e tabaco, levando a um acúmulo de excessivo de uréia, tornando-a fitotóxica (POLACCO, 1977). Já o Cd não apresenta função conhecida nos vegetais.

Apesar da Fitotoxidez dos metais pesados, um grupo de plantas denominadas hiperacumuladoras pode crescer em solos contendo metais pesados, sendo capazes de translocar o metal das raízes para a parte aérea, onde é acumulado, o que tem indicado um possível uso destas na fitorremediação de solos poluídos com metais pesados, através da retirada da parte aérea contendo o metal acumulado (ZHU et al., 1999a,b; KIDD; DÍEZ; MARTÍNEZ, 2004; SALT; SMITH; RASKIN, 1998).

1.3 Estresse Oxidativo

O acúmulo de oxigênio molecular (O_2) na atmosfera da Terra permitiu a evolução de organismos aeróbios que utilizam o O_2 comoceptor final de elétrons, permitindo então um maior ganho energético comparado com a fermentação e a respiração anaeróbica. No metabolismo aeróbico, o desdobramento de uma molécula de glicose produz um total de 28 moléculas de adenosina tri fosfato (ATP), enquanto que o desdobramento anaeróbico da glicose a etanol e CO_2 produz apenas 8 moléculas de ATP (FOYER; NOCTOR, 2000).

Em seu estado natural, o O_2 molecular é relativamente não reativo, mas a produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs) como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxil ($\bullet OH$) e oxigênio “singlet” (O_2^1), é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico (SCANDALIOS, 1993).

Em plantas, as EAOs podem ser produzidas em reações ocorridas na mitocôndria, cloroplastos e peroxissomos (FOYER; NOCTOR, 2000), em todos os órgãos, incluindo nódulos

fixadores de nitrogênio, com as EAOs sendo utilizadas como armas contra patógenos invasores na explosão oxidativa (MOLLER, 2001). Entretanto, pouco é conhecido sobre as propriedades de limpeza das EAOs do núcleo, que deve conter fatores de transcrição sensíveis ao estado redox (DELAUNAY; ISNARD; TOLEDANO, 2000).

Em geral, o $O_2^{\bullet-}$ pode surgir quando elétrons são mal direcionados e doados ao oxigênio. Estima-se que 1% do consumo total de O_2 de um tecido vegetal vai para a produção de EAOs (MOLLER, 2001). A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, por exemplo, é uma fonte de $O_2^{\bullet-}$ bem documentada, assim como a cadeia transportadora de elétrons do aparato fotossintético dentro dos cloroplastos. Um problema adicional para os cloroplastos é a transferência de energia de excitação da clorofila para o oxigênio, que pode gerar O_2^1 (BOWLER et al., 1992). Os cloroplastos estão sujeitos ao risco da toxidez do oxigênio uma vez que o O_2 pode ser fotoreduzido a $O_2^{\bullet-}$ e subsequentemente a H_2O_2 nos tilacóides (MEHLER, 1951). O local fotorredutor de O_2 nos cloroplastos é o fotossistema I (PSI), e seu produto primário é o $O_2^{\bullet-}$. Todavia, nos tilacóides o H_2O_2 é fotoproduzido via desproporcionamento do $O_2^{\bullet-}$, mas não diretamente através da redução de dois elétrons do O_2 (ASADA, 1999).

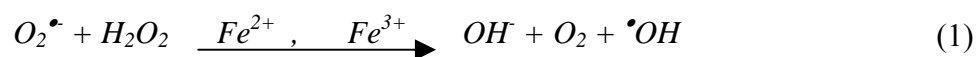
As cascatas redox das cadeias transportadoras de elétrons respiratória e fotossintética não apenas fornecem a energia para o metabolismo mas também geram sinais redox (FOYER; NOCTOR, 2003; APEL; HIRT, 2004). A mitocôndria vegetal respirando ativamente produz altas taxas de EAOs, uma cadeia transportadora de elétrons mais reduzida produz mais EAOs, e os principais locais de produção são os complexos respiratórios I e III (BARTOLI et al., 2004). Em células de mamíferos as mitocôndrias são as principais fontes de EAOs, o que também tem sido sugerido para células vegetais não fotossintetizantes (MOLLER, 2001). Como as células de café foram cultivadas no escuro neste experimento, provavelmente as mitocôndrias devam ser as principais fontes geradoras de EAOs.

O H_2O_2 é também um produto da β -oxidação associada a micropartículas de ácidos graxos e reações de fotorrespiração peroxissomal (SCANDALIOS, 1993). Os peroxissomos são organelas subcelulares com um tipo de metabolismo essencialmente oxidativo. Como os cloroplastos e mitocôndrias, os peroxissomos vegetais também produzem $O_2^{\bullet-}$ e existem, a princípio, dois locais de geração de $O_2^{\bullet-}$, um é a matriz da organela, onde o sistema gerador é a xantina oxidase, e outro local é nas membranas peroximais dependentes de NAD(P)H. Nas membranas peroximais, três polipeptídeos integrais com massas moleculares de 18, 29 e 32 kDa,

de uma pequena cadeia transportadora de elétrons, são envolvidas na geração de radicais $O_2^{\bullet-}$ e sob certas condições de estresse ao vegetal, a liberação de $O_2^{\bullet-}$ gerado pela membrana peroximal pode ser aumentada, produzindo estresse oxidativo (DEL RIO et al., 2002). Os peroxissomos conectam rotas metabólicas biossintéticas e oxidativas e compartimentalizam passos letais do metabolismo como a formação de EAOs e glioxilato, prevenindo então o envenenamento da célula e a reciclagem inútil das EAOs (IGAMBERDIEV; LEA, 2002).

Na última década, muitos estudos revelaram novas fontes de EAOs nas plantas, incluindo as NADPH oxidases, amino oxidases e peroxidases ligadas a parede celular, que participam na produção de EAOs durante a defesa contra patógenos e a morte celular programada (PCD) (LAM, 2004; LALOI; APEL; DANON, 2004). Além disso, a presença da óxido nítrico sintase (NOS) nos peroxissomos vegetais indicam a possível função destas organelas nas células vegetais como uma fonte de moléculas sinalizadoras como o óxido nítrico (NO), $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 (DEL RIO et al., 2002).

Todas as EAOs são extremamente reativas e citotóxicas a todos os organismos (SCANDALIOS, 1993). É geralmente assumido que o $\bullet OH$ e o O_2^1 são tão reativos que suas produções devem ser minimizadas. Muitas enzimas do ciclo de Calvin dentro dos cloroplastos são extremamente sensíveis ao H_2O_2 , e altos níveis de H_2O_2 inibem diretamente a fixação de CO_2 . O H_2O_2 demonstrou ser ativo com oxidases de funções mistas, marcando diversos tipos de enzimas para a degradação proteolítica (SCANDALIOS, 1993). Entretanto, o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 são relativamente pouco reativos em comparação com outras EAOs, mas na presença de íons metálicos (como o Fe) uma série de reações em cascata são iniciadas resultando na produção do $\bullet OH$ na reação de Haber-Weiss [form. (1)] e outras espécies destrutivas como lipoperóxidos (BOWLER et al., 1992).



O $\bullet OH$ (e seus derivados) são os mais potentes oxidantes conhecidos, sendo hábeis a atacar rapidamente, indiscriminadamente e virtualmente todas as macromoléculas, causando sérios danos nos componentes celulares (SCANDALIOS, 1993), peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas, mutação do DNA (BOWLER et al., 1992), lesões no DNA, podendo levar a disfunções metabólicas irreparáveis e morte celular (SCANDALIOS, 1993). Em adição, o

O_2^1 , que é formado quando a energia de excitação é transferida ao O_2 , também produz efeitos deletérios (BOWLER et al., 1992). Em vegetais superiores, esta energia é prontamente obtida via quanta luminoso por moléculas de transferência como a clorofila (SCANDALIOS, 1993). O O_2^1 pode transferir esta energia de excitação para outras moléculas biológicas ou reagir com elas, formando endoperóxidos ou hidroperóxidos (BOWLER et al., 1992).

Sob condições normais a produção de EAOs ocorre, mas é baixa. Entretanto, fatores ambientais adversos que perturbam a homeostase celular elevam a produção de EAOs. Tais fatores como a radiação UV e outras formas de radiação, exposição a níveis elevados de luminosidade, herbicidas (ex. paraquat), ataque de patógenos (ex. *Cercospora*), certas injúrias, hiperoxia, ozônio, flutuações na temperatura (SCANDALIOS, 1994), seca, concentração elevada de sais, extremos de temperatura, poluição do ar (MALLICK; MOHN, 2000) e várias outras fontes de estresse são conhecidas como indutores da formação EAOs, na maiorias dos organismos aeróbicos. Os metais pesados são outros agentes que induzem a produção de EAOs, podendo causar estresse oxidativo (BOWLER et al., 1994). O estresse por metais pesados é proporcional ao nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicando a ocorrência de peroxidação lipídica (BHATTACHARJEE, 1998).

O estresse oxidativo é frequentemente relacionado com outros efeitos metabólicos. Por exemplo, o estresse por Cd leva ao fechamento estomatal que limita a disponibilidade do CO_2 para a assimilação fotossintética do carbono (SANDALIO, 2001). Sob tais condições e alta luminosidade, a produção excessiva de $O_2^{\bullet-}$ no cloroplasto pode resultar na fotoinibição e danos fotooxidativos (SCANDALIOS, 1993).

O aumento rápido na concentração de EAOs é denominado explosão oxidativa (APOSTOL; HEINSTEN; LOW, 1989). Tornou-se evidente que as EAOs geradas durante situações de ataque de patógenos e estresse abiótico são reconhecidas pelas plantas como um sinal para engatilhar as respostas defensivas, morte celular, desenvolvimento, expressão gênica regulada pela oxirredução e a ação de quinases e fosfatases na tradução de sinais redox (VRANOVA; INZÉ; BREUSEGEM, 2002).

O estresse oxidativo ocorre quanto há um sério desbalanço em qualquer compartimento celular entre a produção de EAOs e a defesa antioxidante, levando a danos. Espécies diferentes mostram diferentes respostas a toxidez dos metais (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996). Apesar da informação focada na relação entre os metais pesados e o estresse oxidativo em

plantas disponível em anos mais recentes, continua difícil desenhar uma conclusão geral sobre as concentrações críticas de metais tóxicos nos solos (ROMERO-PUERTAS et al., 2004). A ocorrência de EAOs e sintomas de injúria oxidativa também foi observada em plantas expostas ao Cd (ROMERO-PUERTAS et al., 1999; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001) e ao Ni (FREEMAN et al., 2004; SINHA; PANDEY, 2003; BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001).

O processo de produção de EAOs, assim como de alguns de seus produtos, pode afetar severamente a integridade funcional e estrutural de membranas biológicas, resultando no aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que leva ao extravazamento de íons K^+ e outros solutos e pode finalmente causar morte celular (CHAOUI et al., 1997). Os danos peroxidativos no plasmalema também levam ao extravazamento do conteúdo celular e dissecação rápida, enquanto que danos em membranas intracelulares podem afetar a atividade respiratória na mitocôndria, causar falência nos pigmentos, e causar perda da habilidade de fixar carbono nos cloroplastos (SCANDALIOS, 1993).

A indução de peroxidação lipídica é um dos efeitos mais danosos das EAOs e um indicativo de sua produção, devido sua reação com ácidos graxos insaturados, causando a peroxidação de lipídios de membranas essenciais do plasmalema ou de organelas intracelulares (SCANDALIOS, 1993). Foi reportado que a peroxidação lipídica é um efeito primário da toxidez dos metais que pode iniciar antes do aparecimento de qualquer sintoma visível de toxidez (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são compostas de diversos produtos finais de baixo peso molecular formados via decomposição de certos produtos primários e secundários da peroxidação lipídica. A análise da quantidade de TBARS é utilizada como um índice do estresse oxidativo (LIU et al., 1997). Aumentos nos níveis de TBARS, seguido da exposição ao Cd foi observado em *Pisum sativum* (SANDALIO et al., 2001), *Brassica juncea* (SINGH; TEWARI, 2003), *Arabidopsis thaliana* (CHO; SEO, 2005), *Oriza sativa* (HASSAN et al., 2005), *Hordeum vulgare* (WU; ZHANG; DOMINY, 2003), *Phaseolus vulgaris* (CHAOUI et al., 1997) e *Helianthus annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996) e ao Ni em *A. thaliana*, *Thlaspi goensigense* (FREEMAN et al., 2004), *Hydrilla verticillata* (SINHA; PANDEY, 2003), raízes de *Zea mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e parte aérea (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998), raízes e parte aérea de *Cajanus cajan*

(RAO; SRESTY, 2000) e raízes de *Triticum aestivum* (PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992).

A exposição de plantas de *A. thaliana* a baixos níveis de MDA, principal componente das TBARS (LIU et al., 1997), induziu poderosamente muitos genes em um sistema “microarray”, parcialmente em direção daqueles implicados em estresses abióticos ou ambientais (ex. ROF1 e XERO2). Em contraste, nenhum dos genes relacionados a patógenos testados responderam ao MDA (WEBER et al., 2004). Portanto, mudanças na concentração e/ou localização de MDA não ligado *in vivo* pode afetar fortemente a transcrição relacionada a estresse (WEBER et al., 2004).

O O₂, apesar de essencial para a existência e sobrevivência da vida aeróbica, pode gerar estresse oxidativo, devido a uma variedade de mudanças fisiológicas. Estas mudanças devem ser maiores nas plantas em relação a outros eucariotos devido ao seu estilo de vida estacionário, sob ambientes variando constantemente e porque plantas consomem O₂ durante a respiração e geram durante a fotossíntese. Além disso, entre todos os organismos, a concentração de O₂ é maior nas plantas, o que sujeita as plantas a produção potencialmente maior de EAOs e conseqüentemente, de danos oxidativos (SCANDALIOS, 1993).

Apesar dos organismos aeróbicos disporem de vantagens energéticas significativas utilizando o oxigênio molecular como um oxidante terminal na respiração, a presença do oxigênio no ambiente celular constitui-se numa ameaça oxidativa constante às suas próprias estruturas e processos, devido ao seu potencial de agir como redutor parcial e assim formar as EAOs (MALLICK; MOHN, 2000), que podem se tornar altamente destrutivas para células e tecidos se sua produção não for estritamente controlada (RICE-EVANS; DIPLOCK; SYMONS, 1991). Assim, a formação de EAOs é uma consequência inevitável do metabolismo dos organismos aeróbicos (ANGELOVA; PASHOVA; SLOKOSKA, 2000) e provocam estresse oxidativo devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (ANGELOVA; PASHOVA; SLOKOSKA, 2000; MALLICK; MOHN, 2000). Os íons dos metais pesados são capazes de causar danos oxidativos tanto diretamente, agindo como redutores e assim produzindo as EAOs, como indiretamente, inativando o sistema antioxidante da célula (MANNAZZU et al., 2000).

1.4 Resposta das plantas ao estresse

O conceito de estresse em plantas pode ser definido como uma condição desfavorável ou substância que afeta ou bloqueia o metabolismo, o crescimento, ou o desenvolvimento. Há uma diferença entre os efeitos de estresses de longo e curto período, assim como entre eventos de baixo estresse, que pode ser parcialmente compensado por aclimatação, adaptação e mecanismos de reparo e eventos de estresse alto ou crônico, que podem causar danos consideráveis e devem eventualmente, levar a morte celular e da planta (LICHTENTHALER, 1996). Antes da exposição ao estresse, assume-se que as plantas estão em certas condições padrões, que são ótimas dentro dos limites ajustados para o cultivo, condições luminosas e suplementos minerais do ambiente.

Três fases distintas entre as respostas das plantas a estresses foram sugeridas por Larcher (1987), nas quais uma quarta foi adicionada por Lichtenthaler e Rinderle (1988):

- *Fase de Resposta* (início do estresse): reação de alarme ou síndrome geral de alarme (SGA) (desvio da normalidade funcional, declínio da vitalidade e processos catabólicos excedendo anabolismo);
- *Fase de Restituição* (continuação do estresse): estágio da resistência (processos de adaptação, reparo e reativação);
- *Fase Final* (estresse de longo período): estágio da exaustão (intensidade do estresse muito alta, sobrecarregando a capacidade de adaptação, levando a doença crônica ou morte celular);
- *Fase de Regeneração*: regeneração parcial ou completa das funções fisiológicas quando o estressor é removido e os danos não são muito altos.

No início do estresse quando as plantas são inesperadamente confrontadas com uma situação crítica, com um conseqüente declínio de muitas funções fisiológicas, as vias metabólicas, processos de reparo e metabolismo de longo período são ativados, e as adaptações morfológicas da SGA (McKERSIE; LESHEM, 1994), que deve também induzir a síndrome de aclimatação geral ou síndrome de adaptação geral. Então, a SGA parece representar um esforço generalizado do organismo para se adaptar as novas condições (LESHEM; KUIPER, 1996). Em tecidos afetados pelo estresse, desenvolve-se a síndrome de adaptação local (SLA), que tem uma interação restrita com a SGA e sinais químicos de alarme estão sendo enviado por tecidos

estressados, induzindo hormônios adaptativos. Plantas sob estresse de drogas apresentam uma reação de SLA que levam a SGA (DAVIES; ZHANG, 1991).

Os mecanismos que conferem resistência a íons de metais tóxicos em plantas inclui: evitar fisicamente áreas contaminadas, exudação de agentes complexantes na rizosfera, ligação na parede celular, efluxo dos íons metálicos do simplasma, prevenção da translocação dos íons metálicos para a parte aérea, complexação com vários ligantes no simplasma, transporte dos complexos metal-ligante para o interior do vacúolo, estocagem dos íons metálicos no vacúolo pela complexação com ligantes vacuolares e formação de enzimas de resistência a metais para minimizar a injúria causada pela toxidez (PRASAD, 1995).

Devido aos diferentes processos metabólicos descritos anteriormente que podem produzir EAOs, aumentados pelo estresse de metais pesados, vários mecanismos de defesas tem emergido. Estes sistemas de defesa podem remover, neutralizar ou limpar oxi-radicaís e seus intermediários. As plantas tem desenvolvido muitos mecanismos para prevenir ou amenizar os danos que as EAOs podem causar danos em diferentes tecidos (FOYER; NOCTOR, 2003).

1.5 Mecanismos de defesa antioxidante

A primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo em plantas é evitar a produção de EAOs. Dessa forma, na mitocôndria vegetal a cadeia transportadora de elétrons é adequadamente oxidada mantendo o balanço entre a disponibilidade de substrato e o requerimento de ATP, assim como a ativação de oxidases alternativas, proteínas de despareamento e NAD(P)H desidrogenases insensíveis a rotenona (MOLLER, 2001). Uma vez formadas, as EAOs devem ser desintoxicados tão eficientemente quanto for possível, para minimizar a danificação, portanto, os mecanismos de desintoxicação constituem a segunda linha de defesa contra os efeitos deletérios das EAOs (MOLLER, 2001). O termo antioxidante descreve qualquer componente capaz de neutralizar as EAOs sem sua conversão a radicais destrutivos. As enzimas antioxidantes são consideradas todas aquelas que tanto catalizam tais reações quanto as que são envolvidas no processamento direto das EAOs. Portanto, a função dos antioxidantes e das enzimas antioxidantes é interromper as cascatas de oxidação descontroladas (NOCTOR; FOYER, 1998). Finalmente, a terceira linha de defesa contra as EAOs é o reparo dos danos causados (MOLLER, 2001).

1.5.1. Sistema antioxidante não enzimático

O sistema antioxidante não enzimático da célula vegetal é essencialmente composto de relativamente altas concentrações de ascorbato, glutathiona e α -tocoferol, que são eficientes consumidores de oxirradicais (BOWLER et al., 1992). O ascorbato é um antioxidante principal que reage com as EAOs (SMIRNOFF; CONKLIN; LOEWUS, 2001). A glutathiona (GSH), é outro importante agente redox na maioria das células aeróbicas, e desempenha uma rota importante em funções fisiológicas, incluindo a regulação redox, conjugação de metabólitos, desintoxicação de xenobióticos e homeostase e sinalização celular que engatilha as respostas adaptativas. Estas funções dependem da concentração e/ou estado redox da GSH foliar (NOCTOR et al., 2002).

Todas as plantas podem sintetizar o ascorbato, que pode ser acumulado em tecidos fotossintéticos e não fotossintéticos. O ascorbato é um antioxidante primário principal, reagindo diretamente com $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ e O_2^1 . O ascorbato é também um poderoso antioxidante secundário, reduzindo a forma oxidada do α -tocoferol, um importante antioxidante em fases não aquosas. Em adição a sua importância no ciclo ascorbato-glutathiona, o ascorbato desempenha um papel na preservação da atividade de enzimas que contém íons metálicos prostéticos de transição (NOCTOR; FOYER, 1998). O sistema redox do ascorbato consiste de L-ascorbato, monodehidroascorbato (MDHA) e dehidroascorbato (DHA). Ambas formas oxidadas do ascorbato são instáveis em ambientes aquosos (SMIRNOFF; CONKLIN; LOEWUS, 2001) e elas podem ser catabolizadas a produtos de dois e quatro carbonos tais como o oxalato e o tartarato, que são acumulados em altas concentrações (LOEWUS, 1988).

O tripeptídeo GSH (γ -glutamilcisteinilglicina) é a maior fonte de tiol não proteico na maioria das células vegetais (XIANG; OLIVER, 1998). A GSH é envolvida em muitas rotas importantes (NOCTOR; FOYER, 1998), que inclui a principal rota no transporte sulfúrico, que regula a translocação do sulfato na raiz (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994), e uma rota central nos mecanismos de defesa das plantas. A GSH é também o substrato para a glutathiona S-transferase, permitindo a neutralização de xenobióticos potencialmente tóxicos (BECK et al., 2003). Além disso, a GSH tem uma função importante na remoção do H_2O_2 das células vegetais, via ciclo ascorbato-glutathiona. Em adição a seus efeitos na expressão de genes

de defesa, a GSH deve também estar envolvida no controle redox na divisão celular (NOCTOR; FOYER, 1998).

A rota da síntese da GSH foi elucidada e aparenta ser comum a todos os organismos que contém GSH (NOCTOR; FOYER, 1998). A GSH é sintetizada do glutamato, cisteína e glicina por uma reação em dois passos dependentes de ATP. A primeira reação forma γ -glutamylcisteína (γ -EC) do glutamato e cisteína pela enzima γ -glutamylcisteína sintase (γ -ECS), que é codificada pelo gene *gsh1*. A GSH é então sintetizada pela ligação da γ -EC e glicina em uma reação catalizada pela enzima GSH sintase (GS), que é codificada pelo gene *gsh2* (XIANG; OLIVER, 1998).

A GSH pode ser sintetizada no citosol, cloroplasto e mitocôndria (MORAN et al., 2000) e a concentração celular pode variar consideravelmente entre espécies e em diferentes órgãos ou estágios de desenvolvimento na mesma planta (NOCTOR; FOYER, 1998). Os cloroplastos contém altas quantidades de GSH devido seu papel no ciclo ascorbato-glutationa (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994).

Quando a GSH é oxidada como parte de sua atividade antioxidante, ela forma glutathiona dissulfeto (GSSG), a forma oxidada da GSH (XIANG; OLIVER, 1998). Em resposta ao estresse, as plantas podem aumentar a atividade as enzimas da biossíntese de GSH (VERNOUX et al., 2000) e os níveis de GSH (NOCTOR et al., 2002). A síntese da GSH deve também ser estimulada pela indução das enzimas envolvidas na translocação e redução do sulfato (HEISS et al., 1999). A modulação do conteúdo de GSH transmite informações sobre diversos mecanismos de sinalização que inclui a liberação do Ca^{2+} ao citosol e o estabelecimento de um potencial redox apropriado para o intercâmbio tiol/dissulfeto (GOMEZ et al., 2004). Estes resultados suportam a idéia que a concentração de GSH é controlada em múltiplos níveis.

A síntese de GSH é aumentada com a elevação da concentração de cisteína, sendo o passo limitante para a síntese de GSH (GOLDSBROUGH, 1998; NOCTOR; FOYER, 1998). Outro controle fundamental da síntese de GSH é a inibição da γ -ECS pela GSH. Estudos *in vitro* com as enzimas de células de *Nicotiana tabacum* e salsa demonstraram que a γ -ECS vegetal foi inibida pela GSH (NOCTOR; FOYER, 1998).

Sob condições estressantes, a oxidação da GSH a GSSG, ou a síntese de fitoquelatina poderia diminuir a concentração de GSH e então estimular a atividade da γ -ECS (NOCTOR; FOYER, 1998). Células de *Licopersicum esculentum* resistente ao Cd contendo níveis de GSH

aumentados demonstraram possuir atividades duas vezes maiores de γ -ECS. A exposição de raízes ou células cultivadas ao Cd resultou em uma taxa aumentada da síntese de GSH e concomitante acréscimos nas atividades de γ -ECS e GS (NOCTOR; FOYER, 1998).

O Cd pode ser desintoxicado em plantas por uma família de peptídeos ricos em enxofre denominados fitoquelatinas (PCs) que são hábeis em complexar o Cd e outros metais pesados (COBBETT, 2000). A quelação do Cd por PCs é importante para evitar o acúmulo de íons de Cd livres dentro da célula vegetal, prevenindo portanto sua toxidez. No vacúolo, os complexos Cd-PCs se dissociam e liberam o Cd que pode ser complexado por ácidos orgânicos vacuolares. O vacúolo é o maior depósito de Cd dentro da célula vegetal, evitando assim a ação tóxica destes metais em outros compartimentos celulares (KROTZ; EVANGELOU; WAGNER, 1989). Os íons de Cd livre podem também entrar no vacúolo por meio de um sistema transportador $Cd^{2+}/2H^{+}$ (GRIES; WAGNER, 1998)

Por outro lado, o Ni induz a produção de PCs, mas a complexação de metais com PCs foi apenas demonstrada para Cu, Pb e Cd (KUKKOLA; RAUTIO; HUTTUNEN, 2000). Além disso, plantas naturalmente tolerantes a metais não elevam a produção de fitoquelatinas como parte de sua defesa contra o Ni (FREEMAN et al., 2004). Entretanto, o Ni pode formar complexo estável com GSH (RAO; SRESTY, 2000), histidina (INGLE et al., 2005), ácidos orgânicos (FREEMAN et al., 2004) e possivelmente com proteínas de ligação específicas ao metal (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001), podendo então ser sequestrado no vacúolo, que é o maior depósito de Ni na célula vegetal (KRAMER et al., 2000), reduzindo a quantidade de íons livres dentro de outros compartimentos celulares, contribuindo para a tolerância ao Ni.

A estrutura química das PCs sugere que elas não são formadas como resultado direto da expressão de um gene de tolerância a metais, mas sim um produto de uma cadeia biossintética (COBBETT, 2000). Os peptídeos são estruturalmente relacionados a GSH e contém um número variado (normalmente 2 a 5) de glutamato e cisteína, ligados através do grupo γ -carboxil do glutamato. A síntese das PCs pode ser induzida muito rapidamente em células de culturas de tecidos e raízes, e é acompanhada pela queda na concentração de GSH, seguido da adição de Cd e outros metais pesados (GRILL; WINNACKER; ZENK, 1987) (Figura 1).

A fitoquelatina sintase (PCS) foi caracterizada como uma específica γ -glutamyl cysteina dipeptidil transpeptidase (EC 2.3.2.15) (VATAMANIUK et al., 2004), que conduz a conversão de GSH a PCs, e foi demonstrado que ela é estimulada pelo Cd (COBBETT, 2000), evidenciando

outra importante função da GSH na defesa contra a toxidez dos metais pesados. (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). *A. thaliana* mutantes *cad2* faltando γ -glutamilcisteína sintase são sensíveis ao Cd e são desabilitadas a sintetizar GSH, enquanto *cad1* mutantes faltando PCS são sensíveis ao Cd e acumulam GSH (HOWDEN et al., 1995; COBBETT, 1998).

Em animais, cianobactéria e fungos, os metais pesados podem ser complexados e desintoxicados por metalotioneínas, um grupo de peptídeos ricos em cisteína (cerca de 30%), codificados por genes (DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999). As metalotioneínas não são tipicamente relacionadas a espécies vegetais. Entretanto, em *A. thaliana* duas metalotioneínas induzidas por Cu foram isoladas utilizando anticorpos policlonais (MURPHY et al., 1997).

A cisteína, hidroquinonas, manitol, vitamina E, alguns alcalóide e β -caroteno, são também importantes antioxidantes. Os carotenóides, que são componentes essenciais das membranas do tilacóide, podem neutralizar eficientemente o estado excitado da clorofila e/ou O_2^1 (SCANDALIOS, 1993). Em contraste ao ascorbato e GSH, a desintoxicação das EAOs em plantas por flavonóides e carotenóides não foi investigada em maiores detalhes. Em *A. thaliana*, a overexpressão da β -caroteno hidroxilase leva a quantidades aumentadas de xantofila no cloroplasto e resulta na tolerância ao estresse oxidativo induzido pela alta luminosidade (DAVISON; HUNTER; HORTON, 2002). Além disso, o nível de clorofila e o total de carotenóides é postulado como um indicador da toxidez de metais pesados para vegetais superiores (KRUPA; BARANOWSKA; ORZOT, 1996).

As antocianinas são consideradas importantes para atenuar a injúria fotooxidativa nas folhas, pela proteção dos cloroplastos do excesso de alta energia de quanta e limpeza das EAOs (NEILL; GOULD, 2003). De acordo com Neill e Gould (2003), as antocianinas oferecem proteção efetiva e versátil sem comprometimento significativo da fotossíntese, como observado em *Lactuca sativa*. Krupa; Baranowska e Orzot (1996) demonstraram utilizando as primeiras folhas de plântulas de centeio, que o efeito de Cd, Ni, Pb e Zn no conteúdo de antocianina não é diretamente relacionado a toxidez individual do metal, uma vez que menos antocianina foi acumulada seguido do tratamento com metais mais tóxicos.

1.5.2 Sistema antioxidante enzimático

A destruição eficiente do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 requer a ação de diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia. Os principais mecanismos de limpeza das EAOs incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPX) e guaiacol peroxidase (GOPX). Em condições de estresse, as EAOs podem se acumular nos tecidos resultando na alteração da atividade destas enzimas (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994), que são responsáveis pela proteção antioxidante e preservação da integridade da célula (LAGRIFFOUL et al., 1998).

Os níveis de estresse oxidativo celular são determinados pelas quantidades de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , e radicais $^{\bullet}OH$. O H_2O_2 pode ser diretamente metabolizado pelas peroxidases, particularmente aquelas da parede celular e pela CAT nos peroxissomos (POLIDOROS; SCANDALIOS, 1999). No cloroplasto, o $O_2^{\bullet-}$ é convertido pela SOD a H_2O_2 , que é então desintoxicado a H_2O e O_2 pelo ciclo ascorbato-glutathiona, que envolve a ação de diversas enzimas, incluindo a GR (NOCTOR et al., 2002). Em adição, alguns sistemas alternativos canalizadores de elétrons nas cadeias transportadoras de elétrons dos cloroplastos e mitocôndrias, podem reduzir a produção de EAOs através de oxidases alternativas (AOXs) que reduzem O_2 a água (MAXWELL; WANG; McINTOSH, 1999).

A atividade e expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes foram alterados em algumas plantas, quando sujeitas a condições ambientais como estresse por baixas temperaturas (PINHERO et al., 1997), intensidade luminosa (WILLEKENS et al., 1994), estresse salino (FADZILLAH et al., 1997), patógenos (WILLIAMSON; SCANDALIOS, 1992), herbicidas (DONAHUE et al., 1997) e diversos gases poluentes (VAN CAMP et al., 1994; CONKLIN; LAST, 1995; TORSETHAUGEN et al., 1997; AZEVEDO et al., 1998).

As respostas dos antioxidantes aos metais pesados, incluindo estresse oxidativo, forneceu resultados variados e controversos (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001; PINTO et al., 2003) por três razões (GRATÃO et al., 2005):

- Os metais pesados exercem diferentes mecanismos de indução de estresse.
- O sistema antioxidante é compartimentalizado e conseqüentemente existem diferenças entre as diferentes respostas de organelas, células e tecidos.

- A desintoxicação e complexação dos metais pesados pode reduzir seu efeito estimulatório no estresse oxidativo.

As numerosas fontes de EAOs e um sistema antioxidante complexo, fornecem a flexibilidade necessária para o metabolismo antioxidativo. Dados os mecanismos utilizados pelas plantas para desintoxicar as EAOs, é claramente importante estabelecer se a exposição de plantas a metais pesados causa um efeito estimulatório ou inibidor nas enzimas envolvidas no processo de desintoxicação. Um tanto surpreendente, o número limitado de experimentos que foram conduzidos com este objetivo, tem frequentemente produzido resultados contraditórios.

As principais vias de limpeza das EAOs em plantas (Figura 1) são:

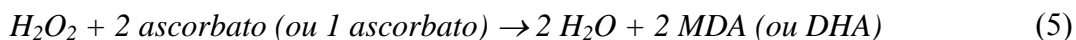
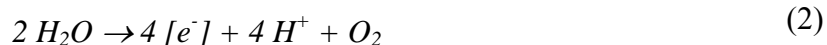
- Ciclo água-água nos cloroplastos que inclui a SOD.
- Ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos.
- CAT nos peroxissomos.

Os mecanismos compensatórios são induzidos se o balanço das enzimas de limpeza é modificado. Quando a atividade da CAT é reduzida em plantas, outras enzimas limpadoras de EAOs como a APX, GPX e AOX mitocondrial mostraram ter atividade aumentada (YOSHIMURA et al., 2000).

Cloroplastos intactos fotoreduzem O_2 sem acúmulo de H_2O_2 na ausência de CAT. Estes resultados indicam que os cloroplastos possuem um sistema para reduzir O_2 a água utilizando elétrons derivados da água, através do ciclo água-água (Figura 1). A estequiometria da evolução do O_2 na ausência da CAT nos cloroplastos, indica que o H_2O_2 derivado do $O_2^{\bullet-}$ fotogerado no PSI é reduzido a água via a reação da peroxidase, utilizando o redutor gerado no PSI como doador de elétrons. A ocorrência de uma peroxidase específica ao ascorbato nos cloroplastos de espinafre, e a dehidroascorbato redutase (DHAR) indicou que o doador de elétrons para esta peroxidase é o ascorbato (ASADA, 1999).

O ciclo água-água é composto das seguintes reações (ASADA, 1999):

- Fotooxidação da água no PSII [form. (2)].
- Fotoredução do O_2 no PSI [form. (3)].
- Dismutação do $O_2^{\bullet-}$ catalizada pela SOD [form. (4)].
- Redução do H_2O_2 pelo ascorbato catalizada pela APX [form. (5)].
- Redução do ascorbato oxidado [form. (6)].



A função mais importante deste ciclo é a limpeza do O_2^{\bullet} e H_2O_2 no local de sua geração, diminuindo seus tempos de vida para reprimir a produção de $\bullet OH$ e sua interação com moléculas alvo. Além disso, o ciclo água-água pode dissipar o excesso de energia de excitação sob estresse ambiental (ASADA, 1999).

O ciclo ascorbato-glutationa, também chamado ciclo Halliwell-Foyer-Asada (Figura 1), é uma via eficiente das células vegetais se desfazer do H_2O_2 , em certos compartimentos celulares onde este metabólico é produzido e a CAT não está presente (DEL RIO et al., 2002). Este ciclo utiliza os antioxidantes não enzimáticos ascorbato e GSH, em uma série de reações catalisadas por quatro enzimas antioxidantes: APX, MDHAR ou DHAR e GR (FOYER et al., 1997). A APX utiliza duas moléculas de ascorbato para reduzir H_2O_2 a água, com a concomitante geração de duas moléculas de monodehidroascorbato (MDHA). A MDHAR utiliza uma molécula de NAD(P)H para reduzir o MDHA a ascorbato. O MDHA é uma molécula com um tempo de vida curto, e se não reduzido rapidamente, é desproporcionado a ascorbato e dehidroascorbato (DHA). A DHAR utiliza duas moléculas de GSH para reduzir o DHA a ascorbato, com a geração de uma molécula de GSSG. Finalmente, a GR cataliza a redução do GSSG a GSH, utilizando NADPH como agente redutor (NOCTOR; FOYER, 1998).

A ausência da CAT nos cloroplastos exclui esta rota na proteção das enzimas do ciclo de Calvin. A mitocôndria aparentemente não possui as enzimas para a síntese de GSH e, portanto, deve inportar GSH do citosol (MOLLER, 2001). Durante ambos estresses biótico e abiótico, a mitocôndria pode ser danificada pelo estresse oxidativo, pois ela é muito suscetível a inibição da função oxidativa (MOLLER, 2001, MILLAR et al., 2003), sendo protegida pelo ciclo ascorbato-glutationa. O ciclo ascorbato-glutationa foi também demonstrado no citosol e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002).

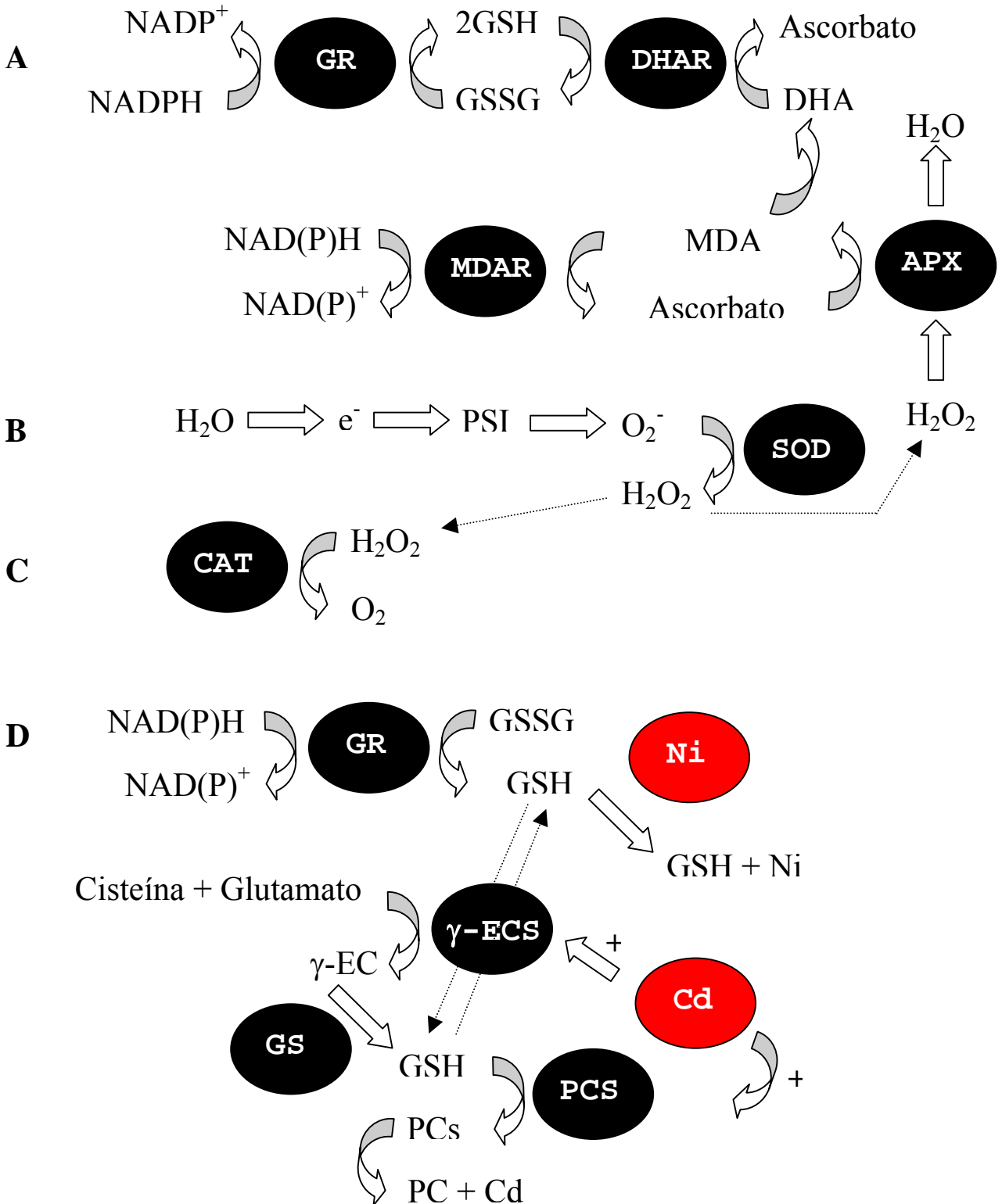


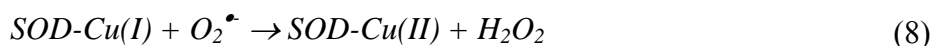
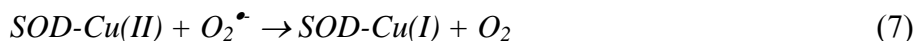
Figura 1 - Cadeia de limpeza das EAOs: (A) ciclo ascorbato-glutationa, (B) ciclo água-água, (C) CAT, (D) mecanismos envolvidos na quelação de Cd e Ni

1.5.2.1. Superóxido dismutase (SOD)

A Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi inicialmente isolada por Mann e Keilin em 1938 de sangue bovino, como uma proteína verde cuja função biológica foi creditada a estocagem de Cu. Ao longo dos anos, a enzima teve referências variadas com sendo eritrocupreína, indofenol oxidase e tetrazolio oxidase (SCANDALIOS, 1993). A função catalítica da SOD foi descoberta por McCord e Fridovich em 1969, com uma proteína Cu/Zn de eritrócitos bovinos. Proteínas similares a proteína Cu/Zn com atividade de SOD foram subsequentemente isoladas de várias fontes eucarióticas. Proteínas contendo Mn com atividade de SOD foram encontradas em procariotos e na mitocôndria de eucariotos e depois, proteínas com Fe de *Escherichia coli* e algas demonstraram possuir atividade de SOD (OLMOS et al., 2003). Recentemente, uma classe completamente distinta de SOD que contém Ni (Ni-SOD) foi descoberta em *Streptomyces* e cyanobacteria (BARONDEAU et al., 2004). As enzimas SOD são ubíquas, sendo vastamente distribuídas entre organismos consumidores de O₂, anaeróbios aerotolerantes, e alguns anaeróbios obrigatórios (OLMOS et al., 2003).

As SODs são consideradas a primeira linha de defesa contra O₂^{•-} e seus produtos de reação são H₂O₂ e O₂ (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Entre os mecanismos enzimáticos, a dismutação do O₂^{•-} pela SOD tem sido estudada extensivamente (MILONE et al., 2003). Nenhuma enzima que faz a redução do O₂^{•-} a H₂O₂ ou a oxidação do O₂^{•-} a O₂ foi encontrada até o momento, tanto em plantas quanto em outros organismos (APEL; HIRT, 2004). Portanto, a enzima SOD é a única cuja atividade determina a concentração de O₂^{•-} e H₂O₂, os dois substratos da reação de Haber-Weiss, sendo portanto central no mecanismo de defesa, prevenindo deste modo a formação do radical [•]OH (LEÓN et al., 2002).

O ciclo catalítico da SOD para a dismutação do O₂^{•-} é mostrado abaixo [form. (7 e 8)], onde a SOD-Cu(II) e SOD-Cu(I) representam as enzimas oxidada e reduzida, respectivamente.



Três classes de SOD foram reportadas em plantas, que foram classificadas de acordo com seu co-fator metálico, manganês (Mn), cobre/zinco (Cu/Zn) ou ferro (Fe) (AZEVEDO et al.,

1998). A Mn-SOD é localizada na mitocôndria, apesar dela ter sido reportada nos cloroplastos de algumas plantas (AZEVEDO et al., 1998), enquanto que a Fe-SOD, apesar de observada em um número mais limitado de espécies vegetais, é associado aos cloroplastos (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001). Já as abundantes Cu/Zn-SODs são geralmente encontradas no citosol de células eucarióticas e cloroplastos (AZEVEDO et al., 1998). A SOD cloroplástica é geralmente a SOD mais abundante nas folhas verdes, ao mesmo tempo que em plântulas e material etiolado, as SODs citoplásmicas e mitocondriais prevalecem. Esta distribuição presumivelmente reflete mudanças ocorridas nos locais subcelulares de formação dos oxiradicais, ou seja, quando as reações fotossintéticas tornam-se dominantes no metabolismo celular, necessita-se de um aumento na SOD cloroplastidial (BOWLER et al., 1994). A presença das isoformas Mn-SOD e Cu/Zn-SOD em peroxissomos vegetais isolados foram reportadas em *Pisum sativum* e outras espécies vegetais (DEL RIO et al., 2002).

As SODs são enzimas diméricas com duas subunidades idênticas (CHEN; LIU, 1996). A Cu/Zn-SOD é um homodímero e contém um átomo de Cu e um de Zn em cada subunidade. A Cu/Zn-SOD é uma enzima estável que é resistente a estresse desnaturantes incluindo temperaturas de até 80°C devido a sua estrutura β -barril, com uma baixa quantidade de formações α -hélice. A Fe-SOD não é tão termoestável quanto a Cu/Zn-SOD, mas é estável até 50°C (ASADA, 1999). Dados de sequências sugerem que os três tipos de SOD caem em famílias filogenéticas. As Fe-SODs e Mn-SODs são muito relacionadas na estrutura protéica e outras características químicas, mas não são relacionadas a Cu/Zn-SODs. Portanto, a Fe-SOD e Mn-SOD devem estar envolvidas a um ancestral comum, enquanto que a Cu/Zn-SOD evoluiu independentemente e mais recentemente (CHEN; LIU, 1996).

Ambas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD são inativadas pelo H₂O₂, mas a Mn-SOD não é. Esta inativação é devido a geração de radical hidroxil no centro de reação da enzima, após a reação reversa do ciclo catalítico. O radical hidroxil gerado oxida o resíduo de His ligada ao metal a 2-oxohistidina, resultando em inibição irreversível (ASADA, 1999). Além disso, a Cu/Zn-SOD é inibida reversivelmente pelo KCN, enquanto que as outras enzimas não são (MALLICK; MOHN, 2000). Este padrão de inativação é utilizado na classificação das diferentes isoenzimas da SOD.

Ao contrário da maioria de outros organismos, plantas contém múltiplas formas enzimáticas (isoenzimas) de SOD. A existência das isoenzimas de SOD, suas localizações dentro da célula, tecidos ou organelas, e qualquer mudança que elas devam sofrer durante o

desenvolvimento, ou em resposta a vários sinais, implica em rotas metabólicas separadas para cada isoenzima de SOD (SCANDALIOS, 1993). O número de isoenzimas de cada tipo de SOD varia muito de planta para planta, assim como a abundância relativa de cada uma. Todas as isoenzimas aparentam ser codificadas pelo núcleo e, quando necessário, são transportadas aos seus locais nas organelas por meio de sequências alvo amino terminais (BOWLER et al., 1992).

Nove genes nucleares (*Sod1*, *Sod2*, *Sod3.1*, *Sod3.2*, *Sod3.3*, *Sod3.4*, *Sod4*, *Sod4A* and *Sod5*) codificam as correspondentes isoenzimas de SOD diferencialmente compartimentalizadas: SOD-1 (cloroplastidial), todas as SOD-3 (mitocondrial), e SOD-2, SOD-4, SOD-4A e SOD-5 (citossólicas) (ACEVEDO; SCANDALIOS, 1996; KLIEBENSTEIN; MONDE; LAST, 1998). A regulação dos genes de SOD também aparentam ser muito sensíveis a estresses ambientais, presumivelmente como uma consequência do aumento de formação de EAOs (BOWLER et al., 1992). É concebível que altos níveis de estresse oxidativo devem resultar em alta degradação da proteína SOD, resultando no requerimento de nova síntese de enzima SOD para manter níveis de SOD suficientemente altos para a proteção efetiva (SCANDALIOS, 1993). A ubiquidade do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 sugere que eles próprios não direcionam os diversos perfis da expressão gênica da SOD (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002).

As células mantêm um balanço delicado entre as taxas de geração e remoção do $O_2^{\bullet-}$. Para tal balanço, os organismos envolvem mecanismos regulatórios elaborados para controlar a síntese das SODs em resposta a diferentes estímulos oxidativos (SCANDALIOS, 1993). A Mn-SOD mitocondrial responde a formação aumentada de oxiradical na mitocôndria, enquanto que a Fe-SOD cloroplastidial responde a tal evento ocorrido nos cloroplastos e a Cu/Zn-SOD citossólica responde a reações localizadas no citosol. O efeito de um estresse particular na expressão gênica da SOD é provavelmente governado pela localização subcelular que o estresse oxidativo é gerado (BOWLER et al., 1992). Por exemplo, a superexpressão da Mn-SOD mitocondrial de *Nicotiana plumbagnifolia* em *N. tabacum* (BOWLER et al., 1991) e a overexpressão da Mn-SOD em *Z. mays* (KINGSTON-SMITH; FOYER, 2000), protegeu as plantas transgênicas produzidas de danos oxidativos.

A resposta da atividade da SOD ao estresse de metais pesados varia consideravelmente dependendo da espécie vegetal, tecido, estágio de desenvolvimento e tempo de exposição (GRATÃO et al., 2005). A atividade da SOD foi maior em *Alyssum bertolonii*, uma planta hiperacumuladora de Ni, que em *N. tabacum*, tanto com Ni quanto sem Ni no meio de cultivo

(BOOMINATHAN; DORAN, 2002). A atividade da SOD em folhas de *Raphanus sativus* aumentou em resposta ao tratamento com Cd, enquanto nas raízes não houve variação significativa da atividade (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001). Além disso, a revelação da atividade da SOD em *Glycine max* identificou sete isoenzimas nas folhas e oito nas raízes (FERREIRA et al., 2002).

Aumentos na atividade total da SOD foram detectadas após a aplicação de Cd em *Solanum tuberosum* (STROINSKI; KOZLOWSKA, 1997), *H. vulgare* (GUO et al., 2004), *A. thaliana* (SKORZYNSKA-POLIT; DRAZKIEWICZ; KRUPA, 2003), folhas de *O. sativa* (HSU; KAO, 2004) e plantas acumuladoras do gênero *Alyssum* (SCHICKLER; CASPI, 1999) e ao Ni na planta hiperacumuladora *Alyssum maritimum* (SCHICKLER; CASPI, 1999), na parte aérea de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998) e em *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000).

A atividade da SOD não foi alterada pelo Cd em *H. annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996, 1999). Similarmente, a SOD não foi afetada pelo Ni em *N. tabacum* (BOOMINATHAN; DORAN, 2002), *Silene paradoxa* (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001), raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001).

De outra forma, a atividade da SOD declinou em *Amaranthus lividus* (BHATTACHARJEE, 1998), *Phragmites australis* (IANNELLI et al., 2002), *H. annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996), *Capsicum annuum* (LEÓN et al., 2002) e *Populus x Canescens*, um híbrido de *Populus tremula x Populus alba* (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2002), devido a exposição ao Cd, sendo que a atividade da SOD também foi reduzida em resposta a exposição ao Ni em *A. bertolonii* (BOOMINATHAN; DORAN, 2002).

Estes dados ressaltam a variação existente entre as espécies vegetais, da resposta da SOD em relação ao tratamento com os metais pesados Cd e Ni, evidenciando a necessidade de se fazer estudos abrangentes, buscando a relação entre dose destes metais e resposta das espécies vegetais de maior interesse.

Uma vez que a ação da SOD resulta na formação de H₂O₂, ela está também intimamente ligada com a atividade da CAT e peroxidases, mantendo portanto a interação com estas e outras enzimas e antioxidantes, para garantir um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos.

1.5.2.2 Catalase (CAT)

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é uma proteína tetramérica Fe porfirina que catalisa a conversão do H_2O_2 a água e O_2 (FRUGOLI et al., 1996), abundante nos peroxissomos. A função da CAT no peroxissomo é metabolizar o H_2O_2 liberado em decorrência da conversão do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração (IGAMBERDIEV; LEA, 2002) e decompor o H_2O_2 formado durante a β -oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos de tecidos de estocagem de lipídeos (HOLTMAN et al., 1994). A CAT tem uma taxa catalítica máxima extremamente alta, mas uma baixa afinidade pelo substrato, uma vez que a reação requer o acesso simultâneo de duas moléculas de H_2O_2 no sítio ativo. Não há dúvida que a contribuição da CAT na proteção de organismos dos danos pelas EAOs é essencial (ZÁMOCKÝ; KOLLER, 1999). A CAT também protege a SOD contra a inativação por altos níveis de H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995).

Iniciamente, pensava-se que a principal função dos peroxissomos era a remoção pela CAT do H_2O_2 tóxico gerado por oxidases diferentes. Em anos recentes, foi demonstrado que os peroxissomos estão envolvidos em uma gama de importantes funções celulares em quase todas as células eucarióticas (DEL RIO et al., 2002). Em plantas, existem diversos tipos de peroxissomos que são especializados em certas funções metabólicas. Os glioxissomos são peroxissomos especializados de tecidos de estocagem de lipídeos, onde a CAT decompõe o H_2O_2 formado durante a β -oxidação de ácidos graxos (HOLTMAN et al., 1994). Os glioxissomos tem as enzimas do ciclo do glioxalato que convertem os lipídeos de reservas em açúcares, que são usados na germinação e crescimento da planta (DEL RIO et al., 2002). Peroxissomos não especializados são também encontrados em órgãos que não contém glioxissomos nem peroxissomos foliares. A proliferação rápida dos peroxissomos em plantas sob condições de estresse abiótico foi confirmada em folhas de *P. sativum* sujeitas ao Cd (ROMERO-PUERTAS et al., 1999; LOPEZ-HUERTAS, 2000). Além disso, a indução dos genes da biogênese dos peroxissomos (PEX) por H_2O_2 foi também demonstrada em células animais e vegetais, indicando que o H_2O_2 é a molécula sinalizadora que leva a proliferação dos peroxissomos (DEL RIO et al., 2002).

Três isoenzimas da CAT geneticamente distintas foram caracterizadas em plantas de *Z. mays* (SCANDALIOS et al., 1994), enquanto apenas duas foram identificadas em *H. vulgare* (SKADSEN; SCHULZE-LEFERT; HERBST, 1995). A CAT é codificada por uma família

multigênica em *A. thaliana* que inclui três genes codificando subunidades individuais *CAT1*, *CAT2* e *CAT3*, que se associam para formar a princípio seis isoenzimas diferentes (FRUGOLI et al., 1996). Suspeita-se que devido as diferentes funções das catalases, muitas plantas contém múltiplas isoenzimas de CAT, de duas em *H. vulgare* (AZEVEDO et al., 1998) até 12 *B. juncea* (FRUGOLI et al., 1996). As isoenzimas da CAT tem sido estudadas extensivamente em vegetais superiores (POLIDOROS; SCANDALIOS, 1999). Uma classe específica da CAT é localizada nos tecidos vacuolares e deve estar envolvida na proteção contra estresses ambientais (WILLEKENS et al., 1994). As isoenzimas da CAT apresentaram ser reguladas temporariamente e espacialmente e devem responder diferencialmente a luz (WILLEKENS et al., 1994; SKADSEN; SCHULZE-LEFERT; HERBST, 1995).

A CAT não é presente nos cloroplastos (ASADA, 1999). A CAT foi encontrada na matriz mitocondrial de coração de rato, mas ainda não foi identificada na mitocôndria vegetal (MOLLER, 2001).

A atividade da CAT mostrou ser variável na presença do Cd. A atividade da CAT declinou em folhas de girassol (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996), *P. vulgaris* (CHAQUI et al., 1997), *Phaseolus aureus* (SHAW, 1995), *Lemna minor* (MOHAN; HOSETTI, 1997), *A. lividus* (BHATTACHARJEE, 1998), *G. max* roots (BALESTRASSE et al., 2001), *P. australis* (IANNELLI et al., 2002) e *C. annuum* (LEÓN et al., 2002) quando submetidas ao tratamento com Cd.

De outra forma, a CAT aumentou consideravelmente em *Agropyron repens* (BREJ, 1998), *H. annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1999), nódulos *G. max* (BALESTRASSE et al., 2001), folhas de *O. sativa* (HSU; KAO, 2004), variedades tolerantes de *S. tuberosum* (STROINSKI; KOZLOWSKA, 1997), raízes de plântulas de *R. sativus* (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001) e culturas de calos *in vitro* de *Saccharum officinarum* (FORNAZIER et al., 2002b) tratados com Cd. Em outros casos, a atividade da CAT mostrou permanecer inalterada sob estresse de Cd em folhas de *G. max* (FERREIRA et al., 2002) e em caules de *P. vulgaris*, apesar da atividade da CAT reduzir nas raízes e folhas (CHAQUI et al., 1997).

Linhagens de células tolerantes ao Ni de *Echinochloa colona in vitro* tiveram aumento na atividade da CAT e linhagens de células não tolerantes ao Ni de *E. colona in vitro* tiveram redução na atividade da CAT após exposição ao Ni (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001),

mostrando a variação genotípica da resistência ao Ni dentro da espécie e a respectiva correlação com a atividade da CAT.

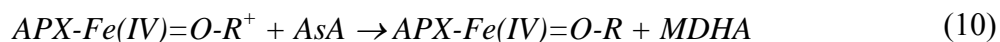
A elevação da atividade da CAT foi associada com a toxidez do Ni na hiperacumuladora *T. goensigense* (FREEMAN et al., 2004), em raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e parte aérea (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998). Entretanto, a exposição ao Ni reduziu a atividade da CAT em *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000). A atividade da CAT não foi afetada pela presença de Ni em *A. bertolonii* e *N. tabacum* (BOOMINATHAN; DORAN, 2002). Estes dados demonstraram a variação e importância da CAT na resposta ao estresse oxidativo induzido pelo Cd e Ni.

1.5.2.3 Ascorbato peroxidase (APX)

O ascorbato é um composto vegetal chave envolvido na defesa contra danos oxidativos e fotooxidativos, através de sua ação como substrato para a degradação do H_2O_2 pela ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11). Além disso, análises indicaram a importância da APX na remoção do H_2O_2 em tecidos fotossintéticos, quando tecidos verdes foram comparados com tecidos não verdes. A elucidação da localização celular e a função da APX citossólica em tecidos não fotossintéticos de tubérculos de *S. tuberosum*, demonstrou a função da rota da APX contra danos oxidativos em células não fotossintetizantes (ASADA, 1992).

A APX é uma heme peroxidase com uma sequência de aminoácidos indicando que a APX pertence a mesma superfamília de heme-peroxidases (Classe I), como a citocromo C peroxidase (CPX). A APX ocorre também em mamíferos e é inibida por cianeto, azida, reagentes modificadores de tiol, hidroxiuréia, p -aminofenol, e tiols via um mecanismo suicida, enquanto que o elicitador ácido salicílico não inibe a atividade enzimática (ASADA, 1999).

O ciclo catalítico da APX é um mecanismo peroxidase ping-pong. Na conversão do H_2O_2 em H_2O um intermediário de dois elétrons oxidado da APX é formado [form. (9)], que então oxida o ascorbato, sucessivamente produzindo duas moléculas de MDHA, sendo reduzida de novo [form. (10 e 11)] (ASADA, 1999).



A APX e a CAT pertencem a duas diferentes classes de enzimas de limpeza do H_2O_2 devido suas diferentes afinidades, com a APX tendo o K_m na gama μM e a CAT na gama mM. Portanto, enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das EAOs para a sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de EAOs gerado durante o estresse (MITTLER, 2002), entretanto deve-se considerar o papel da APX no combate ao estresse oxidativo gerado em compartimentos que não possuem a CAT, como os cloroplastos. O H_2O_2 funciona como uma molécula sinalizadora em plantas e também está envolvido na regulação da expressão gênica por estresses abióticos (NEILL et al., 2002), evidenciando a importância da APX na modulação fina do H_2O_2 .

A família da peroxidase APX consiste a princípio de cinco isoformas diferentes (ASADA, 1992), incluindo isoenzimas do tilacóide, estroma, citosol, peroxissomo e apoplasto (MIYAKE; ASADA, 1992; JIMÉNEZ et al., 1997). As várias isoformas da APX respondem diferencialmente a sinais metabólicos e ambientais (KUBO et al., 1995) e aumentos na abundância de transcritos não foram necessariamente acompanhados por aumentos correspondentes na atividade enzimática (MITTLER; ZILINSKAS, 1992). A redução da expressão gênica da APX citossólica é um evento importante na morte celular programada induzida por choque térmico de calor em células de tabaco BY-2 (VACCA et al., 2004).

Os cloroplastos contém a APX em duas isoformas, ligadas ao tilacóide (tAPX) e enzimas solúveis no estroma (sAPX). A princípio, metade da APX cloroplastidial é tAPX, mas a taxa tAPX/sAPX varia de acordo com a espécie vegetal e, possivelmente, idade da folha, mas a taxa biossintética das duas APXs é controlada por “splicing” alternativo (ASADA, 1999). A tAPX se liga ao estroma do tilacóide onde o complexo PSI está localizado, enquanto que a sAPX está localizada no estroma (ASADA, 1999). A tAPX é um fator limitante do sistema antioxidante sob estresse fotooxidativo nos cloroplastos e a atividade aumentada da tAPX funciona para manter o estado redox do ascorbato sob certas condições de estresse (YABUTA et al., 2002). As plantas também contém as isoformas citossólicas de APX (cAPX), que possui uma sequência de amino

ácidos diferente quando comparada com as APXs cloroplastidiais, participando na limpeza do H_2O_2 em outros compartimentos que os cloroplastos. A cAPX é um homodímero e seu doador de elétrons não é tão específico ao ascorbato, diferente da tAPX e sAPX (ASADA, 1999).

A atividade da APX mostrou ser aumentada após o tratamento com Cd em *Ceratophyllum demersum* (ARAVIND; PRASAD, 2003), folhas de *P. sativum* (ROMERO-PUERTAS et al., 1999), *P. aureus* (SHAW, 1995), parte aérea de plantas de *P. vulgaris* (CHAOUI et al., 1997), e em plântulas verdes de cevada, entretanto, nas raízes a atividade da APX foi reduzida na maior concentração de Cd testada (HEGEDUS; ERDEI; HORVATH, 2001). Efeitos opostos da exposição ao Cd na qual a atividade da APX foi inibida, foram também demonstrados em plantas de *Populus x canescens* (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2002) e folhas de *H. annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996).

A atividade da APX aumentou sob tratamento com Ni em raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e parte aérea (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998), *Alissum argenteum* e *A. maritimum* (SCHICKLER; CASPI, 1999). Entretanto, a atividade da APX foi reduzida em decorrência da exposição ao Ni em *A. bertolonii* e *N. tabacum* (BOOMINATHAN; DORAN, 2002).

A atividade da APX aparenta ser dependente da concentração do metal aplicado, apresentando resultados controversos (BALESTRASSE et al., 2001; ZHANG et al., 2003), mostrando a variação da resposta da atividade da APX frente a toxidez dos metais pesados. A atividade da APX foi aumentada nas folhas de *T. aestivum* sensível ao sal sob estresse combinado de NaCl e Cd, indicando que ambos fatores abióticos combinados aumentaram a produção de H_2O_2 , especialmente nas folhas do genótipo sensível ao sal (MUHLING; LAUCHLI, 2003). Além disso, a APX em *C. demersum* mostrou um aumento muito alto na atividade em plantas tratadas com Cd + Zn, quando comparadas com plantas tratadas somente com Cd ou Zn, indicando a elevação da atividade antioxidante pelo Zn, contra o estresse oxidativo induzido pelo Cd (ARAVIND; PRASAD, 2003). Portanto, a APX desempenha uma importante rota na desintoxicação do H_2O_2 , sob condições de estresse, amenizando a fitotoxidez dos metais pesados e outros agentes que causam estresse oxidativo, sendo de vital importância em compartimentos celulares que não contém CAT.

1.5.2.4 Glutathione redutase (GR)

A glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína que cataliza a redução dependente de NADPH da GSSG para a forma reduzida GSH. Apesar da enzima ser sintetizada no citoplasma, pode ser direcionada tanto para o cloroplasto quanto para a mitocôndria (MULLINEAUX; CREISSEN, 1997). Em vegetais superiores, a GR é envolvida na defesa contra o estresse oxidativo, enquanto que a GSH desempenha uma rota importante dentro do sistema celular, que inclui a participação no ciclo ascorbato-glutathione (NOCTOR et al., 2002) e a síntese de fitoquelatinas (INOUE, 2005).

Dois genes codificadores da GR foram identificados em *A. thaliana*, *gr1* e *gr2*, que codificam as isoenzimas de GR citossólica e plastidial, respectivamente (XIANG; OLIVER, 1998), entretanto nas plantas a maior parte da atividade da GR é localizada nos cloroplastos (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994). Embora a GR de folha de *P. sativum* possa ser revelada em uma única banda de 55 kDa em SDS-PAGE, o PAGE de duas dimensões revelou a presença de mais de 8 isoenzimas em folhas de *N. tabacum* e a princípio 6 isoenzimas de GR foram detectadas em PAGE nativo revelado para a atividade de GR (CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994).

Foi sugerido que a inibição pelo GSSG de enzimas consumidoras de NADPH, a não ser aquelas envolvidas na desintoxicação das EAOs, é um resultado da necessidade de conservar o NADPH (MOLLER, 2001). A maioria dos estudos determinando a resposta da GR a exposição ao Cd ou ao Ni, mostraram que a atividade da GR aumenta como parte da defesa contra o estresse destes metais, uma alteração que mostrou ser geralmente dependente da dosagem e variável ao longo do tempo. A atividade da GR aumentou na presença do Cd em *R. sativus* (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001), *Crotalaria juncea* (PEREIRA et al., 2002), *S. tuberosum* (STROINSKI; KUBIS; ZIELEZINSKA, 1999), plantas de *C. annuum* (LEÓN et al., 2002), *G. max* (FERREIRA et al., 2002), folhas de *S. officinarum* (FORNAZIER et al., 2002a), *Phaeodactylum tricomutum* (MORELLI; SCARANO, 2004) e do Ni em *C. juncea* (CARDOSO et al., 2005), *Thlaspi goesingense* (FREEMAN et al., 2004), *A. Argenteum*, *A. maritimum* (SCHICKLER; CASPI, 1999), *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000), parte aérea de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998) e ecotipos tolerantes e sensíveis ao Ni de *S. paradoxa* (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001). Concentrações elevadas de GSH conferiram tolerância ao

estresse oxidativo induzido pelo Ni em *A. thaliana* transgênica (FREEMAN et al., 2004). Tais resultados sugerem que a GR está respondendo ao estresse destes metais para manter a glutathione em sua forma reduzida para a incorporação em fitoquelatinas que formam complexo com o Cd (INOUE, 2005) e formação de complexo GSH-Ni (RAO; SRESTY, 2000), diminuindo a quantidade de íons livres, reduzindo assim a toxicidade e/ou ativação do ciclo ascorbato-glutathione para a remoção do H₂O₂ induzido pelos metais (ASADA, 1999), principalmente em compartimentos que não possuem a CAT.

1.5.2.5 Guaiacol peroxidase (GOPX)

A guaiacol peroxidase (GOPX, EC 1.11.1.7) isolada de plantas, é distinguível da APX tanto na sequência de amino ácidos quanto nas funções fisiológicas (CHEN; SANO; ASADA, 1992). A GOPX participa em reações metabólicas como a biossíntese de lignina, decomposição do ácido indol acético (AIA), e defesa contra patógenos. O mecanismo peroxidase ping-pong da GOPX, é o mesmo da APX, mas a GOPX prefere doadores de elétrons aromáticos como o guaiacol e o pirogallol, e oxida o ascorbato usualmente em uma taxa ao redor de 1% do guaiacol (ASADA, 1999). Entretanto, uma peroxidase que oxida alta taxa de ascorbato com uma sequência de amino ácidos similar a GOPX foi encontrada em *Camellia sinensis* (KVARATSKHELIA; WINKEL; THORNELEY, 1997).

Experimentos baseados no tratamento de plantas aos metais pesados Cd e Ni indicaram que a atividade da GOPX é variável entre e dentro das espécies, e depende da concentração de metal aplicado e o tempo de exposição.

O tratamento com Cd mostrou aumentar a atividade da GOPX em *P. aureus* (SHAW, 1995), *P. vulgaris* (CHAOUI et al., 1997), *T. aestivum* (MILONE et al., 2003) e plantas de *C. annuum* (LEÓN et al., 2002). Entretanto, ocorreram reduções na atividade da GOPX como resposta do estresse de Cd em nódulos e raízes de soja (BALESTRASSE et al., 2001), *P. sativum* (SANDALIO et al., 2001) e girassol (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 2002). Em *A. thaliana*, a atividade da GOPX foi particularmente maior na maior e menor concentrações de Cd testadas (SKORZYNSKA-POLIT; DRAZKIEWICZ; KRUPA, 2003).

O tratamento com Ni aumentou a atividade da GOPX em *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000), parte aérea de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998), *T. aestivum*

(PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992), em raízes dos ecotipos tolerantes e sensíveis ao Ni de *S. paradoxa* (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001) e em linhagens celulares tolerantes ao Ni de *E. colona in vitro* (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001). De outra forma, a atividade da GOPX foi reduzida após exposição ao Ni em *Pinus sylvestris* (KUKKOLA; RAUTIO; HUTTUNEN, 2000) e linhagens celulares não tolerantes ao Ni de *E. colona in vitro* (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001). Além disso, a atividade da GOPX não foi afetada pelo Ni em raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001).

1.6 Aspectos gerais da espécie *Coffea Arabica* e da cv. Catuaí Vermelho

O café tem grande importância econômica e social para o Brasil, o principal produtor e exportador desta mercadoria. O café é a segunda maior mercadoria no mundo depois do petróleo, sendo a principal cultura em diversos países. Está estimado que apenas no Brasil, aproximadamente seis milhões de pessoas são envolvidas com o negócio do café, desde a produção no campo até o comércio do produto final (SILVAROLLA; MAZZAFERA; FAZUOLI, 2004).

No gênero *Coffea*, que pertence a família rubiaceae, estão reunidas as mais importantes espécies de cafeeiros, sendo que apenas as espécies *C. arabica* e *C. canephora* têm relevância no mercado internacional do produto. A espécie *C. arabica* representa cerca de 80% da área plantada de café no Brasil e aproximadamente 75% do café comercializado mundialmente. Esta espécie é utilizada principalmente pela indústria de torrefação e moagem devido à melhor qualidade de sua bebida (RUGGIERO, 2002).

C. arabica é uma espécie tetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) e autógama, sendo que a taxa de fecundação cruzada gira em torno de 10% (CARVALHO; KRUG, 1949). O centro de origem desta espécie é o continente africano, mais especificamente a Etiópia (RUGGIERO, 2002).

Na década de 30, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) elaborou um extenso programa de melhoramento do cafeeiro que vem sendo conduzido até os dias atuais. Desde então, um grande número de cultivares foram selecionados e constituem atualmente a base da agricultura nacional e de diversos outros países produtores (CARVALHO; FAZUOLI, 1993). O cultivar Catuaí Vermelho foi obtido a partir do cruzamento entre as cultivares Mundo Novo IAC

379-19 e Caturra Amarelo IAC 476-11. O objetivo deste cruzamento era reunir o vigor vegetativo e a elevada produtividade do cultivar Mundo Novo e o porte reduzido do cultivar Caturra Amarelo, caracterizado pelo menor comprimento dos internódios, devido a expressão do gene *Ct* (CARVALHO; MÔNACO, 1972). Dessa forma, a cultivar Catuaí Vermelho é caracterizada pelo porte baixo em função do comprimento reduzido dos internódios, frutos de coloração vermelho, ciclo de maturação dos frutos tardio e susceptibilidade à *Hemileia vastatrix*, agente causador da ferrugem (AGUIAR, 2001), apresentando boa qualidade da bebida (RUGGIERO, 2002).

1.7 Suspensão celular como modelo de estudo

Na suspensão celular é possível cultivar células em meio líquido, sob condições de agitação contínua e temperatura controlada, propiciando o contato integral da célula com o meio, evitando possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura. Independente da espécie utilizada é essencial que as células da suspensão se dividam e cresçam ativamente. As células de café em suspensão utilizadas neste estudo possuem alta taxa de multiplicação celular, podendo servir como modelo de diversos estudos (FILIPPI, 2004).

A utilização da suspensão celular como modelo de estudo da análise antioxidante em café em resposta a metais pesados, permite diversas vantagens em relação à planta inteira. Considerando o fato de o café ser uma planta perene, a utilização da suspensão celular promove uma maior facilidade da condução do experimento, principalmente devido a menor necessidade de tempo e espaço, reduzindo também o volume de solução contendo o metal pesado, contribuindo para diminuir a geração de resíduos.

Além disso, as condições ambientais são mais controladas na suspensão celular, que não sofrem variação de luminosidade, fotoperíodo, temperatura, umidade e outros fatores ambientais que podem interferir nos resultados das análises efetuadas com plantas.

Como os diferentes tecidos de uma planta respondem de forma diferencial a toxidez dos metais pesados sobre o metabolismo oxidativo, a possibilidade da obtenção de material mais uniforme na suspensão celular permite um maior grau de confiabilidade dos resultados.

Outro ponto importante, é que a suspensão celular permite controlar os componentes do meio de cultura de maneira mais uniforme e controlada em relação ao substrato utilizado para as plantas. Além disso, a aplicação dos tratamentos com metais é mais fácil e controlada no sistema

de suspensão celular, devido à lixiviação, quelação e outros fatores que podem alterar a concentração e disponibilidade dos metais em substratos utilizados para plantas.

Devido à possibilidade da interferência de microorganismos sobre o metabolismo oxidativo, principalmente os fitopatógenos, a suspensão celular apresenta ainda a vantagem das condições estéreis de cultivo.

Referências

ACEVEDO, A.; SCANDALIOS, J.G. Antioxidant gene (Cat/Sod) expression during the process of accelerated senescence in silks of the maize ear shoot. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 34, n. 4, p. 539–545, 1996.

AGUIAR, A.T.E. **Utilização de descritores na caracterização de cultivares e linhagens de café Arábica**. 2001. 100p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2001.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331–1341, 2002.

AMADO FILHO, G.M.; ANDRADE, L.R.; KAREZ, C.S.; FARINA, M.; PFEIFFER, W.C. Brown algae species as biomonitors of Zn and Cd at Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, Oxford, v. 48, p. 213-224, 1999.

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.

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

APOSTOL, I.; HEINSTEN, P.F.; LOW, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells – role in defense and signal transduction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 109–116, 1989.

ARAVIND, P.; PRASAD, M.N.V. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 391-397, 2003.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 235-241, 1992.

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

ASTDR. **Toxicological profile for nickel**, 262 p., 1997. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov>>. Acesso em: 22 out. 2005.

ATSDR. **Toxicological profile for cadmium**, 397 p., 1999. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov>>. Acesso em: 22 out. 2005.

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 leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

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

BACCOUCH, S.; CHAOUI, E.L.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 7, p. 1085-1097, 2001.

BALESTRASSE, K.B.; GARDEY, L.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 497-504, 2001.

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

BARONDEAU, D.P.; KASSMANN, C.J.; BRUNS, C.K.; TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism, **Biochemistry**, Washington, v. 43, p. 8038-8047, 2004.

BARTOLI, C.G.; GOMEZ, F.; MARTINEZ, D.E.; GUIAMET, J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1663–1669, 2004.

BECK, A.; LENDZIAN, K.; OVEN, M.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. Phytochelatase catalyses key steps in turnover of glutathione conjugates. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 423-431, 2003.

BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 40, p. 131-135, 1998.

BOOMINATHAN, R.; DORAN, P.M. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. **New Phytologist**, Oxford, v. 156, p. 205-215, 2002.

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

BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DERYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VANMONTAGU, M.; INZÉ, D. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, p. 1723-1732, 1991.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BOWLER, C.; VANCAMP, W.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide-dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 13, n. 3, p. 199-218, 1994.

BREJ, T. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. populations from the Legnica copper smelter area, Lower Silesia. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warsaw, v. 67, p. 325–333, 1998.

BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences**, PARIS, v. 322, p. 43-54, 1999.

BROWN, P.H.; WELCH, R.M.; CARY, E.E. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 801-803, 1987.

CARDOSO, P.F; GRATÃO, P.L.; GOMES-JUNIOR, R.A.; MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 267-272, 2005.

CARVALHO, A.; KRUG, C.A. **Agentes de polinização da flor do cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1. ed. Campinas: Bragantia: 1949, v. 9, p. 11-24.

CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. Café. In: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. (ED.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Campinas: IAC, 1993. cap. 2, p. 29-76.

CARVALHO, C.E.V.; LACERDA, L.D. HEAVY-METAL CONTAMINATION OF THE MARINE BIOTA ALONG THE RIO-DE-JANEIRO COAST, SE-BRAZIL. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 57-8, p. 645-653, 1991.

CARVALHO, A.; MONACO, L.C. **Transferência do fator caturra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica***. Campinas: Bragantia, 1972, v. 31, p. 379-399.

CASARINI, D.C.P. et al (Ed.). **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2001, 73 p.

CETESB. Disponível em: < <http://www.cetesb.sp.gov.br> >. Acesso em: 9 dez. 2005

CHAOUI, A. MAZHOUDI, S.; GHORBAL, 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**, Clare, v. 127, p. 139-147, 1997.

CHEN, G.X.; SANO, S.; ASADA, K. The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from tea has high degree of homology to that of cytochrome c peroxidase from yeast. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 33, p. 109-116, 1992.

CHEN, H.Y.; LIU, W.Y. The molecular evolution of superoxide dismutase based on its distribution and structure. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, Beijing, v. 23, p. 408-413, 1996.

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.249-252, 1995.

CHEN, C.; WANG, Y.; LIN, Y. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes, **Archives of Toxicology**, New York , v. 77, p. 123-130, 2003.

CHEN, C.; HUANG, Y.; LIN, T. Association between oxidative stress and cytokine production in nickel-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 356, p. 127-132, 1998.

CHO, U.; SEO, N. Oxidative stress in *A. thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, Clare, v. 168, p. 113-120, 2005.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 159-182, 2002.

COBBETT, C.S.; MAY, M.J.; HOWDEN, R.; ROLLS, B. The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 73-78, 1998.

COBBETT, C.S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 825-832, 2000.

CONKLIN, P.L.; LAST, R.L. Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 203–212, 1995.

CORPAS, F.J.; TRELEASE, R.N. Differential expression of ascorbate peroxidase and a putative molecular chaperone in the boundary membrane of differentiating cucumber seedling peroxisomes. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 153, p. 332–338, 1998.

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

CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. **Free Radical Research**, Berks, v. 31, p. S39-S43, 1999.

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

DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Roots signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 76, p. 42-55, 1991.

DAVISON, P.A.; HUNTER, C.N.; HORTON, P. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 418, p. 203–206, 2002.

DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1255 – 1272, 2002.

DELAUNAY, A.; ISNARD, A.D.; TOLEDANO, M. B. H_2O_2 sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. **EMBO Journal**, Oxford, v. 19, p. 5157 – 5166, 2000.

DI TOPPI, L.S.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 105-130, 1999.

DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1101 – 1109, 2001.

DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. The effect of copper (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 135-142, 1999.

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

EDERLI, L.; REALE, L.; FERRANTI, F.; PASQUALINI, S. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, p. 66–74, 2004.

FADZILLAH, N.M.; GILL, V.; FINCH, R.P.; BURDON, R.H. Chilling oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Planta**, New York, v. 199, p. 552-556, 1996.

FERREIRA, R.R.; FORNAZIER, R.F.; VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.

FILIPPI, S.B. **Papel da alantoína na nutrição nitrogenada e respostas antioxidativas de células de café em suspensão**. 2004. 91 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; VITORIA, A.P.; MOLINA, S.M.G.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 91-97, 2002a.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; PEREIRA, G.J.G.; MOLINA, S.M.G.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 125-131, 2002b.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 241-254, 1997.

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

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, p. 355–364, 2003.

FREEMAN, J.L.; PERSANS, M.W.; NIEMAN, K.; ALBRECHT, C.; PEER, W.; PICKERING, I.J.; SALT, D.E. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2176-2191, 2004.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 27, p. 97-112, 1995.

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, 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.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of cadmium ions on antioxidant defence system in sunflower cotyledons. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, p. 49–55, 1999.

GALLEGO, S.; BENAVIDES, M.; TOMARO, M. Involvement of an antioxidant defence system in the adaptative response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht ,v. 36, p. 267–273, 2002.

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Clare, v. 121, p. 151-159, 1996.

GALLI, U; SCHUEPP, H; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium and copper-treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, New York , v. 198, p. 139-143, 1996.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, Washington, v. 13, p. 591-602, 1998.

GIMENO-GRACÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 92, p. 19-25, 1996.

GOLDSBROUGH, P.B. Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. In: TERRY, N.; BANUELOS, G.S. (Ed). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Boca Raton: CRC Press, 1998. p. 221-233.

GOMEZ, L.D.; NOCTOR, G.; KNIGHT, M.R.; FOYER, C.H. Regulation of calcium signaling and gene expression by glutathione. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1851-1859, 2004.

GONNELLI, C.; GALARDI, F.; GABBRIELLI, R. Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 507-514, 2001.

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

GRIES, G.E.; WAGNER, G.J. Association of nickel versus transport of Cd and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. **Planta**, New York, v. 204, p. 390-396, 1998.

GRILL, E.; WINNACKER, E-L; ZENK, M.H. Phytochelatins, a class of heavy-metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. **Proceedings of The National Academy Of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 84, p. 439-443, 1987.

GUO, T.R.; ZHANG, G.P.; ZHOU, M.X.; WU, F.B.; CHEN, J.X. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 258, p. 241-248, 2004.

HARADA, E.; CHOI, Y.E.; TSUCHISAKA, A.; OBATA, H.; SANO, H. Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, p. 655-661, 2001.

- HASSAN, M.J.; ZHANG, G.P.; WU, F.B.; WEI, K.; CHEN, Z.H. Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science – Zurić Pflanzenernahrung Bodenkunde**, Weinheim, v. 168, p. 255-261, 2005.
- HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; HORVATH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Clare, v. 160, p. 1085-1093, 2001.
- HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; JANDA, T.; TOTH, E.; HORVATH, G.; DUDITS, D. Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. **Plant Science**, Clare, v. 166, p. 1329-1333, 2004.
- HEISS, S.; SCHÄFER, H.J.; HAAG-KERWER, A.; RAUSCH, T. Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: Cadmium differentially affects the expression of a putative low affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 39, p. 847–857, 1999.
- HEISS, S.; WACHTER, A.; BOGS, J.; COBBETT, C.; RAUSCH, T. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1833–1839, 2003.
- HESSE, H.; NIKIFOROVA, V.; GAKIERE, B.; AND HOEFGEN R. Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1283-1292, 2004.
- HOLTMAN, W.L.; HEISTEK, J.C.; MATTERN, K.A.; BAKHUIZEN, R.; DOUMA, A.C. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**, Clare, v. 99, p. 43–53, 1994.
- HOWDEN, R.; GOLDSBROUGH, P.B.; ANDERSEN, C.R.; COBBETT, C.S. Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 1059-1066, 1995.
- HSU, Y.T.; KAO, C.H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 42, p. 227–238, 2004.

IANNELLI, M.A., PIETRINI, F., FORE, L., PETRILLI, L.; MASSACCI, A. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 977-982, 2002.

IGAMBERDIEV, A.U.; LEA, P.J. The Role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 651-674, 2002.

INGLE, R.A.; MUGFORD, S.T.; REES, J.D.; CAMPBELL, M.M.; SMITH, J.A.C. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2089-2106, 2005.

INOUE, M. Phytochelatins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 65-78, 2005.

IRETSKAYA, S.N.; CHIEN, S.H.; MENON, R.G. Effects of acidulation of high cadmium containing phosphate rocks on cadmium uptake by upland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 201, p. 183-188, 1998.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.A.; DEL RÍO, L.A.; SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 275-284, 1997.

JORDÃO, C.P.; DA SILVA, A.C.; PEREIRA, J.L.; BRUNE, W. Chromium contamination in river waters caused by tanneries in the State of Minas Gerais, Brazil. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, p. 47-52, 1999.

KEFALA, M.I.; ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A. Biosorption of cadmium ions by Actinomycetes and separation by flotation. **Environmental Pollution**, OXFORD, v. 104, p. 283-293, 1999.

KESSELER, A.; BRAND, M.D. The mechanism of the stimulation of state-4 respiration by cadmium in potato-tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, MONTROUGE, v. 33, p. 519-528, 1995.

KIDD, P. S.; DÍEZ, J.; MARTÍNEZ, C. M. Tolerance and bioaccumulation of heavy metals in five populations of *Cistus ladanifer* L. subsp. *ladanifer*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 258, p.189-205, 2004.

KINGSTON-SMITH, A.H.; FOYER, C.H. Overexpression of Mn-superoxide dismutase in maize leaves leads to increased monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase activities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1867–1877, 2000.

KLIEBENSTEIN, D.J.; MONDE, R.A.; LAST, R.L. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An acyclic enzyme family with disparate regulation and protein localization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 637-650, 1998.

KRAMER, U.; PICKERING, I.J.; PRINCE, R.C.; RASKIN, I.; SALT, D.E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi species*, **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 1343-1353, 2000.

KROTZ, R.M.; EVANGELOU, B.P.; WAGNER, G.J. Relationships between cadmium, zinc, Cd-peptide, and organic acid in tobacco suspension cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 780-787, 1989.

KRUPA, Z.; BARANOWSKA, M.; ORZOT, D. Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? **Acta Physiologiae Plantarum**, Warsaw, v. 18, p. 147-151, 1996.

KUBO, A.; SAJI, H.; TANAKA, K.; KONDO, N. Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 29, p. 479-489, 1995.

KUKKOLA, E.; RAUTIO, P.; HUTTUNEN, S. Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings, **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 197-210, 2000.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p.1237-1245, 1997.

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**, Dordrecht, v. 200, p. 241-250, 1998.

LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signaling: the latest news. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 323–328, 2004.

LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Review Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 305-315, 2004.

LARCHER, W.S. Stress in plants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 74, p. 158-167, 1987.

LEE, S.; MOON, J.S.; KO, T.S.; PETROS, D.; GOLDSBROUGH, P.B. KORBAN, S.S. Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 656–663, 2003.

LEE, S.M.; LEUSTEK, T. The effect of cadmium on sulfate assimilation enzyme in *Brassica juncea*. **Plant Science**, Clare, v. 141, p. 201-207, 1999.

LEITA, L.; CONTIN, M.; MAGGIONI, A. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in root, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Science**, v. 77, p. 139-147, 1991.

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

LESHEM, Y.Y.; KUIPER, P.J.C. Is there a GAS (general adaptation syndrome) response to various types of environmental stress? **Biologia Plantarum**, Prague, v. 38, p. 1–18, 1996.

L'HUILLIER, L.; D'AUZAC, J.; DURAND, M.; MICHAUD-FERRIERE, N. Nickel effects on two maize (*Zea mays*) cultivars: growth, structure, Ni concentration and localization. **Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v. 74, p. 1547-1554, 1996.

LICHTENTHALER, H.K.; RINDERLE, U. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. **CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 19, p. 29–85, 1988.

LICHTENTHALER, H.K. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 148, p. 4-14, 1996.

LIU, J.K.; YEO, H.C.; DONIGER, S.J.; AMES, B.N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation Gas chromatography mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 245, p. 161-166 , 1997.

LOEWUS, F.A. Ascorbic acid and its metabolic products. In: PREISS, J. (Ed.). **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1988, p. 85-107.

LOMBI, E., ZHAO, F.J., DUNHAM, S.J., MCGRATH, S.P. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. **New Phytologist**, New York, v. 145, p. 11-20, 2000.

LOPEZ-HUERTAS, E., CHARLTON, W.L.; JOHNSON, B.; GRAHAM, I.A.; BAKER, A. Stress induces peroxisome biogenesis genes. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 19, p. 6770-6777, 2000.

LYNN, S.; YEW, F.H.; CHEN, K.S.; JAN, K.Y. Reactive oxygen species are involved in nickel inhibition of DNA repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 29, p. 208-216, 1997.

MALAN, H.L.; FARRANT, J.M. Effects of the metal pollutants cadmium and nickel on soybean seed development. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, p. 445-453, 1998.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrients e metais pesados, mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Produquímica, 1994. 153p.

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

MANNAZZU, I.; GUERRA, E.; FERRETI, R.; PEDICONI, D.; FATICHENTI, F. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. **Biochimica et Biophysica Acta**, San Diego, v. 1475, p. 151-156, 2000.

MATTIAZZO-PREZOTTO, M. E. **Comportamento de cobre, Cd, Cr, Ni e Zn adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. 1994. 197p. Tese (Livre-Docência)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y.; McINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of The National Academy Of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 96, p. 8271–8276, 1999.

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

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 244, p. 6049-6050, 1969.

McKERSIE, B.D.; LESHEM, Y.Y. **Stress and Stress Coping in Cultivated Plants**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 1-256.

MEHLER, A.H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts .1. mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 33, p. 65–77, 1951.

MELO, L.C.; DOS SANTOS, J.B.; RAMALHO, M.A.P. Choice of parents to obtain common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars tolerance to low temperatures at the adult stage. **Brazilian Journal of Genetics**, Riberão Preto, v. 20, p. 283-293, 1997.

MILLAR, A.H.; MITTOVA, V.; KIDDLE, G.; HEAZLEWOOD, J.L.; BARTOLI, C.G.; THEODOULOU, F.L.; FOYER, C.H. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 443–447, 2003.

MILONE, M.M.T.; SGHERRI, C.; CLIJSTERS, H.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidante responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 265-276, 2003.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B.A. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 267, p. 21802–21807, 1992.

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

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product the monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 33, p. 541-553, 1992.

MOHAN, B.S.; HOSETTI, B.B. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 98, p. 233-238, 1997.

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

MORAN, J.F.; ITURBE-ORMAETXE, I.; MATAMOROS, M.A.; RUBIO, M.C.; CLEMENTE, M.R.; BREWIN, N.J.; BECANA, M. Glutathione and homogluthathione synthetases of legume nodules: cloning, expression, and subcellular localization. **Plant Physiology**, **Rockville**, v. 124, p. 1381–1392, 2000.

MORELLI, E.; SCARANO, G. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricomutum*. **Plant Science**, Clare, v. 167, p. 289-296, 2004.

MUHLING, K.H.; LAUCHLI, A. Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheats genotypes differing in salt tolerance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, p. 219–231, 2003.

MULLINEAUX, P.M.; CREISSEN, G.P. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: SCANDALIOS, J.C. (Ed.). **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 667-713, 1997.

MURPHY, A.; ZHOU, J.; GOLDSBROUGH, P.B.; TAIZ, L. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p.1293-1301, 1997.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237–1247, 2002.

NEILL, S.O.; GOULD, K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, p. 865-873, 2003.

NETO, J.A.B.; SMITH, B.J.; MCALLISTER, J.J. Heavy metal concentrations in surface sediments in a nearshore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 109, p.1-9, 2000.

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

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.

OLMOS, E.; MARTINEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 291–301, 2003.

PALACIOS, G.; MATAIX, J. The influence of organic amendment and nickel pollution on tomato fruit yield and quality. **Journal of Environmental Science and Health part b-pesticides food contaminants and Agricultural Wastes**, New York, v. 34, p. 133-150, 1999.

PALACIOS, G.; GOMEZ, I.; CARBONELL-BARRACHINA, A.; PEDRENO, J.N.; MATAIX, J. Effect of nickel concentration on tomato plant nutrition and dry matter yield. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 10, p. 2179-2191, 1998.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; CISCATO, N. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, n. 12, p. 1611-1627, 1996.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 15, p. 719-725, 1992.

PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; GOMEZ, E.; TIEMANN, K.J.; PARSONS, J.G.; CARRILO, G. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 119, p. 291-301, 2002.

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, n. 1, p. 123-132, 2002.

PERIN, G.; FABRIS, R.; MANENTE, S.; WAGENER, A.R.; HAMACHER, C.; SCOTTO, S. A five-year study on the heavy-metal pollution of Guanabara Bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical. **Water Research**, Oxford, v. 31, p. 3017-3028, 1997.

PINHERO, R.G.; RAO, M.V.; PALIYATH, G.; MURR, D.P.; FLETCHER, R.A. Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 695-704, 1997.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; LEITAO, M.A.S.; OKAMOTO, O.K.; MORSE, D.; COLEPICCOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, Malden, v. 39, p. 1008-1018, 2003.

POLIDOROS, N.A.; SCANDALIOS, J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 106, p. 112-120, v. 1999.

POLACCO, J.C. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 827-830, 1977.

POSCHENRIEDER, C.H.; BARCELÓ, J. Water relations in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V.; HAGEMEYER, J (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1999, pp.207–230.

POULIK, Z. The danger of cumulation of nickel in cereals on contaminated soil. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 63, p. 25-29, 1997.

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

RAO, K.V.M.; SRESTY, T.V.S. Antioxidative parameters in seedling of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) Millsbaugh to Zn and Ni stress. **Plant Science**, Clare, v. 157, n. 1, p. 113-128, 2000.

RAUSER, W.E. Phytochelatin and related peptides. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1141-1149, 1995.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; MCCARTHY, I.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; CORPAS, F.J.; GOMEZ, M.; DEL RIO, L.A. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. **Free Radical Research**, Berks, v. 31, p. 25-31, 1999.

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; London; New York; Tokio: Elsevier, 1991. v. 22, 291 p.

RUEGSEGGER, A.; SCHMUTZ, D.; BRUNOLD, C. Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p.1579-1584, 1990.

RUGGIERO, L.M.C. **Caracterização de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) através de marcadores moleculares obtidos com a técnica AFLP**. 2002. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2002.

SAJWAN, K.S.; ORNES, W.H.; YOUNGBLOOD, T.V.; ALVA, A.K. Uptake of soil applied cadmium, nickel and selenium by bush beans. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 91, p. 209-217, 1996.

SALT, D.E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N.P.; DUSHENKOV, B.A.; ENSLEY, B.D.; CHET, H.; RASKIN, H. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology**, New York, v. 13, p. 468-474, 1995.

SALT, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-668, 1998.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R.; DAS, P. Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of *Echinochloa colona* (L.) Link *in vitro*, **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, p. 1281-1290, 2001.

SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.C.; 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, p. 2115-2126, 2001.

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

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULIUNEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Flórida: CRC Press, 1994, p. 275-315.

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.

SCHMÖGER, M.E.V.; OVEN, M.; GRILL, E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 793-802, 2000.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; NIKOLOVA, P.; RUDOLF, C.; POLLE, A. Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populusxcanescens* roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 577-584, 2002.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. A plant response to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by micorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1351-1365, 2002.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D.L.; POLLE, A. Cadmium- induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 887-898, 2001

SHAW, B.P. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedling of *Phaseolus aureus*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 37, p. 587-596, 1995.

SILVAROLLA, M.B., MAZZAFERA, P., FAZUOLI, L.C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, London, v. 429, p. 826-826, 2004.

SINGH, P.K., TEWARI, R.K. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 24, p. 107-112, 2003.

SINHA, S.; PANDEY, K. Nickel induced toxic effects and bioaccumulation in the submerged plant, *Hydrilla verticillata* (L.F.) royle under repeated metal exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 71, p. 1175-1183, 2003.

SKADSEN, R.W.; SCHULZE-LEFERT, P.; HERBST, J.M. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 29, p. 1005-1014, 1995.

SKORZYNSKA-POLIT, E.; DRAZKIEWICZ, M.; KRUPA, Z. The activity of the antioxidante system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 47, p. 71–78, 2003.

SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P.L.; LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 437-467, 2001.

SOBKOWIAK, R., DECKERT, J., 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 767-772.

SPEISER, D.M.; ABRAHAMSON, S.L.; BANUELOS, G.; OW, D.W. *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 817-821, 1992.

SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D.; DWIVEDI, U.N. Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in responses to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* – an angiospermic parasite. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, p. 665-674, 2004.

STROINSKI, A.; KOZLOWSKA, M. Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warsaw, v. 66, p. 189–195, 1997.

STROINSKI, A.; KUBIS, J.; ZIELEZINSKA, M. Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 21, p. 201-207, 1999.

TORSETHAUGEN, G.; PITCHER, L.H.; ZILINSKAS, B.A.; PELL, E.J. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 529-537, 1997.

VACCA, R.A.; DE PINTO, M.C.; VALENTI, D.; PASSARELLA, S.; MARRA, E.; DE GARA, L. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1100-1112, 2004.

VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutases. . In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 343-364.

VATAMANIUK, O.K.; MARI, S.; LANG, A.; CHALASANI, S.; DEMKIV, L.O.; REA, P.A. Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis – Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of arabidopsis thaliana PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. **Journal Of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, p. 22449–22460, 2004.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: A review. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 44, p. 301-316, 1997.

VERNOUX, T.; WILSON, R.C.; SEELEY, K.A.; REICHHELD, J.P.; MUROY, S.; BROWN, S.; MAUGHAN, S.C.; COBBETT, C.S.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; MAY, M.J.; SUNG, Z.R. The root meristemless1/cadmium sensitive2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 97–109, 2000.

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

VÖGELLI-LANGE, R.; WAGNER, G.J. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 114, p. 11-18, 1996.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F.V. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1227-1236, 2002.

WAGNER, G.L. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 51, p. 173-212, 1993.

WEBER, M.; HARADA, E.; VESS, C.V.; ROEPENACK-LAHAYE, E.; CLEMENS, S. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 269–281, 2004.

WILLEKENS, H.; LANGEBARTELS, C.; TIRÉ, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **Proceedings Of The National Academy of Sciences of the United States Of America**, Washington, v. 91, p. 10450-10454, 1994.

WILLIAMSON, J.D.; SCANDALIOS, J.G. Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 351-358, 1992.

WITTE, C.P.; TILLER, S.; ISIDORE, E.; DAVIES, H.V.; TAYLOR, M.A. Analysis of two alleles of the urease gene from potato: polymorphisms, expression, and extensive alternative splicing of the corresponding mRNA. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 91-99, 2005.

WONG, H.L.; SAKAMOTO, T.; KAWASAKI, T.; UMEMURA, K.; SHIMAMOTO, K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1447-1456, 2004.

WU, F.; ZHANG, G.; DOMINY, P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 67-78, 2003.

XIANG, C.; OLIVER, D.J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1539-1550, 1998.

YABUTA, Y.; MOTOKI, T.; YOSHIMURA, K.; TAKEDA, T.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, p. 915-925, 2002.

YANG, S.H. Plant tolerance to nickel toxicity: II. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, n. 2, p. 265-279, 1996.

YANG, X.E.; LONG, X.X.; YE, H.B.; HE, Z.L.; CALVERT, D.V.; STOFFELLA, P.J. Cadmium tolerance and hiperaccumulation in a new Zn-hiperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 259, p. 181-189, 2004.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 223-234, 2000.

ZÁMOCKÝ, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, Oxford, v. 72, p. 19-66, 1999.

ZHANG, F.Q.; SHI, W.Y.; JIN, Z.X.; SHEN, Z.G. Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, p. 1779-1788, 2003.

ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, E.A.H.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Over expression of glutathione synthetase in *Indian mustard* enhances cadmium accumulation and tolerance oxygen. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 73-79, 1999a.

ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, E.A.H.; TARUN, A.; WEBER, S.U.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Cadmium tolerance and accumulation in *Indian mustard* is enhanced by overexpressing - glutamylcysteine synthetase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 1169–1177, 1999b.

2 METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE CULTURAS DE CÉLULAS DE CAFÉ EM SUSPENSÃO EM RESPOSTA AO CÁDMIO (Cd)

Resumo

Foi investigada a resposta antioxidante de culturas em suspensão celular de café (*Coffea arabica* L.) ao cádmio (Cd). O Cd acumulou rapidamente nas células e este acúmulo foi diretamente correlacionado com o aumento na concentração de CdCl₂ aplicado no meio externo. Na dosagem 0,05 mM CdCl₂, o crescimento celular foi estimulado, mas na dosagem 0,5 mM CdCl₂, a taxa de crescimento foi reduzida. As alterações no metabolismo do oxigênio ativo foram detectadas pela análise visual, assim como pelo aumento na peroxidação lipídica, na maior concentração de CdCl₂ utilizada. A atividade das enzimas Catalase (CAT; EC 1.11.1.6), glutathiona redutase (GR; EC 1.6.4.2) e superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) aumentou, particularmente na maior concentração de CdCl₂. A atividade da ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) foi elevada por 0,05 mM CdCl₂, mas não pode ser detectada em células cultivadas na maior concentração de CdCl₂ após 24 h de cultivo, enquanto que a guaiacol peroxidase (GOPX; EC 1.11.1.7) não demonstrou um padrão claro de resposta ao tratamento com Cd. A análise por PAGE não desnaturante seguido pela revelação da atividade enzimática, apresentou uma isoenzima da CAT, nove isoenzimas da SOD e quatro isoenzimas da GR. As isoenzimas da SOD foram diferencialmente afetadas pelo tratamento com CdCl₂ e uma isoenzima da GR mostrou responder mais especificamente ao CdCl₂. Os resultados sugerem que o tratamento com a maior concentração de CdCl₂ induziu estresse oxidativo. O CdCl₂ na concentração 0,05 mM não induziu estresse oxidativo, e a principal resposta aparenta ser via a indução da atividade da APX, SOD e CAT para a remoção das espécies ativas de oxigênio (EAOs), e pela indução da GR para assegurar a disponibilidade de glutathiona reduzida para a síntese de fitoquelatinas, que também deve estar relacionado com a inibição da atividade da APX, provavelmente devido ao esgotamento da glutathiona e do ascorbato na maior concentração de CdCl₂.

Palavras chave: *Coffea arabica*; Estresse oxidativo, Peroxidação lipídica; Enzimas antioxidantes; Cádmio; Catalase; Glutathiona Redutase; Superóxido Dismutase; Guaiacol Peroxidase; Ascorbato Peroxidase.

Abstract

The antioxidant responses of coffee (*Coffea arabica* L.) cell suspension cultures to cadmium (Cd) were investigated. Cd accumulated very rapidly in the cells and this accumulation was directly correlated with an increase in applied CdCl₂ concentration in the external medium. At 0.05 mM CdCl₂, growth was stimulated, but at 0.5 mM CdCl₂, the growth rate was reduced. An alteration in activated oxygen metabolism was detected by visual analysis as well as by an increase in lipid peroxidation at the higher CdCl₂ concentration. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6), glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) and superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity increased, particularly at the higher concentration of CdCl₂. Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) activity was higher at the lower CdCl₂ concentration used, but could not be detected in cells growing in the higher CdCl₂ concentration after 24 h of growth, whilst guaiacol peroxidase (GOPX; EC 1.11.1.7) did not show a clear response to Cd treatment. An analysis by non-denaturing PAGE followed by staining for enzyme activity revealed one CAT isoenzyme, nine SOD isoenzymes and four GR isoenzymes. The SOD isoenzymes were differently affected by CdCl₂ treatment and one GR isoenzyme was shown to specifically respond to CdCl₂. The results suggest that the higher concentrations of CdCl₂ may lead to oxidative stress. CdCl₂ at 0.05 mM did not induce lipid peroxidation and the main response appears to be via the induction of SOD, APX and CAT activities for the removal of reactive oxygen species (ROS), and by the induction of GR to ensure the availability of reduced glutathione for the synthesis of Cd-binding peptides, which may also be related to the inhibition of APX activity probably due to glutathione and ascorbate depletion at the higher CdCl₂ concentration.

Keywords: *Coffea arabica*; Oxidative stress, Lipid peroxidation; Antioxidant Enzymes; Cadmium; Catalase; Glutathione Reductase; Superoxide Dismutase; Guaiacol Peroxidase; Ascorbate Peroxidase.

2.1 Introdução

Nas últimas décadas ocorreu um grande consenso sobre a poluição ambiental, devido aos efeitos diretos na saúde humana e também uma causa de perda nas produções agrícolas (JARUP, 2003; SILVA; BARROCAS; JACOB, 2005). O Cd é um poluente tóxico para humanos, animais e plantas (SANDALIO et al., 2001), mesmo em pequenas dosagens (BALESTRASSE et al., 2001).

A bioconcentração de Cd em plantas agrícolas, hortícolas, silvícolas e plantas daninhas, e em macrófitos aquáticos é de especial interesse ao bem estar humano, devido ao impacto na saúde humana, através da entrada na cadeia alimentar (BENAVIDES; GALLEGRO; TOMARO, 2005). Naturalmente, as quantidades de Cd nos solos são normalmente baixas, entretanto a concentração pode ser significativamente aumentada por atividades como mineração de zinco, fundição de ferro, o uso de lodo de esgoto como fertilizante na agricultura (LOMBI et al., 2000), a combustão de combustíveis fósseis, pesticidas (YANG; ROSE; BATTARBEE, 2002), aplicação de fertilizantes fosfatados (IRETSKAYA; CHIEN; MENON, 1998), impurezas dos fertilizantes (SCHICKLER; CASPI, 1999) e processos industriais (GRATÃO et al., 2005a).

O Cd é um elemento não essencial e altamente tóxico para todas as classes de organismos vivos (BAILEY et al., 2003). O impacto da absorção de Cd por células vivas mostrou ser drástico, normalmente levando à morte celular, dependendo da dosagem e tempo de exposição ao metal (BENAVIDES; GALLEGRO; TOMARO, 2005). Em geral, o Cd em plantas reduz o crescimento, tanto em raízes quanto na parte aérea, devido à supressão na taxa de alongação das células (DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999). As diferentes espécies vegetais exibem respostas variadas a toxidez do Cd (GRATÃO et al., 2005b). Apesar das informações focadas na relação entre metais pesados e estresse oxidativo em plantas avaliadas em anos mais recentes, ainda é difícil desenhar uma conclusão geral sobre as concentrações críticas de metais tóxicos nos solos (ROMERO-PUERTAS et al., 2004).

O O_2 molecular é relativamente não reativo em seu estado natural, mas a produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs), como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e oxigênio “singlet” (O_2^1), é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico (GRATÃO et al., 2005b). Todas as EAOs são extremamente reativas e citotóxicas a todos os organismos. De maneira geral, é assumido que o $\bullet OH$ e o O_2^1 são tão

reativos que suas produções devem ser minimizadas (SCANDALIOS, 2005). Sob condições normais de crescimento, o acúmulo de EAOs em células é baixo. Entretanto, fatores ambientais adversos que perturbam a homeostase celular induzem a produção de EAOs, levando ao estresse oxidativo (FIDALGO et al., 2004; ANZA; RIGA; GARBISU, 2005). Os metais pesados, incluindo o Cd, também causam estresse oxidativo, conforme foi observado em muitas espécies vegetais (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001; BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; DUCIC; POLLE, 2005; GRATÃO et al., 2005b).

A destruição eficiente das EAOs requer a ação de diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia. Os principais mecanismos de limpeza das EAOS das plantas incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona redutase (GR) e guaiacol peroxidase (GOPX). Estas enzimas demonstraram serem afetadas pela exposição ao Cd em diversas espécies vegetais estudadas (GRATÃO et al., 2005b). As SODs são consideradas a primeira linha de defesa contra as EAOs, sendo responsáveis pela dismutação do $O_2^{\bullet -}$ para formar H_2O_2 e O_2 (GRATÃO et al., 2005b). A CAT, a APX e a GOPX são enzimas que catalisam a conversão do H_2O_2 a água e O_2 (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). A GR catalisa a redução dependente de NADPH da glutathiona oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (MULLINEAUX; CREISSEN, 1997). A APX e a GR, assim como a GSH, são importantes componentes do ciclo ascorbato-glutathiona, responsável pela remoção do H_2O_2 em diferentes compartimentos celulares (FOYER; NOCTOR, 2005). A GSH é também o substrato para a biossíntese de fitoquelatinas, que são envolvidas na desintoxicação do Cd, através da ligação do Cd em grupos sulfidril livres (INOUE, 2005).

Apesar da presença de metais tóxicos, particularmente o Cd (LOMBI et al., 2000), publicações recentes propuseram a utilização de lodo de esgoto como um fertilizante para muitas culturas, desde que ele contém consideráveis quantidades de nitrogênio (N), fósforo (P) e micronutrientes como o zinco (Zn) (BETTIOL; CAMARGO, 2000). O café é a principal cultura em diversos países e depois do petróleo, é a segunda principal mercadoria no mundo (SILVAROLLA; MAZZAFERA; FAZUOLI, 2004). Seguindo estudos em outras culturas, o lodo de esgoto foi testado como fertilizante em café e demonstrou não afetar a qualidade da bebida (MARTINS; CAMARGO; BATAGLIA, 2005).

Todavia, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do CdCl_2 sobre o metabolismo de células de café, com atenção especial aos parâmetros fisiológicos relacionados ao crescimento celular, peroxidação lipídica e o sistema antioxidante enzimático.

2.2 Resultados

2.2.1 Efeito do CdCl_2 no crescimento celular, acúmulo de Cd nas células e indução do estresse oxidativo

A análise do crescimento das células em suspensão de café cultivadas em zero (controle), 0,05 e 0,5 mM CdCl_2 baseada na massa fresca, mostrou um estímulo no crescimento considerável pela dosagem 0,05 mM CdCl_2 , enquanto uma inibição do crescimento foi observada na dosagem 0,5 mM CdCl_2 , quando comparados ao controle (Figura 1).

O acúmulo de Cd nas culturas em suspensão celular foi determinado após o cultivo em 0,05 e 0,5 mM CdCl_2 . Foi visto que o Cd foi absorvido rapidamente pelas células em ambas as concentrações de CdCl_2 testadas. Nestas células, ocorreu um acúmulo intenso logo após 12 h de exposição ao metal, principalmente na maior concentração de CdCl_2 , que aumentou até 96 h de cultivo (Figura 1).

Alterações no metabolismo do oxigênio ativo, causado por Cd, foram também detectadas. A primeira evidência foi o aparecimento de uma coloração marrom-acinzentada nas células, na maior dosagem de CdCl_2 (Figura 2). Outro indicativo adicional foi observado pela medição da peroxidação lipídica, determinada pela quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A dosagem 0,05 mM CdCl_2 não afetou o conteúdo de TBARS, indicando que esta concentração de Cd não deve ter induzido estresse oxidativo. Entretanto, o tratamento com 0,5 mM CdCl_2 induziu a elevação na quantidade de TBARS após 24 h de exposição ao CdCl_2 (Figura 1).

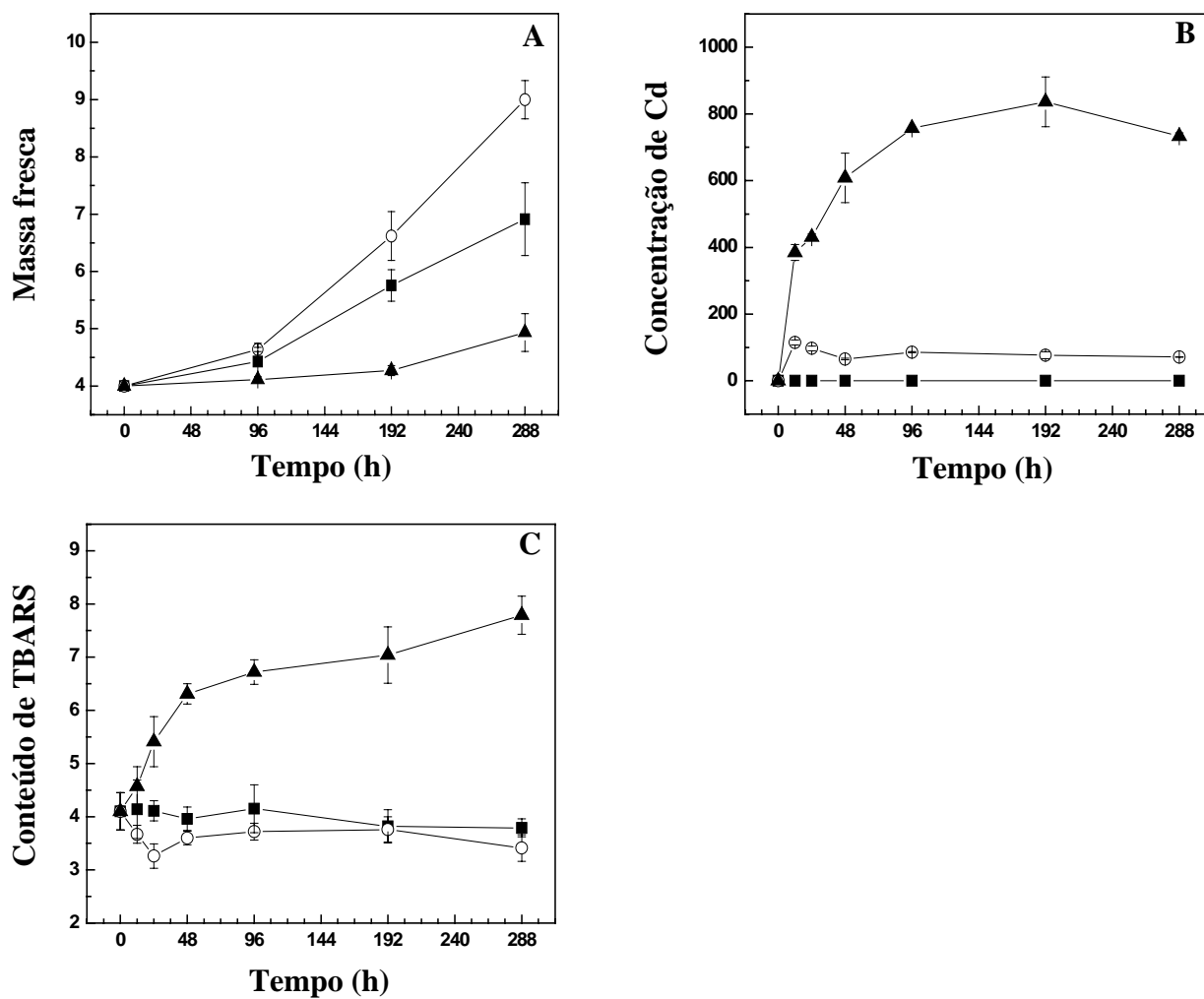


Figura 1 - Crescimento celular (g de massa fresca) (A); Acúmulo de Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca) (B) e conteúdo de TBARS ($\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca) (C) em células de café crescidas num período de 288 h em três concentrações de CdCl₂. Zero (controle) CdCl₂ (■), 0,05 mM CdCl₂ (○) e 0,5 mM CdCl₂ (▲). Os valores representam a média de quatro repetições \pm SEM para crescimento celular, média de duas repetições \pm SEM para acúmulo de Cd e média de três repetições \pm SEM para conteúdo de TBARS

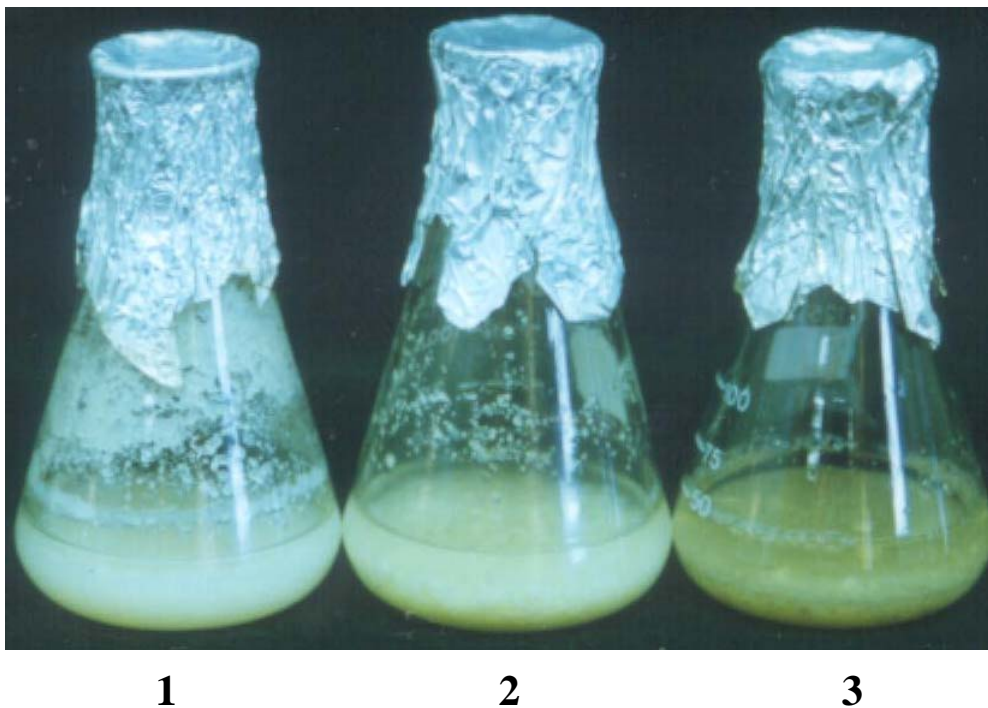


Figura 2 - Culturas em suspensão celular de café cultivadas por 12 dias em zero (controle) CdCl_2 (1), 0,05 mM CdCl_2 (2) e 0,5 mM CdCl_2 (3)

2.2.2 Atividade da SOD

A revelação da atividade da SOD em PAGE não desnaturante revelou a existência de diversas isoenzimas em células de café (Figura 3), incluindo seis Mn-SODs (bandas I, II, III, IV, V and VI) e três Fe-SODs (bandas VII, VIII and IX), mas nenhuma isoenzima Cu/Zn-SOD foi detectada (Figura 4). A revelação da atividade da SOD revelou duas isoenzimas Mn-SOD principais (bands V and VI) nas células de café, com a banda V exibindo um aumento na atividade em decorrência à exposição ao CdCl_2 . Entretanto, a banda VI foi inibida após 12 h e 24 h de tratamento com 0,05 mM CdCl_2 , e após 12 h e 192 h de tratamento com 0,5 mM CdCl_2 . Um aumento geral na atividade nas células de café tratadas com CdCl_2 foi observado, particularmente devido à banda V da SOD. As quatro isoenzimas Mn-SODs menores (bandas I, II, III e IV) foram inativadas pelo CdCl_2 na menor concentração durante as primeiras 24 h de tratamentos e em todos os tempos testados na maior concentração. As isoenzimas Fe-SODs VII, VIII e IX não

foram afetadas por qualquer concentração de CdCl_2 durante todo o tempo de tratamento (Figura 3).

2.2.3 Atividade da CAT

As mudanças na atividade da CAT foram determinadas durante o ciclo de cultivo celular em presença de CdCl_2 . A revelação da atividade da CAT em PAGE (Figura 3) mostrou a presença de apenas uma isoenzima da CAT nas células de café em cultura de suspensão celular, que também mostrou aumentar em ambas as concentrações de Cd utilizadas, exibindo um padrão na variação da atividade quase idêntico ao observado com a análise em espectrofotômetro (Figura 5).

A análise da atividade total da CAT indicou que houve um pico de acréscimo após 12 h de tratamento em ambas as concentrações de CdCl_2 testadas, que foi então reduzido ao nível do controle após 24 h de tratamento (Figura 5). Seguindo isto, ocorreu um aumento de três e cinco vezes na atividade da CAT nas células tratadas com 0,05 e 0,5 mM CdCl_2 respectivamente, enquanto que a atividade da CAT no controle não foi alterada ao longo do tempo de cultivo.

2.2.4 Atividade da GR

A revelação da atividade da GR revelou a presença de quatro isoenzimas da GR nas células de café (bandas I, II, III e IV) (Figura 3). Todas as bandas da GR exibiram aumentos na intensidade em resposta ao tratamento com CdCl_2 , mas uma (a banda IV mais eletropositiva) aparentou responder especialmente ao CdCl_2 .

A atividade total da GR analisada em espectrofotômetro, aumentou consideravelmente em decorrência da concentração e do tempo de exposição ao CdCl_2 (Figura 5), exibindo uma tendência na variação da atividade similar a da atividade da CAT, particularmente para o controle e a concentração 0,5 mM CdCl_2 .

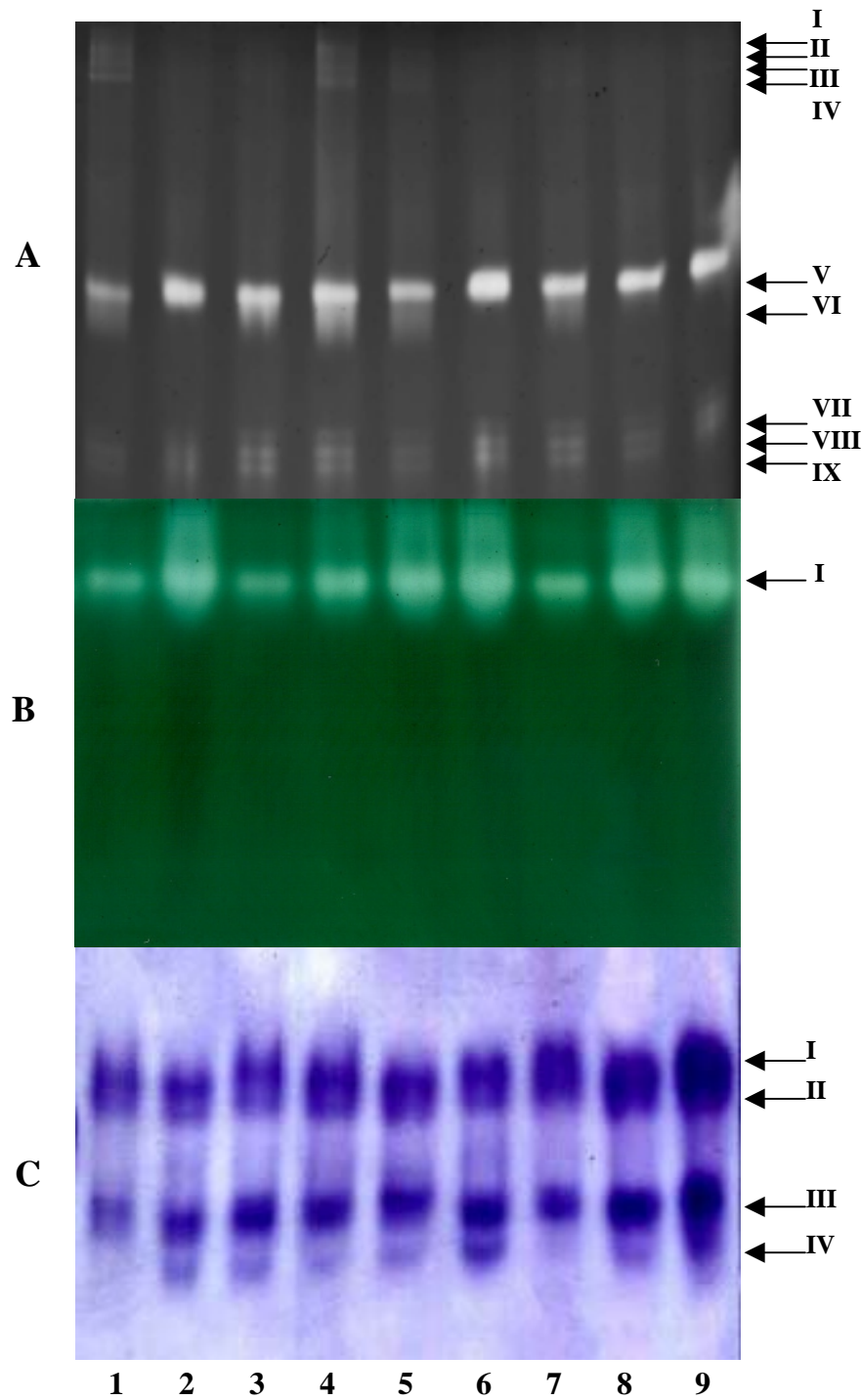


Figura 3 – Perfil da atividade em PAGE da SOD (A), CAT (B) e GR (C) isoladas de células de café. Linha 1, zero (controle) mM CdCl₂ após 96 h; linha 2, 12 h, linha 3, 24 h, linha 4, 192 h e linha 5, 288 h de cultivo em 0,05 mM CdCl₂; linha 6, 12 h, linha 7, 24 h, linha 8, 192 h e linha 9, 288 h de cultivo em 0,5 mM CdCl₂

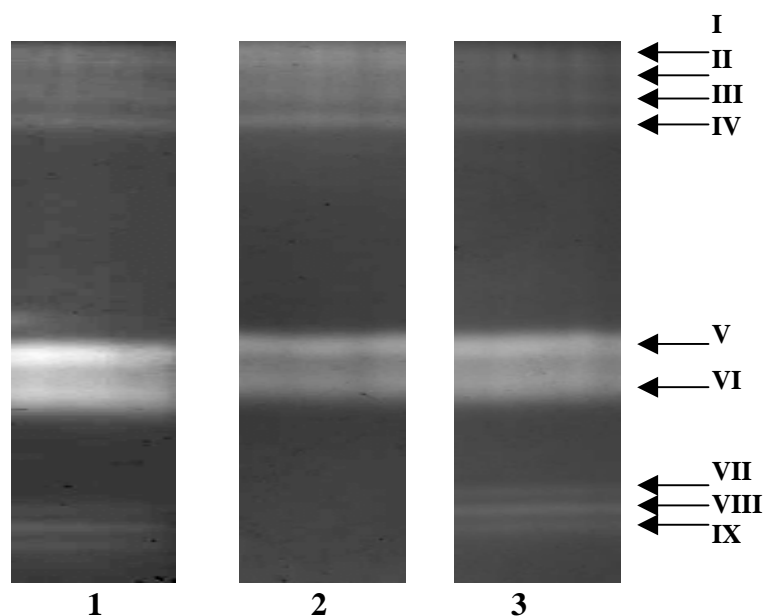


Figura 4 - Extrato celular de café aplicado no gel e revelado para a identificação das isoenzimas individuais da SOD. Linha 1, controle da atividade da SOD; linha 2, tratamento com 5 mM de H₂O₂ e linha 3, tratamento com 2 mM KCN

2.2.5 Atividade da APX

Após uma queda inicial, a atividade da APX aumentou nas células de café submetidas a 0,05 mM CdCl₂ e alcançou um aumento de três vezes após 288 h de tratamento, em relação ao controle (Figura 5). De outra maneira, a atividade da APX nas células sujeitas a 0,5 mM CdCl₂ não pôde ser detectada após 24 h de tratamento e permaneceu no nível zero durante todo o experimento (Figura 5).

2.2.6 Atividade da GOPX

A atividade da GOPX foi também determinada nos extratos das células de café em culturas em suspensão expostas ao CdCl₂ (Figura 5). A atividade da GOPX exibiu variações erráticas durante as primeiras 96 h de exposição ao CdCl₂, mas após, a concentração 0,05 mM CdCl₂ induziu um aumento constante na atividade enzimática. Nas células submetidas a 0,5 mM CdCl₂, a atividade da GOPX seguiu as tendências das células controle.

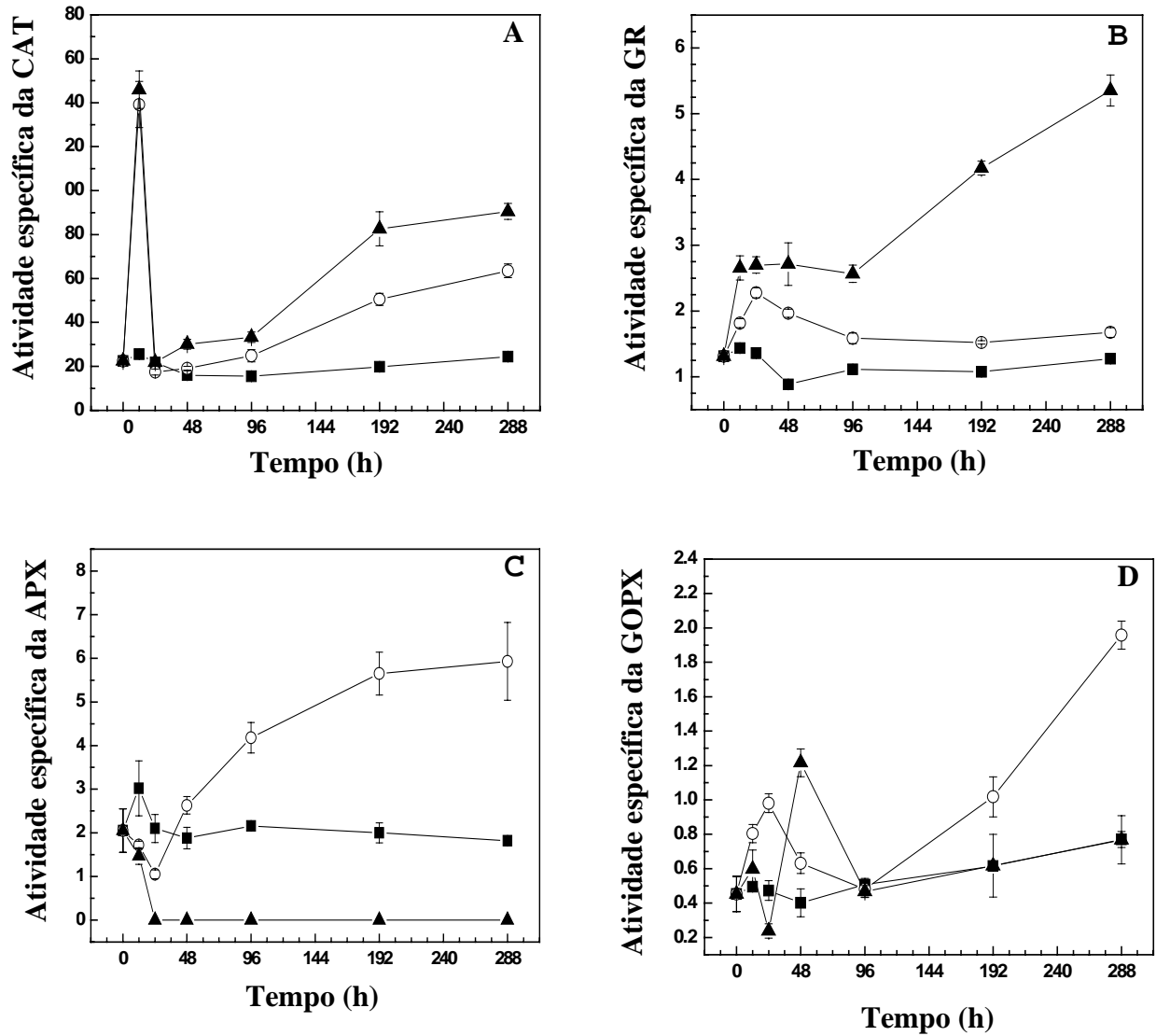


Figura 5 - Atividade específica da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) (A); GR ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) (B); APX ($\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$) (C) e GOPX ($\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$) (D) em células de café cultivadas num período de 288 h em três concentrações de CdCl_2 . Zero (controle) CdCl_2 (■), 0,05 mM CdCl_2 (○) e 0,5 mM CdCl_2 (▲). Os valores representam a média de três repetições $\pm\text{SEM}$

2.3 Discussão

O Cd é um metal tóxico e sua presença no ambiente está constantemente aumentando, afetando o crescimento de culturas importantes. O efeito de muitos metais pesados tem sido testado no crescimento de espécies vegetais, entretanto, apenas em alguns casos, culturas de células em suspensão têm sido testadas, e até o momento não foram encontradas informações de estudos de Cd induzindo estresse oxidativo em café.

Martins; Camargo e Bataglia (2005) fertilizaram plantas de café por quatro anos consecutivos com lodo de esgoto e avaliaram a qualidade da bebida em dois anos seguintes. Eles não encontraram nenhum efeito depreciativo decorrente da aplicação de lodo de esgoto na qualidade do café. Eles consideraram que isto poderia ser interpretado como um aspecto benéfico, podendo ser adotado por produtores de café como uma prática agrícola. Infelizmente, os autores não avaliaram o acúmulo de metais tóxicos em partes da planta, particularmente nos grãos.

Está demonstrado que o acúmulo de Cd é proporcional à concentração de Cd no meio e/ou ao período de incubação em plantas de *A. thaliana* (WÓJCIK; TUKIENDORF, 2004), plântulas de *Zea mays* (WÓJCIK; TUKIENDORF, 2005) e em culturas em suspensão de *Glycine max* (SOBKOWIAK, R.; DECKERT, 2003). Foi determinado que, o Cd entrou rapidamente nas células de café, sendo acumulado em altas concentrações. O destino final do metal não foi determinado, mas sabe-se que o Cd pode ser complexado por fitoquelatinas e sequestrado no vacúolo (INOUE, 2005).

A inibição do crescimento e a redução na produção de biomassa são respostas gerais de plantas superiores à toxidez dos metais pesados (GRATÃO et al., 2005b). Em plantas, o Cd pode causar a inibição do crescimento da parte aérea e das raízes, conforme observado em diversas espécies testadas (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001; VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001; FERREIRA et al., 2002; HASSAN et al., 2005; WÓJCIK; VANGRONSVELD; TUKIENDORF, 2005; WÓJCIK; TUKIENDORF, 2005), mas a rota do Cd com respeito ao crescimento celular continua um tema em debate. Alguns estudos demonstraram que o Cd pode tanto estimular ou inibir o crescimento de culturas de células *in vitro* (SOBKOWIAK, R.; DECKERT, 2003). Por enquanto, concentrações baixas de Cd mostraram estimular o crescimento de cultura de células de *Saccharum officinarum* (FORNAZIER et al., 2002), *G. max* (SOBKOWIAK, R.; DECKERT,

2003) e o fungo *Aspergillus nidulans* (GUELFY et al., 2003), que foi substituído por efeito inibitório no crescimento com o aumento na concentração e acúmulo de Cd (FORNAZIER et al., 2002; SOBKOWIAK, R.; DECKERT, 2003; GUELFY et al., 2003). Além disso, uma baixa concentração de Cd demonstrou estimular a síntese de DNA (VON ZGLINICKI et al., 1992).

O Cd e o zinco (Zn) têm propriedades estruturais e químicas similares e está demonstrado que o Cd pode substituir funcionalmente o Zn na célula (SOBKOWIAK, R.; DECKERT, 2003). O Zn é um metal essencial que é envolvido na ligação de uma vasta gama de fatores de transcrição à região regulatória de genes e é também um componente de enzimas que participam na replicação do DNA e tradução do mRNA (SOBKOWIAK, R.; DECKERT, 2003). O efeito estimulatório da baixa concentração de Cd no crescimento de culturas de células poderia ser explicado pela competição entre Zn e Cd pelos mesmos locais de ligação (SOBKOWIAK, R.; DECKERT, 2003).

As culturas de células exibiram um visual marrom-acinzentado apenas no tratamento com 0,5 mM CdCl₂. Este escurecimento pode indicar a oxidação de compostos a quinonas citotóxicas. A citotoxidez de quinonas é creditada ser mediada pela sua redução de um elétron a radicais semiquinona, que podem se autooxidar e formar EAOs (ELSTNER, 1987).

Além disso, o Cd produziu um aumento na quantidade de TBARS nas células de café apenas no tratamento com 0,5 mM CdCl₂. A quantidade de TBARS é um índice da peroxidação lipídica, sendo dessa forma, um índice do estresse oxidativo. Aumentos nos níveis de TBARS, seguido da exposição ao Cd foi também observado em *Pisum sativum* (SANDALIO et al., 2001), *Brassica juncea* (SINGH; TEWARI, 2003), *A. thaliana* (CHO; SEO, 2005), *Oriza sativa* (HASSAN et al., 2005), *Hordeum vulgare* (WU; ZHANG; DOMINY, 2003), *Phaseolus vulgaris* (CHAOUI et al., 1997) e *Helianthus annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996). A peroxidação da membrana celular afeta a sua funcionalidade e integridade e pode produzir danos irreversíveis. A peroxidação lipídica pode ser iniciada por EAOs ou pela ação da lipoxigenase (SANDALIO et al., 2001). Os danos peroxidativos do plasmalema podem também levar ao extravasamento do conteúdo celular e dessecação rápida, enquanto que danos a membranas intracelulares podem afetar a atividade respiratória na mitocôndria, causar queda na pigmentação e causar perda na habilidade de fixação fotossintética de carbono nos cloroplastos (SCANDALIOS, 2005).

O Cd é um metal não redox, portanto não pode catalisar reações tipo Fenton, que geram EAOs. A mitocôndria vegetal com respiração ativa produz EAOs em altas taxas e uma cadeia transportadora de elétrons mais reduzida produz mais EAOs, e os principais locais de produção são os complexos respiratórios I e III (BARTOLI et al., 2004). Como as células de café foram cultivadas no escuro neste experimento, é provável que o Cd induziu estresse oxidativo devido à interferência na atividade mitocondrial. O Cd demonstrou aumentar a geração e acúmulo de $O_2^{\bullet-}$ em plântulas de *O. sativa* (SHAH et al., 2001) e folhas de *P. sativum* (ROMERO-PUERTAS et al., 2004) e H_2O_2 em folhas de *P. sativum* (ROMERO-PUERTAS et al., 2004), raízes de *Triticum aestivum* (RANIERI et al., 2005), raízes de *Populus x canescens*, um híbrido de *Populus tremula x Populus alba* (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2002) e em *A. thaliana* (CHO; SEO, 2005).

A atividade e expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes demonstraram mudar em algumas plantas, quando sujeitas a uma série de condições ambientais (GRATÃO et al., 2005b). Dados os mecanismos utilizados pelas plantas para desintoxicar EAOs, é importante estabelecer se a exposição de plantas ao Cd causa um efeito inibidor ou estimulante nas enzimas envolvidas neste processo de desintoxicação.

A enzima SOD é a única que a atividade determina a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss, sendo central nos mecanismos de defesa requeridos para prevenir a formação do radical $^{\bullet}OH$ (GRATÃO et al., 2005b). Três tipos distintos da enzima SOD foram detectados em plantas, podendo ser classificadas de acordo com o cofator metálico, Mn, Fe ou Cu/Zn. A Mn-SOD é localizada nas mitocôndrias e peroxissomos, a Fe-SOD é associada com os cloroplastos, e a abundante Cu/Zn-SODs está localizada no citosol, cloroplastos e peroxissomos (AZEVEDO et al., 1998; DEL RIO et al., 1998). O número de cada tipo de isoenzimas da SOD varia de planta para planta, assim como a abundância relativa de cada uma (GRATÃO et al., 2005b).

Nas células de café, as duas bandas principais V e VI, correspondentes a Mn-SODs foram detectadas em PAGE não desnaturantes. A banda V exibiu um aumento na atividade, sendo responsável pela maioria do aumento na atividade total da SOD nas células de café tratadas com Cd. O aumento na atividade da SOD aparenta ser um importante mecanismo para evitar o estresse oxidativo causado pelo Cd. Em adição, três bandas menores correspondentes à atividade da isoenzima Fe-SOD foram observadas seguindo a eletroforese, mas elas não responderam ao tratamento com Cd. As isoenzimas Fe-SOD foram detectadas em plantas, mas não na mesma

extensão que as Mn-SODs e as Cu/Zn-SODs, e foi demonstrado estarem associadas com os cloroplastos (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001), todavia, estas isoenzimas, no caso das células de café, devem estar associadas com os plastídios. Curiosamente, não foram detectadas isoenzimas Cu/Zn-SOD nos extratos de células de café utilizados neste experimento, apesar do fato delas serem frequentemente abundantes em plantas (AZEVEDO et al., 1998).

O aumento da atividade da SOD dependente do Cd foi também reportado em *S. tuberosum* (STROINSKI; KOZLOWSKA, 1997), *H. vulgare* (GUO et al., 2004), *A. thaliana* (SKORZYNSKA-POLIT; DRAZKIEWICZ; KRUPA, 2003), células cultivadas de *Nicotiana tabacum* (linhagem BY-2) (OLMOS et al., 2003), *H. vulgare* (WU; ZHANG; DOMINY, 2003), plântulas de *O. sativa* (SHAH et al., 2001), na parte aérea de *O. sativa* (HASSAN et al., 2005), e plantas hiperacumuladoras do gênero *Alyssum* (SCHICKLER; CASPI, 1999).

A CAT é uma proteína Fe porfirina tetramérica que catalisa a conversão do H_2O_2 a água e O_2 , sendo abundante nos peroxissomos (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). Nas células de café, o $CdCl_2$ induziu um aumento na atividade da CAT em ambas as concentrações testadas. Esta elevação na atividade da CAT foi também associada com a toxidez de Cd em *Agropyron repens* (BREJ, 1998), *H. vulgare* (WU; ZHANG; DOMINY, 2003), *B. juncea* (SINGH; TEWARI, 2003), *H. annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1999), nódulos de *G. max* (BALESTRASSE et al., 2001), variedades tolerantes de *S. tuberosum* (STROINSKI; KOZLOWSKA, 1997), raízes de plântulas de *Raphanus sativus* (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001) e culturas de calos de *S. officinarum* (FORNAZIER et al., 2002). As plantas contêm múltiplas isoenzimas de CAT, desde duas em *H. vulgare* (AZEVEDO et al., 1998) até mais de doze em *B. juncea* (FRUGOLI et al., 1996), porém, no estudo presente, apenas uma isoenzima principal da CAT pode ser detectada segundo a atividade revelada por PAGE não desnaturante.

De maneira similar a CAT em células de café, a atividade da GR aumentou em decorrência do tratamento com $CdCl_2$, sendo maior quando a concentração e o tempo de exposição foram elevados. A maioria dos estudos demonstrou que a atividade da GR é aumentada como parte da defesa contra o estresse causado pelo Cd, esta alteração foi demonstrada ser geralmente dependente da dose e variável ao decorrer do tempo. Até o momento, a atividade da GR aumentou na presença do Cd em *R. sativus* (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001), *O. sativa* (CARDOSO et al., 2002), *Crotalaria juncea* (PEREIRA et al., 2002), *Solanum tuberosum* (STROINSKI; KUBIS; ZIELEZINSKA, 1999), *Capsicum annuum* (LEÓN et al., 2002), *G. max*

(FERREIRA et al., 2002) e *Phaeodactylum tricomutum* (MORELLI; SCARANO, 2004). Similarmente, o aumento na atividade da GR mostrou ser maior em 40 μM Cd do que em 4 μM Cd em raízes e folhas de *P. sativum* (DIXIT; PANDEY; SHYAM, 2001).

Tais resultados reportados na literatura e também observados neste estudo sugerem que a GR responde ao estresse por Cd devido ao requerimento de glutatona na forma reduzida, como substrato para a síntese de fitoquelatinas, e/ou para o ciclo ascorbato-glutationa que faz a remoção do H_2O_2 . Foi demonstrado que o número de isoenzimas da GR varia entre espécies vegetais (GRATÃO et al., 2005b). A atividade da GR revelada segundo PAGE não desnaturante revelou a princípio três isoenzimas da GR nas células de café não tratadas, com a evidência de uma banda IV devido à exposição ao Cd. A última mostrou o maior aumento induzido pelo Cd, apesar de todas as bandas exibirem aumento na atividade em células tratadas com Cd.

A APX demonstrou desempenhar um importante papel na desintoxicação do H_2O_2 sob condições de estresse abiótico (GRATÃO et al., 2005b). As plantas contêm isoenzimas cloroplastidiais e citossólicas da APX, que possuem diferentes sequências de aminoácidos (ASADA, 1999). Nas células de café, a atividade da APX aumentou no tratamento com 0,05 mM CdCl_2 , mas foi severamente inibida pelo tratamento com 0,5 mM CdCl_2 . Apesar de estas constatações parecerem estranhas, isto também foi observado previamente, quando tratamentos com baixas concentrações de Cd levaram ao aumento da atividade da APX em nódulos e raízes de *G. Max* e a atividade foi reduzida em maiores concentrações de Cd (BALESTRASSE et al., 2001). Esta queda na atividade da APX concomitante com o aumento da concentração de Cd na solução nutritiva foi também observada em cloroplastos de *Cucumis sativus* (ZHANG et al., 2003). A redução na atividade da APX na maior concentração de CdCl_2 deve ter sido ocasionada pelo esgotamento da GSH e uma subsequente redução no ciclo ascorbato-glutationa. A redução na GSH pode ter sido ocasionada pela síntese de fitoquelatinas induzida pelos íons de Cd. Similarmente, as concentrações de ascorbato e GSH demonstraram decair com o aumento na concentração de Cd no meio em *H. vulgare* (WU et al., 2004).

A GOPX isolada de plantas é distinguível da APX tanto em sequência de aminoácidos quanto na função fisiológica, e a GOPX participa em reações metabólicas como a biossíntese de lignina, decomposição do ácido indolacético (AIA) e defesa contra patógenos (VEITCH, 2004). Muitas peroxidases vegetais demonstraram estar envolvidas na resposta de plantas a uma ampla gama de estresses bióticos e abióticos (PASSARDI et al., 2004), incluindo metais pesados

(VALÉRIO et al., 2004). O tratamento com Cd demonstrou aumentar a atividade da GOPX em *Phaseolus aureus* (SHAW, 1995), *P. vulgaris* (CHAOUI et al., 1997) e *T. aestivum* (MILONE et al., 2003). Entretanto, reduções na atividade da GOPX como resposta ao estresse por Cd foi observado em raízes e nódulos de *G. max* (BALESTRASSE et al., 2001) e em *H. annuus* (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 2002). A atividade da GOPX foi detectada nas células de café, mas os dados presentes na Figura 4 não mostraram um padrão claro de resposta ao CdCl₂, quando a concentração e o tempo de exposição utilizados no experimento foram considerados. Estes resultados sugerem que nas células de café, a GOPX não é diretamente envolvida nos mecanismos de resposta ao Cd. Similarmente, a GOPX não mostrou estar relacionada com o estresse oxidativo induzido por Cd em *A. thaliana* (CHO; SEO, 2005).

Concluindo, os dados presentes neste estudo demonstraram que o tratamento com 0,05 mM CdCl₂ não induziu estresse oxidativo de acordo com o crescimento celular e o conteúdo de TBARS, mesmo que algumas alterações nas atividades enzimáticas foram observadas. A tolerância ao estresse oxidativo induzido por Cd deve ser devido ao rápido e significativo aumento na atividade de algumas das principais enzimas antioxidantes APX, CAT, SOD e GR, que são envolvidas na desintoxicação das EAOs.

Por outro lado, o tratamento com 0,5 mM CdCl₂ induziu a produção de EAOs e estabeleceu algum nível de estresse oxidativo, apesar dos aumentos nas atividades da CAT, SOD e GR. Entretanto, a atividade da APX foi fortemente inibida em decorrência da exposição a 0,5 mM CdCl₂, portanto o estresse oxidativo adicional deve ter sido causado principalmente pela queda na atividade da APX. O H₂O₂ é uma EAO tóxica, mas também funciona como uma molécula sinalizadora em plantas, estando também envolvido na regulação da expressão gênica por estresses abióticos (NEILL et al., 2002). Desta maneira, enquanto a APX tem uma maior afinidade pelo H₂O₂ que a CAT, a APX deve ser responsável pela modulação fina do H₂O₂ para a sinalização (MITTLER, 2002), e a redução na atividade em decorrência do tratamento com 0,5 mM CdCl₂ pode ter levado a um desbalanço deletério entre a produção e limpeza do H₂O₂, levando a alterações na sinalização em outros processos fisiológicos nas células de café utilizadas neste experimento.

Recentemente, o projeto genoma do café baseado em EST foi completo no Brasil (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>), onde aproximadamente 140.000 sequências foram analisadas a partir de várias bibliotecas diferentes. Entre estas bibliotecas, algumas foram obtidas

a partir de suspensões celulares tratadas em com condições de estresse como salinidade, alumínio, osmótico e Cd. Todavia, não apenas as variações na atividade como também as isoenzimas detectadas segundo a atividade revelada em PAGE, devem ser comparadas com a expressão de gene(s), fornecendo informações adicionais, para melhorar o entendimento da rota destas enzimas na proteção do café contra os efeitos tóxicos dos metais pesados. Um estudo mais compreensivo neste aspecto está em andamento pelo grupo de pesquisa formado pelos laboratórios dirigidos pelos professores Ricardo Antunes de Azevedo (ESALQ/USP), Paulo Mazzafera (IB/UNICAMP) e Peter Lea (Lancaster University).

2.4. Material e métodos

2.4.1 Precultura das células de café

Folhas do terceiro e quarto par de folhas de *C. arabica* variedade Catuaí Vermelho foram utilizadas para produzir as culturas celulares (NEUENSCHWANDER; BAUMANN, 1992). Os explantes foram mantidos em meio CIM sólido (pH 5.8) contendo sais MS, e suplementado com 10 mg.L⁻¹ de tiamina-HCl, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 4 mg.L⁻¹ de cinetina e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D. As caloses produzidas em 8 a 9 semanas no escuro e apresentando uma coloração amarelo palha e aspectos friáveis foram selecionadas e transferidas para 30 mL de meio CIM líquido e mantidas a 100 rpm no escuro, a 25 ± 2 °C. A cada 15 dias, metade do volume do frasco foi transferido para um novo frasco contendo 15 mL de meio CIM. Neste estágio, agregados grandes foram eliminados com um forceps, e ao final de dois meses as suspensões celulares eram formadas por pequenos agregados homogêneos, com coloração creme.

2.4.2 Tratamento das células

Células com sete dias de idade foram secas por sucção e lavadas com água estéril destilada e deionizada, e foram transferidas ao meio CIM na densidade de 4 g de células por 50 mL⁻¹. O CdCl₂ foi então adicionado até atingir as concentrações finais zero (controle), 0,05 e 0,5 mM, e o cultivo foi feito por um período de até 288 h sob as mesmas condições descritas acima.

As células coletadas em períodos distintos do ciclo de crescimento foram secas e lavadas com água destilada e deionizada e estocadas a -80 °C para análises sequentes.

2.4.3 Crescimento celular

O crescimento celular foi medido pela determinação da massa celular total em massa fresca (g), em distintos intervalos. Estas células foram também utilizadas para análises bioquímicas.

2.4.4 Acúmulo de Cd

As células de café expostas a 0, 0,05 e 0,5 mM Cd, foram analisadas seguindo a metodologia analítica quantitativa de fluorescência da energia de dispersão de raios-X (EDXRF) com a técnica de excitação de radioisótopo, feita no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, sendo analisado conforme descrito por Nascimento-Filho (1999). As amostras de células de café foram secas a 60 °C por 14 dias. As amostras foram então maceradas e homogeneizadas com H₃BO₄ na proporção de 1:9, e 1 g do homogeneizado foi utilizado na EDXRF.

2.4.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada através da medição da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito previamente por Buege e Aust (1978). As células de café (300 mg) foram maceradas com pistilo e mortar e homogeneizadas com 20% (m/v) de polivinilpirrolidona (PVPP) insolúvel e 1,3 mL de 0,1% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. A seguir, 250 µL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL da solução contendo 0,5% (m/v) de TBA e 20% (m/v) de TCA. Esta mistura foi incubada a 95 °C por 20 min, e a reação foi paralisada por resfriamento rápido em banho de gelo e água. A absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm. As medições foram corrigidas para turbidez inespecífica, subtraindo

a absorvância a 600 nm. A concentração de TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar $1,55 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.6 Extração enzimática

Os passos seguintes foram conduzidos a 4 °C. As células de café foram homogeneizadas (2:1 volume de tampão/ massa fresca) em mortar e pistilo, com 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de DL-ditiotreitol e 5% (m/v) de PVPP insolúvel. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 30 min e o sobrenadante foi estocado cuidadosamente em alíquotas separadas a -80 °C, antes de fazer as análises de CAT, GR, APX, GOPX e SOD.

2.4.7 Ensaio da CAT

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998), com pequenas modificações. A atividade da CAT foi ensaiada em espectrofotômetro a 25 °C numa mistura de reação composta de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 2,5 µL de solução a 30 % (v/v) de H₂O₂, preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 15 µL de extrato vegetal e a atividade foi determinada pelo monitoramento da degradação do H₂O₂ a 240 nm por 1 min contra um branco livre de extrato vegetal.

2.4.8 Ensaio da GR

A atividade da GR foi determinada conforme descrita por Azevedo et al. (1998). A atividade da GR foi ensaiada em espectrofotômetro a 30 °C em uma mistura de reação consistindo de 3 mL de 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 1 mM de 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 1 mM de glutathiona oxidada (GSSG) e 0,1 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 50 µl de extrato enzimático. A taxa de redução da GSSG foi acompanhada pelo monitoramento do aumento na absorvância a 412 nm durante 2 min.

2.4.9 Ensaio da APX

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, na temperatura de 30 °C. O meio de reação era composto de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ e 100 µL de extrato enzimático, num volume total de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de ascorbato. O decréscimo na absorbância foi monitorado a partir de 10 até 60 s do início da reação.

2.4.10 Ensaio da GOPX

A atividade da GOPX foi determinada como descrito por Matsuno e Uritani (1972). O meio de reação era composto de 250 µL de tampão fosfato-citrato (0,2 mM de fosfato de sódio dibásico : 0,1 mM de ácido cítrico) pH 5,0, 150 µL de extrato enzimático e 25 µL de guaiacol a 0,5% (v/v), que foi agitado com vortex e colocado a 30 °C por 15 min. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em banho de água e gelo, seguido pela adição de 25 µL de solução de metabisulfito de sódio a 2% (m/v). Após ser agitada, a mistura de reação foi mantida por 10 min e a atividade da GOPX foi determinada pela leitura da absorbância a 450 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde ao aumento de 0,001 na absorbância por min.

2.4.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese foi conduzida sob condições não desnaturantes em géis de poliacrilamida a 9% (m/v), revelados para atividade de SOD, CAT e GR. Uma corrente constante de 30 mA/gel foi aplicada por 8 h (géis revelados para atividade de CAT), 4 h (géis revelados para atividade de GR) ou 3 h (géis revelados para atividade de SOD) a 4 °C. Os tampões de eletroforese e géis nativos foram preparados conforme descrito por Laemmli (1970), exceto o SDS que foi excluído. Quantidades iguais de proteína foram aplicadas em cada linha.

2.4.12 Revelação para atividade da GR

A atividade da GR em géis nativos foi determinada conforme descrito previamente (LEE; LEE, 2000) com modificações conforme descrito por Medici et al. (2004). Os géis foram lavados em água destilada e deionizada, e incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 0,25 mM de Tris, 0,5 mM de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), 0,7 mM de 2,6-dicloro-*N*-(4-hidroxifenil)-1,4-benzoquinonaimina de sódio (DPIP), 3,4 mM de GSSG e 0,5 mM de NADPH.

2.4.13 Revelação para atividade da CAT

A atividade de CAT em PAGE nativo foi determinada conforme descrito por Woodbury; Spencer and Stahmann (1971). Os géis foram incubados em 0,003% (v/v) de H₂O₂ por 10 min e revelados em solução contendo 1% (m/v) de FeCl₃ e 1% (m/v) de K₃Fe(CN)₆, por 10 min.

2.4.14 Revelação para atividade da SOD

Após separação eletroforética, a atividade da SOD foi determinada conforme descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Azevedo et al. (1998). Os géis foram lavados em água destilada e deionizada e incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 1 mM de EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% (v/v) de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). Ao final deste período, a mistura de reação foi retirada dos géis, que foram lavados com água destilada e deionizada e então iluminados em água até o desenvolvimento de bandas descoloridas relativas à atividade da SOD, num gel de revelação púrpura. Para paralisar a reação, os géis foram transferidos para ácido acético a 6% (v/v).

As isoenzimas de SOD foram classificadas conforme descrito previamente por Azevedo et al. (1998). Prévio à revelação de SOD, o gel foi cortado em três fatias; a primeira foi revelada para SOD como descrito acima; a segunda e a terceira fatias foram incubadas por 20 min em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) contendo 2 mM de cianeto de potássio (KCN) e 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) contendo 5 mM de H₂O₂, respectivamente. Ao final

deste período, ambas as fatias foram lavadas em água destilada e deionizada e então reveladas para atividade de SOD. O pré-tratamento em H_2O_2 e KCN antes da revelação para SOD permitiu a classificação das isoenzimas de SOD em Cu/Zn-SOD, Fe-SOD ou Mn-SOD. A Mn-SOD é resistente aos dois inibidores, Fe-SOD é resistente ao KCN e inibida por H_2O_2 , e ambos inibidores inibem a Cu/Zn-SOD.

2.4.15 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

2.4.16 Delineamento experimental

O experimento foi elaborado segundo o delineamento inteiramente casualizado, e os resultados expressam a média e o desvio padrão da média (SEM) de 4 repetições para crescimento celular, 3 repetições para TBARS e atividade das enzimas CAT, GR, GOPX e APX ou 2 repetições para medidas de acúmulo de Cd.

Referências

- ANZA, M.; RIGA, P.; GARBISU, C. Time course of antioxidant response of *Capsicum annuum* subjected to progressive magnesium deficiency. **Annals of Applied Biology**, Warwik v. 146, p. 123-134, 2005.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.
- 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 leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BAILEY, N.J.C.; OVEN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K.; ZENK, M.H. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via H NMR spectroscopy and chemometrics. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 851-858, 2003.
- BALESTRASSE, K.B.; GARDEY, L.; GALLEGRO, S.M.; TOMARO, M.L. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 497-504, 2001.
- BARTOLI, C.G.; GOMEZ, F.; MARTINEZ, D.E.; GUIAMET, J.J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1663-1669, 2004.
- BAUMANN, T.W.; RÖHRIG, L. Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, p. 2667-2669, 1989.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase- Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 276-282, 1971.
- BENAVIDES, M.P.; GALLEGRO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 21-34, 2005.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto.** Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2000. 312p.

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, 1976.

BREJ, T. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. populations from the Legnica copper smelter area, Lower Silesia, **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warsaw, v. 67, p. 325-333, 1998.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 52, p. 302-310, 1978.

CARDOSO, P.F.; MOLINA, S.M.G.; PEREIRA, G.J.G.; VITORIA, A.P.; AZEVEDO, R.A. Response of rice inbred lines to cadmium exposure. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, p. 927-944, 2002.

CHAOUI, A. MAZHOUDI, S.; GHORBAL, 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**, Clare, v. 127, p. 139-147, 1997.

CHO, U.; SEO, N. Oxidative stress in *A. thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, Clare, v. 168, p. 113-120, 2005.

DEL RIO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMENEZ, A.; LOPEZ-HUERTAS, E.; HERNANDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 1195-1200, 1998.

DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1101-1109, 2001.

DUCIC, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 113-112, 2005.

ELSTNER, E.F. **Biochemistry of plants**: Metabolism of activated oxygen species. London, Academic Press, 1987. p. 253-315.

FERREIRA, R.R.; FORNAZIER, R.F.; VITORIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.

FIDALGO, F.; SANTOS, A.; SANTOS, I.; SALEMA, R. Effects of long term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 145, p. 185-192, 2004.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; PEREIRA, G.J.G.; MOLINA, S.M.G.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 125-131, 2002.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, 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.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of cadmium ions on antioxidant defence system in sunflower cotyledons. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 42, p. 49-55, 1999.

GALLEGO, S.; BENAVIDES, M.; TOMARO, M. Involvement of an antioxidant defence system in the adaptative response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 36, p. 267-273, 2002.

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Clare, v. 121, p. 151-159, 1996.

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

GRATÃO, P.L.; PRASSAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: green technology for the clean up toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 53-64, 2005a.

GUELFÍ, A.; AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; MOLINA, S.M.G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 49, p. 63-73, 2003.

GUO, T.R.; ZHANG, G.P.; ZHOU, M.X.; WU, F.B.; CHEN, J.X. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 258, p. 241–248, 2004.

HASSAN, M.J.; ZHANG, G.P.; WU, F.B.; WEI, K.; CHEN, Z.H. Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science – Zuriç Pflanzenernahrung Bodenkunde**, Weinheim, v. 168, p. 255-261, 2005.

IGAMBERDIEV, A.U.; LEA, P.J. The Role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of fotosynthetic organism. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 651-674, 2002.

INOUE, M. Phytochelatin. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 65-78, 2005.

IRETSKAYA, S.N.; CHIEN, S.H.; MENON, R.G. Effects of acidulation of high cadmium containing phosphate rocks on cadmium uptake by upland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 201, p. 183-188, 1998.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 68, p. 167-182, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, 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 Science**, Clare, v. 159, p. 75-85, 2000.

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

LOMBI, E., ZHAO, F.J., DUNHAM, S.J., MCGRATH, S.P. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. **New Phytologist**, New York, v. 145, p. 11-20, 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.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, p. 1-9, 2004.

MILONE, M.M.T.; SGHERRI, C.; CLIJSTERS, H.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidante responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 265-276, 2003.

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

MORELLI, E.; SCARANO, G. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricomutum*. **Plant Science**, Clare, v. 167, p. 289-296, 2004.

MULLINEAUX, P.M.; CREISSEN, G.P. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: SCANDALIOS, J.C. (Ed.). **Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, p. 667-713.

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

NASCIMENTO-FILHO, V. **Técnicas Analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF)**. Piracicaba, ESALQ-USP, 1999. 32 p.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237–1247, 2002.

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 10, p. 608-612, 1992.

OLMOS, E.; MARTINEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 291–301, 2003.

PASSARDI, F.; LONGET, D.; PENEL, C.; DUNAND, C. The class III peroxidase multigene family in rice and its evolution in land plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 1879-1893, 2004.

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, n. 1, p. 123-132, 2002.

RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; SCEBBA, F.; CARERI, M.; ZAGNONI, I.; PREDIERI, G.; PAGLIARI, M.; DI TOPPI, L. S. Oxidative Stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 45-54, 2005.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; RODRIGUEZ-SERRANO, M.; CORPAS, F.J.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 in pea leaves. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, p. 1122-1134, 2004.

SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.C.; 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, p. 2115-2126, 2001.

DI TOPPI, L.S.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 105-130, 1999.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 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.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; NIKOLOVA, P.; RUDOLF, C.; POLLE, A. Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populusxcanescens* roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 577-584, 2002.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D.L.; POLLE, A. Cadmium- induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 887-898, 2001.

SHAH, K.; KUMAR, R.G.; VERMA, S.; DUBEY, R.S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 161, p. 1135-1144, 2001.

SHAW, B.P. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedling of *Phaseolus aureus*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 37, p. 587-596, 1995.

SILVA, A.L.O.; BARROCAS, P.R.G.; JACOB, S.C. Dietary intake and health effects of selected toxic elements. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 79-93, 2005.

SILVAROLLA, M.B., MAZZAFERA, P., FAZUOLI, L.C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, London, v. 429, p. 826-826, 2004.

SINGH, P.K., TEWARI, R.K. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 24, p. 107-112, 2003.

SKORZYNSKA-POLIT, E.; DRAZKIEWICZ, M.; KRUPA, Z. The activity of the antioxidante system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 47, p. 71-78, 2003.

SOBKOWIAK, R., DECKERT, J., 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 767-772.

STROINSKI, A.; KOZLOWSKA, M. Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warsaw, v. 66, p. 189-195, 1997.

STROINSKI, A.; KUBIS, J.; ZIELEZINSKA, M. Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 21, p. 201-207, 1999.

VALÉRIO, L.; DE MEYER, M.; PENEL, C.; DUNAND, C. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigene family. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 1331-1342, 2004.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, Oxford, v. 65, p. 249-259, 2004.

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

VON ZGLINICKI, T.; EDWALL, C.; ÖSTLUND, E.; LIND, B.; NORDBERG, M.; RINGERTZ, N.R.; WROBLEWSKI, J. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 103, p. 1073-1081, 1992.

WÓJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 44, p. 71-80, 2004.

WÓJCIK, M., TUKIENDORF, A. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 49, p. 237-245, 2005.

WÓJCIK, M.; VANGRONSVELD, J.; TUKIENDORF, A. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 151-161, 2005.

WOODBURY, W.; SPENCER, A.K.; STAHMANN, M.A. Improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 301-308, 1971.

WU, F.; CHEN, F.; WEI, K.; ZHANG, G. Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 447-454, 2004.

WU, F.; ZHANG, G.; DOMINY, P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 67-78, 2003.

YANG, H.D.; ROSE, N.L.; BATTARBEE, R.W. Distribution of some trace metals in Lochnagar, a Scottish mountain lake ecosystem and its catchments. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 285, p. 197-208, 2002.

ZHANG, F.Q.; SHI, W.Y.; JIN, Z.X.; SHEN, Z.G. Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, p. 1779-1788, 2003.

3 O NÍQUEL PROVOCA UMA RESPOSTA ANTIOXIDANTE RÁPIDA EM CÉLULAS DE *Coffea arabica*

Resumo

A resposta antioxidante de células em suspensão de café (*Coffea arabica* L.) ao níquel (Ni) foi investigada. O Ni foi acumulado muito rapidamente nas células e o acúmulo pôde ser diretamente correlacionado com o aumento da concentração de NiCl₂ no meio. Na dosagem 0,05 mM NiCl₂, o crescimento foi estimulado, mas na dosagem 0,5 mM NiCl₂, o crescimento foi inibido. Foram detectadas alterações na presença de espécies ativas de oxigênio pela análise visual das células tratadas com Ni, assim como pelo aumento na peroxidação lipídica, na dosagem 0,5 mM NiCl₂. As atividades das enzimas Catalase (CAT; EC 1.11.1.6), glutathiona redutase (GR; EC 1.6.4.2), ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11), guaiacol peroxidase (GOPX; EC 1.11.1.7) e superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foram aumentadas, particularmente nos períodos iniciais de exposição ao NiCl₂ e as atividades foram maiores na dosagem 0,5 mM NiCl₂, na maioria dos tempos de exposição testados. PAGE não desnaturante revelou uma isoenzima da CAT, nove isoenzimas da SOD e quatro isoenzimas da GR. As isoenzimas da SOD foram diferencialmente afetadas pelo tratamento com NiCl₂ e uma isoenzima da GR foi aumentada pelo NiCl₂. O NiCl₂ na concentração 0,05 mM não induziu peroxidação lipídica e a principal resposta aparenta ser via indução da atividade das enzimas SOD, CAT, GOPX e APX, para a remoção das espécies ativas de oxigênio e através da indução da GR para garantir a disponibilidade de glutathiona reduzida.

Palavras chave: *Coffea arabica*; estresse oxidativo, peroxidação lipídica; níquel; catalase; glutathiona redutase; superóxido dismutase

Abstract

The antioxidant responses of coffee (*Coffea arabica* L.) cell suspension cultures to nickel (Ni) were investigated. Ni was very rapidly accumulated in the cells and the accumulation could be directly correlated with the increase of NiCl₂ concentration in the medium. At 0.05 mM NiCl₂ growth was stimulated, but at 0.5 mM NiCl₂, the growth rate was reduced. Alterations in the presence of reactive oxygen species were detected by visual analysis of the Ni treated cells, as well as by an increase in lipid peroxidation at 0.5 mM NiCl₂. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6), glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2), ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11), guaiacol peroxidase (GOPX; EC 1.11.1.7) and superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activities were increased, particularly at earlier NiCl₂ exposure times and the activities were higher at 0,5 mM NiCl₂ for most of exposure times tested. Non-denaturing PAGE revealed one CAT isoenzyme, nine SOD isoenzymes and four GR isoenzymes. The SOD isoenzymes were differentially affected by NiCl₂ treatment and one GR isoenzyme was increased by NiCl₂. NiCl₂ at 0.05 mM did not induce lipid peroxidation and the main response appeared to be via the induction of SOD, CAT, GOPX and APX activities for the removal of the reactive oxygen species and through the induction of GR to ensure the availability of reduced glutathione.

Keywords: *Coffea arabica*; oxidative stress, lipid peroxidation; nickel; catalase; glutathione reductase; superoxide dismutase

3.1 Introdução

Os metais pesados podem ser incluídos na principal categoria de poluentes. O Ni é um metal pesado amplamente utilizado na manufatura de aço e outras ligas, na manufatura de baterias e inventos eletrônicos (CHEN; WANG; LIN, 2003), produtos de petróleo e os produtos da combustão de combustíveis fósseis (cinza, resíduos) (POULIK, 1997). O Ni pode contaminar o solo principalmente através do lodo de esgoto, compostos industriais e deposição atmosférica, especialmente em plantas próximas ao processamento (POULIK, 1997). O acúmulo de Ni em áreas agrícolas é um problema primário, uma vez que ele também pode entrar na cadeia alimentar do homem e animais.

Em concentrações traço, o Ni é um elemento necessário para os organismos vivos, devido sua função como componente insubstituível da enzima urease, que é responsável pela hidrólise da uréia (WITTE et al., 2005). Mais recentemente, o Ni e outros metais mostraram ser cofatores da classe enzimática *cupim* de proteínas vegetais, apesar da maioria das proteínas conter ferro como cofator metálico do sítio ativo (DUNWELL; PURVIS; KHURI, 2004). Entretanto, em altas concentrações o Ni é um poluente tóxico para humanos, animais e plantas (POULIK, 1997). Em animais e humanos, o Ni pode danificar o músculo cardíaco, os rins e o sistema nervoso central, além de reduzir a capacidade imunológica (POULIK, 1997), e danificar o DNA, o que pode levar a morte celular (CHEN; WANG; LIN, 2003). O Ni também induz a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo, que são envolvidos nos mecanismos moleculares da toxidez e carcinogenicidade do Ni em animais (CHEN; WANG; LIN, 2003).

O Ni mostrou ser acumulado em tecidos distintos de espécies vegetais hiperacumuladoras (BHATIA et al., 2004, BROADHURST et al., 2004, VINTERHALTER; VINTERHALTER, 2005), que podem ser utilizadas na fitorremediação de áreas contaminadas com Ni.

A fitotoxidez do Ni resulta em clorose na folha e redução da biomassa vegetal (KUKKOLA; RAUTIO; HUTTUNEN, 2000), taxas de fotossíntese e respiração reduzidas (SCHICKLER; CASPI, 1999), baixa germinação de sementes (RAO; SRESTY, 2000), crescimento vegetal fraco, queda na produção acompanhada pela translocação de nutrientes reduzida, desordens no metabolismo vegetal e, em leguminosas, capacidade de fixação de nitrogênio reduzida (POULIK, 1997). Uma pesquisa recente revelou que plantas de canola transgênica expressando 1 - aminociclopropano - 1 - ácido carboxílico desaminase de bactéria,

exibiram um aumento significativo na tolerância ao Ni quando comparada a plantas controle não transformadas, quando cultivadas em solos contaminados com Ni (STEARNS et al., 2005). Apesar das informações da relação entre metais pesados e estresse oxidativo disponíveis em anos recentes, continua difícil desenhar uma conclusão geral sobre as concentrações críticas de metais tóxicos nos solos (ROMERO-PUERTAS et al., 2004).

O O_2 molecular é relativamente não reativo em seu estado natural, mas a produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs), como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\bullet OH$) e o oxigênio “singlet” (O_2^1), é uma consequência inevitável do metabolismo aeróbico. Sob condições normais de crescimento, a produção de EAOs nas células ocorre em baixa taxa, entretanto, fatores ambientais adversos que perturbam a homeostase celular aumentam a produção de EAOs, levando ao estresse oxidativo (GRATÃO et al., 2005). O Ni é um agente que pode causar estresse oxidativo em plantas (FREEMAN et al., 2004). As EAOs demonstraram induzir a peroxidação lipídica de membranas celulares e o nível de peroxidação lipídica medido pela quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tem sido utilizado como um índice do efeito tóxico do estresse oxidativo (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001). As EAOs mostraram ser produzidas como uma resposta geral a distintas condições abióticas estressantes (ANZA; RIGA; GARBISU, 2005; FIDALGO et al., 2004).

A destruição eficiente das EAOs requer a ação de várias enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX), a glutathione redutase (GR) e a guaiacol peroxidase (GOPX). As SODs são consideradas a primeira linha de defesa contra as EAOs, sendo responsáveis pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ gerando H_2O_2 e O_2 . A CAT, a APX e a GOPX são enzimas que catalizam a conversão do H_2O_2 a água e O_2 (GRATÃO et al., 2005). A GR catalisa a redução dependente de NADPH da glutathione oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (GRATÃO et al., 2005). A APX, a GR e a GSH são componentes importantes do ciclo ascorbato-glutathione, responsável pela remoção do H_2O_2 em diferentes compartimentos celulares (FOYER; NOCTOR, 2005, GRATÃO et al., 2005). A GSH é também o substrato para a biossíntese de fitoquelatinas, que são envolvidas na desintoxicação de metais pesados (INOUE, 2005). O Ni induz a produção de fitoquelatinas, mas a ligação de metais com fitoquelatinas foi apenas demonstrada para Cu, Pb e Cd (KUKKOLA; RAUTIO; HUTTUNEN, 2000). Além disso, plantas naturalmente tolerantes a metais não elevam a produção de

fitoquelatinas como parte de sua defesa contra o Ni (FREEMAN et al., 2004). Entretanto, o Ni pode formar complexo estável com a GSH (RAO; SRESTY, 2000).

O café é a segunda maior mercadoria no mundo depois do petróleo, sendo a principal cultura em diversos países. Está estimado que apenas no Brasil, aproximadamente seis milhões de pessoas são envolvidas com o negócio do café, desde a produção no campo até o consumidor. Pouco é conhecido sobre a resposta antioxidante de café em condições estressantes (DAZA et al., 1993). Entretanto, um estudo recente indicou que o lodo de esgoto pode ser adotado por produtores de café como uma prática agrícola, uma vez que ele não afeta a qualidade da bebida (MARTINS; CAMARGO; BATAGLIA, 2005). Este foi um experimento de curto período de tempo, porém em períodos maiores, as plantações de café poderiam se tornar intoxicadas pelos metais pesados presentes neste fertilizante alternativo. Além disso, há muito pouca informação na literatura sobre plantas perenes sujeitas ao estresse por metais pesados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do NiCl_2 no metabolismo de células de café em suspensão, com atenção especial aos parâmetros fisiológicos relacionados ao crescimento celular, peroxidação lipídica e o sistema antioxidante enzimático.

3.2 Resultados

3.2.1 Crescimento celular, acúmulo de Ni e indução de estresse oxidativo

A análise do crescimento de células em suspensão baseada na massa fresca, nas concentrações zero (controle), 0,05 e 0,5 mM NiCl_2 mostrou um pequeno estímulo do crescimento em 0,05 mM NiCl_2 após 288 h de crescimento, enquanto que a inibição do crescimento foi observada em 0,5 mM NiCl_2 , quando comparados ao controle (Figura 1).

O acúmulo de Ni nas células de café foi determinado após o crescimento em ambas as concentrações de NiCl_2 . Este indicou que o Ni entrou rapidamente nas células, alcançando o limiar de concentração, com grande acúmulo logo após 12 h de exposição ao metal, particularmente em 0,5 mM NiCl_2 (Figura 1). É também interessante observar que os níveis de Ni determinados nas células tenderam a 10 vezes a proporção da concentração de Ni no meio.

Foram também detectadas alterações no metabolismo do oxigênio ativo. A primeira evidência foi a variação das culturas de células, apresentando um aspecto visual marrom-

acinzentado nas células tratadas com NiCl_2 , principalmente na concentração 0,5 mM NiCl_2 (Figura 2). Outra indicação adicional foi observada pela medição da peroxidação lipídica, determinada pela quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 1). O tratamento com 0,05 mM NiCl_2 apenas produziu algum nível alterado de peroxidação lipídica após 96 h de exposição, enquanto que o tratamento com 0,5 mM NiCl_2 induziu uma elevação rápida e forte na quantidade de TBARS após 24 h de exposição ao NiCl_2 , que continuou a aumentar até 192 h de exposição ao NiCl_2 .

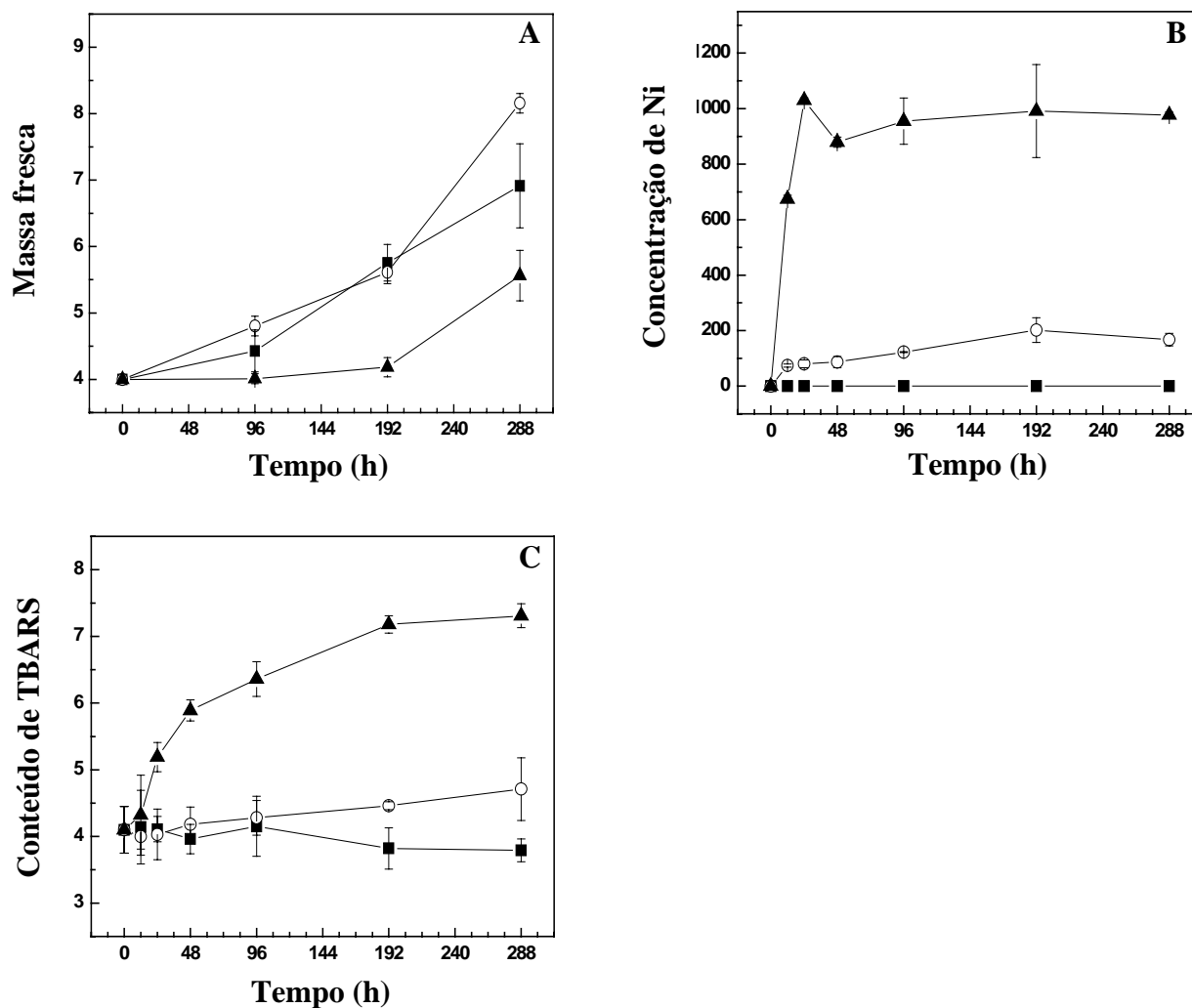


Figura 1 - Crescimento celular (g massa fresca) (A); Acúmulo de Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca) (B) e quantidade de TBARS (nmol g^{-1} massa fresca) (C) em células de café cultivadas por um período de 288 h em três concentrações de NiCl_2 . Zero (controle) CdCl_2 (■), 0,05 mM CdCl_2 (○) e 0,5 mM CdCl_2 (▲). Os valores representam a média de

quatro repetições \pm SEM para crescimento celular, média de duas repetições \pm SEM para acúmulo de Ni e média de três repetições \pm SEM para a quantidade de TBARS

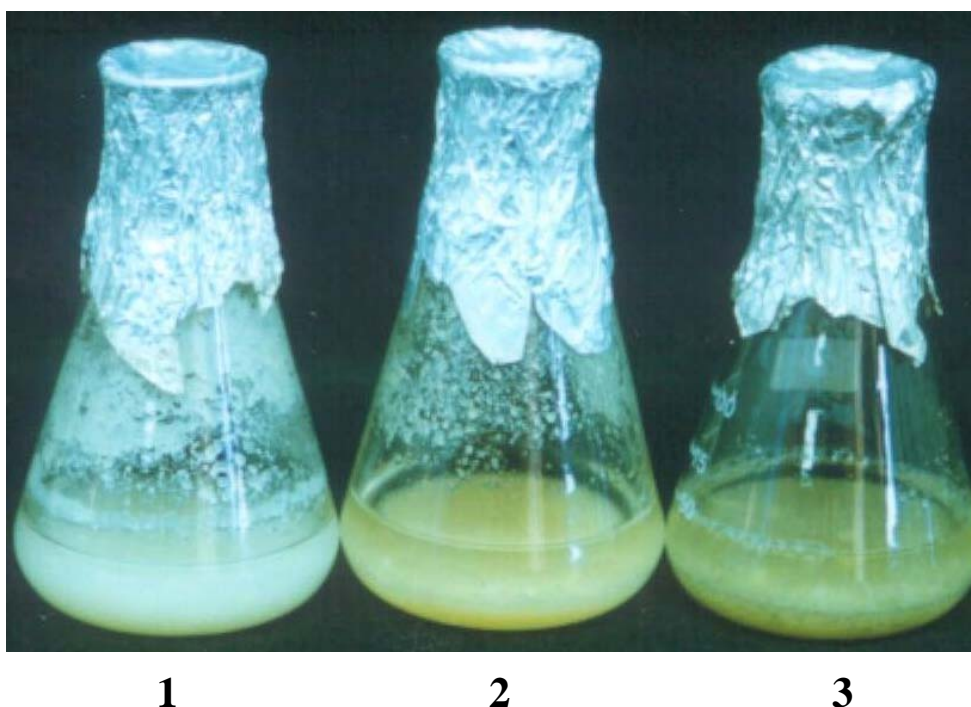


Figura 2 - Culturas de células em suspensão de café cultivadas por 288 h em zero (controle) NiCl_2 (1), 0,05 mM NiCl_2 (2) e 0,5 mM NiCl_2 (3)

3.2.2 Atividade da SOD

A revelação da atividade da SOD em PAGE não desnaturante revelou a existência de diversas isoenzimas (Figura 3). As bandas de SOD foram classificadas de acordo com seu cofator metálico baseado em seu padrão inibitório ao peróxido de hidrogênio e ao cianeto (dado não mostrado). A revelação da atividade da SOD revelou duas principais isoenzimas Mn-SOD (bandas V e VI) nas células de café, com a banda V exibindo aumento geral na atividade após a exposição ao NiCl_2 , enquanto que a banda VI foi inibida pelo tratamento com NiCl_2 após 12 h de tratamento com 0,05 mM NiCl_2 e após 12 h e 24 h com 0,5 mM NiCl_2 . Um acréscimo geral na atividade nas células tratadas com NiCl_2 foi observado, particularmente devido à banda V de SOD. As quatro isoenzimas Mn-SODs menores (bandas I, II, III e IV) não foram detectadas após 12 h de tratamento em ambas as concentrações de NiCl_2 e foram muito fracas após 24 h de tratamento com 0,5 mM NiCl_2 . As isoenzimas Fe-SOD VII, VIII e IX não foram afetadas por qualquer das concentrações e tempos de exposições ao NiCl_2 testados (Figura 3).

3.2.3 Atividade da CAT

A revelação da atividade da CAT em PAGE não desnaturante (Figura 3) revelou apenas uma isoenzima da CAT nas culturas de células em suspensão de café, que também variou em resposta ao NiCl_2 , exibindo um padrão similar na variação da atividade ao observado pelo ensaio em espectrofotômetro para a atividade total da CAT (Figura 4), que revelou um pico de elevação, alcançando 4 e 2 vezes após 12 h nas concentrações 0,05 e 0,5 mM NiCl_2 , respectivamente, que foi reduzida ao nível do controle após 24 h de tratamento. Um aumento adicional na atividade da CAT foi também observado em ambas as concentrações após 288 h de exposição, enquanto que o controle não exibiu qualquer variação significativa na atividade da CAT durante o tempo total do experimento.

3.2.4 Atividade da GR

A revelação da atividade da GR em PAGE não desnaturante revelou a princípio quatro isoenzimas da GR nas células de café (bandas I, II, III e IV), que foram diferencialmente afetadas pelo tratamento com NiCl_2 , particularmente a banda IV da GR, que aparentou responder mais especificamente ao NiCl_2 , principalmente após 12 h de exposição (Figura 3). A atividade total da GR mostrou um pico de acréscimo durante as primeiras 24 h de cultivo na presença de NiCl_2 , mas foi reduzida a menores níveis de atividade após este período. A atividade induzida pelo Ni permaneceu maior que a atividade da GR no controle durante período total do experimento (Figura 4).

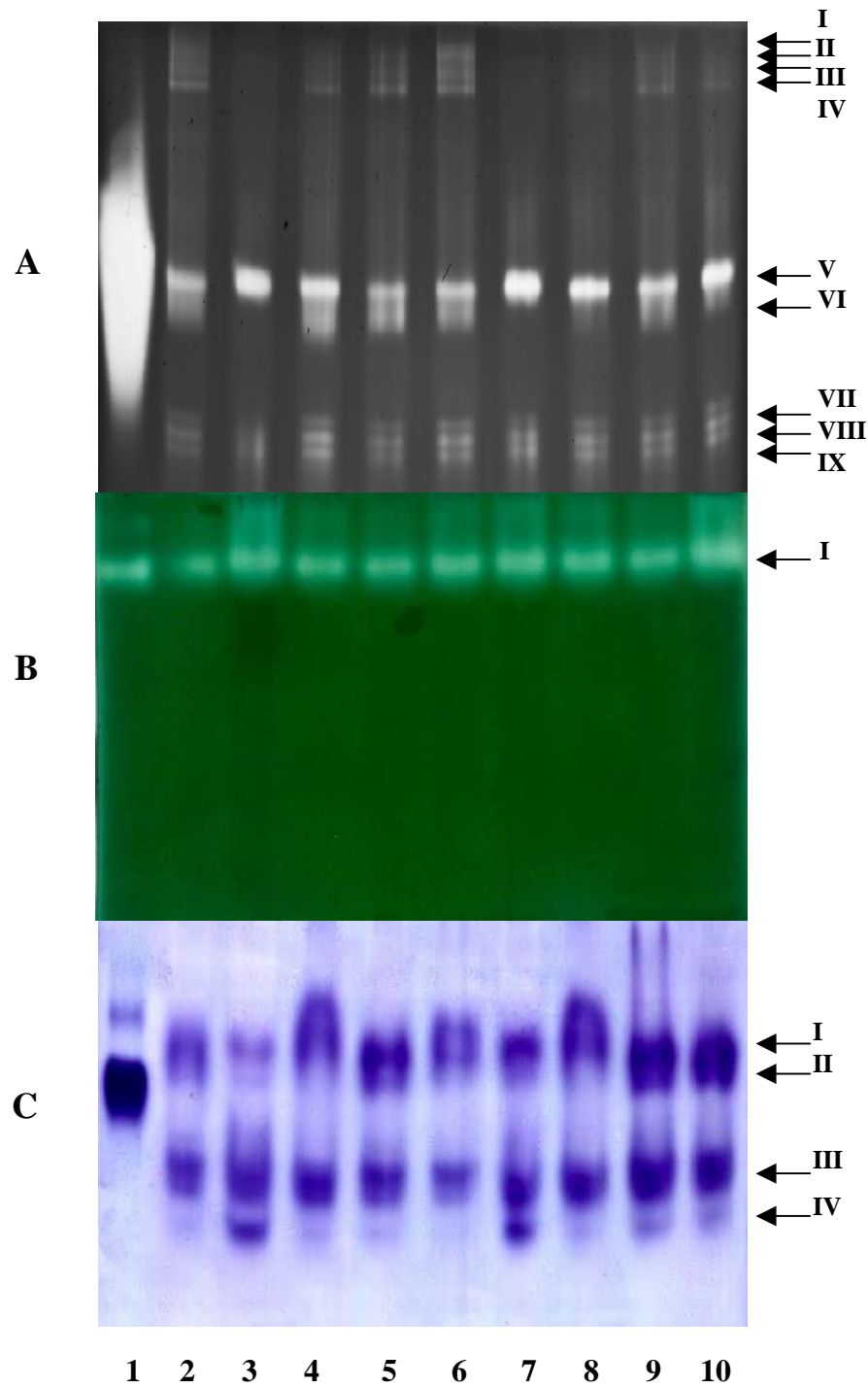


Figura 3 - Revelação da atividade de SOD (A), CAT (B) e GR (C) em células de café. Linha 1, padrões de SOD bovina, CAT de fígado bovino e *Saccharomyces cerevisiae* em (A), (B) e (C), respectivamente; linha 2, zero (controle) NiCl₂ após 96 h; linha 3, 12 h, linha 4, 24 h; linha 5, 192 h e linha 6, 288 h de cultivo em 0,05 mM NiCl₂; linha 7, 12 h, linha 8, 24 h, linha 9, 192 h e linha 10, 288 h de cultivo em 0,5 mM NiCl₂

3.2.5 Atividade da APX

Seguindo o tratamento com 0,05 mM NiCl₂, a atividade total da APX mostrou um pico de aumento na atividade de 4 vezes após 12 h de exposição, seguindo por uma redução em 24 h e um pico de acréscimo na atividade adicional em 48 h de tratamento e um acréscimo final na atividade após 288 h de tratamento, em relação ao controle (Figura 4). A atividade da APX nas células sujeitas a 0,5 mM NiCl₂ também exibiu um aumento na atividade, mas em menor extensão que o observado para 0,05 mM NiCl₂. No final do tempo de exposição ao metal, um aumento na atividade foi também observado nesta concentração (Figura 4).

3.2.6 Atividade da GOPX

A atividade da GOPX foi também determinada em culturas de células em suspensão de café expostas ao NiCl₂. A atividade da GOPX foi aumentada durante as primeiras 96 h e após 288 h de exposição a 0,05 mM NiCl₂. De outra forma, a atividade da GOPX nos tratamentos com 0,5 mM NiCl₂ foi apenas aumentada em relação ao controle após 288 h de exposição ao NiCl₂ (Figura 4).

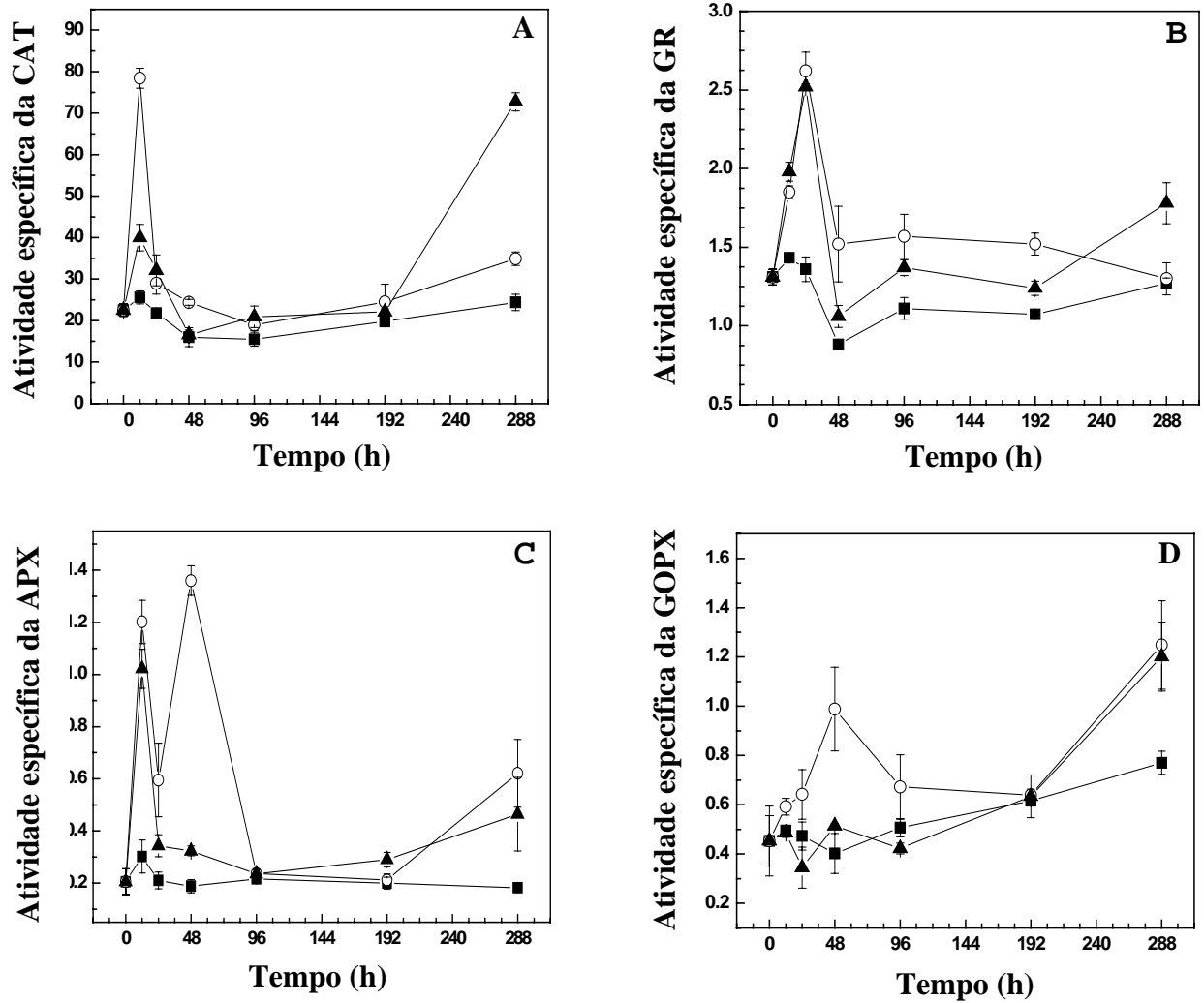


Figura 4 - Atividade específica da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) (A); GR ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) (B); APX ($\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) (C) and GOPX (U mg^{-1} proteína) (D) em células de café cultivadas em um período de 288 h em três concentrações de NiCl₂. Zero (controle) CdCl₂ (■), 0,05 mM CdCl₂ (○) e 0,5 mM CdCl₂ (▲). Os valores representam a média de três repetições \pm SEM

3.3. Discussão

O Ni é um metal tóxico e sua presença no ambiente está aumentando constantemente, afetando o cultivo de culturas economicamente importantes. Os efeitos de diversos metais pesados têm sido testados no cultivo de espécies vegetais, entretanto, apenas em poucos casos, culturas de células em suspensão têm sido testadas. Além disso, segundo as informações atuais, este é um dos poucos estudos realizados com espécie vegetal perene sujeita à exposição a metal pesado.

Está demonstrado que a incorporação do Ni é proporcional a concentração de Ni no meio e/ou o tempo de incubação em raízes de *Zea mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001), *Canabis sativa* (CITTERIO et al., 2003), *Trigonella corniculata* (PARIDA; CHHIBBA; NAYYAR, 2003), na planta submersa *Hydrilla verticillata* (SINHA; PANDEY, 2003), *Silene paradoxa* (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001), *Cajanus cajan* (RAO; SRESTY, 2000) e em culturas de calos de *Echinochloa colona* tolerantes e não tolerantes ao Ni (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001). Em *Medicago sativa* cultivado em solo contaminado com uma mistura de 50 ppm de Cd, Cu, Ni, e Zn, o Ni foi o metal pesado presente em maiores quantidades na parte aérea (PERALTA-VIDEA et al., 2002). No presente estudo, o Ni entrou rapidamente nas células de café e acumulou em altas concentrações. A capacidade de acumular Ni depende da concentração de Ni no meio de cultura, com um acúmulo particularmente alto e significativo observado em 0,5 mM NiCl₂. A concentração molar de Ni dentro destas células estaria próxima a 16 mM (calculada utilizando a massa seca das células) no final do experimento. O destino final do metal no interior da célula não foi determinado, mas sabe-se que o Ni pode estar presente como íon no citoplasma ou complexado com GSH (RAO; SRESTY, 2000), histidina (INGLE et al., 2005), ácidos orgânicos (FREEMAN et al., 2004) e possivelmente com proteínas específicas de ligação ao metal e sequestrado no vacúolo (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001), contribuindo então para a tolerância ao Ni. Foi estabelecido previamente que o vacúolo fornece o principal reservatório para o Ni em *Thlaspi goensigense* (KRAMER et al., 2000).

Tal acúmulo foi provavelmente decisivo no efeito sobre o crescimento celular, desde que 0,5 mM NiCl₂ produziu uma redução significativa no crescimento das células de café,

determinado segundo a massa fresca, enquanto 0,05 mM NiCl₂ aumentou ligeiramente o crescimento celular. A inibição do crescimento e a redução da produção de biomassa são respostas gerais de vegetais superiores à toxidez dos metais pesados (GRATÃO et al., 2005), que pode ser ligado a perda no turgor celular, resultando no decréscimo da atividade mitótica e/ou na inibição do alongamento celular. Dessa forma, a toxidez do Ni pode causar inibição do crescimento da parte aérea e/ou raízes, como observado em diversas espécies vegetais testadas, como raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e parte aérea (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998), raízes de *S. paradoxa* (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001) e plântulas de *P. sylvestris* (KUKKOLA; RAUTIO; HUTTUNEN, 2000). Em *Alissum argenteum* e *Alissum maritimum*, o Ni induziu a redução da massa fresca sem o efeito concomitante efeito na massa seca, sugerindo uma mudança no status hídrico vegetal, que pode ser o resultado do decréscimo da absorção de água ou aumento da perda de água, ambos dos quais podem ocorrer devido a danificação da membrana (SCHICKLER; CASPI, 1999). Além disso, em folhas de *Brassica oleracea*, o Ni promoveu decréscimo na suculência e densidade foliar, que indicaram deficiência hídrica real (MOLAS, 1997). Entretanto, em baixas concentrações o Ni é considerado um elemento essencial principalmente devido a sua função como componente insubstituível da urease (WITTE et al., 2005), e isto pode ser a causa da indução do crescimento celular por 0,05 mM NiCl₂ nas células de café. Similarmente, o crescimento de culturas de células *in vitro* não tolerantes de *E. colona* foi estimulado por baixas concentrações de Ni, mas declinou com o aumento na concentração de Ni no meio (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001), de maneira similar ao estímulo do crescimento causado por baixas de Cd observado em algumas espécies vegetais (FORNAZIER et al., 2002).

Em plantas, o sintoma visual de clorose foliar tem sido observado como um efeito geral da toxidez do Ni (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001). As culturas de células de café tratadas com Ni exibiram uma coloração visual marrom-acinzentada principalmente na concentração 0,5 mM NiCl₂, que deve ser um indicativo da oxidação celular. Similarmente, raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e raízes e caules de *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000) tornaram-se marrom após tratamento com Ni. O escurecimento das células de café deve indicar a oxidação de compostos fenólicos a quinonas citotóxicas, que se acredita ser mediado pela redução de um elétron a radicais semiquinona que se autooxidam formando ROS (ELSTNER, 1987).

Além disso, o Ni produziu um grande aumento na quantidade de TBARS nas células de café cultivadas em 0,5 mM NiCl₂, que é um índice da peroxidação lipídica e todavia, do estresse oxidativo. Então, a concentração 0,5 mM NiCl₂ mostrou-se tóxica as células de café, levando ao estresse oxidativo, que aparentemente não ocorreu no caso da concentração 0,05 mM NiCl₂. Está reportado que a peroxidação lipídica é um efeito primário da toxidez dos metais, e pode iniciar antes do aparecimento de qualquer sintoma visível de toxidez (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001). A elevação na quantidade de TBARS devido à exposição ao Ni foi também observada em *Arabidopsis thaliana*, *T. goensigense* (FREEMAN et al., 2004), *H. verticillata* (SINHA; PANDEY, 2003), raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e parte aérea (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998), raízes e parte aérea de *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000) e raízes de *Triticum aestivum* (PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992). A peroxidação de membranas celulares afeta severamente sua funcionalidade e integridade e pode produzir danos irreversíveis à célula, resultando no aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que provoca o extravasamento dos íons K⁺ e outros solutos e pode finalmente causar morte celular (CHAOUI et al., 1997). Os danos causados pela peroxidação no plasmalema também provoca o extravasamento do conteúdo celular e a dissecação rápida, enquanto que os danos a membranas intracelulares podem afetar a atividade respiratória na mitocôndria (SCANDALIOS, 2005). A peroxidação lipídica pode ser iniciada pelas EAOs ou pela ação da lipoxigenase (SANDALIO et al., 2001).

Existem numerosos mecanismos pelos quais as EAOs podem ser geradas *in vivo*. Um destes mecanismos é através da reação tipo Fenton, que envolve a redução do H₂O₂ por um íon metálico de transição, como o Ni, formando o radical [•]OH (LLOYD; CARMICHAEL, PHILLIPS, 1998; GOLDSTEIN; CZASPKI, 1990). O radical [•]OH e seus derivados são os mais potentes oxidantes conhecidos, sendo hábeis a atacar rapidamente e indiscriminadamente todas as macromoléculas, provocando sérios danos aos componentes celulares (SCANDALIOS, 2005). Além disso, os metais pesados podem induzir estresse oxidativo indiretamente, causando distúrbios nos cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias (GRATÃO et al., 2005), e o Ni pode também ser envolvido nestes processos. Em geral, o O₂^{•-} pode surgir quando elétrons são mal direcionados e doados ao oxigênio. Em adição, o O₂¹, que é formado quando a energia de excitação é transferida ao O₂, também produz efeitos deletérios pois o O₂¹ pode transferir sua energia de excitação a outras moléculas biológicas ou reagir com elas, formando endoperóxidos

ou hidroperóxidos (GRATÃO et al., 2005). A mitocôndria vegetal em atividade respiratória produz EAOs em altas taxas, sendo que uma cadeia transportadora de elétrons mais reduzida produz mais EAOs. Em células de mamíferos, as mitocôndrias são as principais fontes de EAOs, o que também é sugerido para células vegetais não fotossintetizantes (MOLLER, 2001). As células de café foram cultivadas no escuro neste experimento e o estresse oxidativo induzido deve ter sido causado principalmente pela alteração da atividade mitocondrial causada pelo estresse do Ni e/ou por reação tipo Fenton mediada pelo Ni.

A atividade e expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes apresentaram mudanças em algumas plantas, quando sujeitas a diversas condições ambientais e a resposta das enzimas antioxidantes ao estresse oxidativo induzido por metais pesados forneceu resultados variáveis e controversos (SCHÜTZENDÜBEL et al, 2001). As numerosas fontes de EAOs e o complexo sistema de limpeza dos oxidantes fornece a flexibilidade necessária ao metabolismo antioxidante (GRATÃO et al., 2005). Dados os mecanismos utilizados pelas plantas para desintoxicar as EAOs, é claramente importante estabelecer se a exposição de plantas ao Ni causa um efeito prejudicial ou estimulatório nas enzimas envolvidas neste processo de desintoxicação.

A enzima SOD é a única cuja atividade determina a concentração do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss, sendo portanto, central nos mecanismo de defesa, prevenindo deste modo a formação do radical $\bullet OH$ (GRATÃO et al., 2005). O aumento dependente de Ni da atividade da SOD em resposta ao tratamento com Ni observado nas células de café foi também reportado na hiperacumuladora *A. maritimum* (SCHICKLER; CASPI, 1999), na parte aérea de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998) e em *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000). Recentemente, uma classe completamente distinta de SOD que contém Ni (Ni-SOD) foi descoberta em *Streptomyces* e cyanobacteria (BARONDEAU et al., 2004). O número de cada tipo de isoenzima de SOD varia muito de planta para planta, assim como a abundância relativa de cada uma (GRATÃO et al., 2005). Nas células de café utilizadas neste experimento, foram identificadas e classificadas nove isoenzimas da SOD. As duas bandas maiores de SOD, V e VI, correspondentes a Mn-SODs foram detectadas segundo a revelação da atividade em PAGE não desnaturante. A banda V mostrou acréscimo na atividade devido ao tratamento com Ni, sendo a principal responsável pelo acréscimo global na atividade da SOD nas células de café tratadas com Ni. O aumento rápido na atividade da SOD deve ser um dos principais mecanismos utilizados para evitar o estresse oxidativo causado pelo Ni nas células de café. A Mn-SOD é

localizada na mitocôndria e nos peroxissomos (GRATÃO et al., 2005), e prevaleceu nas células de café provavelmente devido ao cultivo das células no escuro, apesar dela ter sido reportada no cloroplasto de algumas espécies vegetais (GRATÃO et al., 2005). Além disso, três bandas menores de isoenzimas Fe-SOD, VII, VIII e IX, foram observadas nestas células, mas elas não responderam ao tratamento com Ni. A Fe-SOD foi observada em plantas, mas não na extensão das Mn-SODs e Cu/Zn-SODs, e apresentou-se associada com os cloroplastos (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001). Portanto, estas isoenzimas, no caso das células de café, são provavelmente associadas com os plastídeos. Curiosamente, não foram detectadas isoenzimas Cu/Zn-SOD nas células de café, uma vez que elas são abundantes entre as espécies vegetais e são tipicamente associadas com o citoplasma, cloroplastos e peroxissomos.

Nas células de café, o NiCl₂ induziu um aumento rápido na atividade da CAT em ambas as concentrações testadas, mas o aumento foi maior no tratamento com 0,05 mM NiCl₂. A elevação rápida da atividade da CAT deve ser outro mecanismo principal de proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo Ni e deve estar associado com a elevação do nível de H₂O₂ pela maior atividade da SOD ou outra fonte de estresse oxidativo induzido pelo Ni. A elevação da atividade da CAT foi associada com a toxidez do Ni na hiperacumuladora *T. goesingense* (FREEMAN et al., 2004), em raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e parte aérea (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998). Culturas de raízes da hiperacumuladora de Ni *A. bertolonii* têm atividade de CAT constitutivamente elevada e sensibilidade reduzida a peroxidação lipídica induzida por Ni comparada com culturas de raízes de *Nicotiana tabacum* (BOOMINATHAN; DORAN, 2002). Estes dados demonstraram a importância da CAT na resposta ao estresse oxidativo induzido pelo Ni. Suspeita-se que devido a diferentes funções da CAT, muitas plantas contêm múltiplas isoenzimas da CAT, desde duas isoenzimas em *H. vulgare* (AZEVEDO et al., 1998) até 12 em *Brassica juncea* (FRUGOLI et al., 1996), entretanto, no presente estudo apenas uma isoenzima principal da CAT pode ser detectada segundo a revelação em PAGE não desnaturante.

Numa maneira similar a CAT, a atividade da GR nas células de café aumentou rapidamente após o tratamento com NiCl₂. A maioria dos estudos determinando a resposta da GR à exposição ao Ni mostrou que a atividade da GR aumentou, como parte do mecanismo de defesa contra o estresse do Ni. Por enquanto, a atividade da GR aumentou na presença do Ni em *Crotalaria juncea* (CARDOSO et al., 2005), *T. goesingense* (FREEMAN et al., 2004), *A.*

argenteum, *A. maritimum* (SCHICKLER; CASPI, 1999), *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000), parte aérea de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUÏ; EL FERJANI, 1998) e ecotipos tolerantes e sensíveis ao Ni de *S. paradoxa* (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001). Tais resultados reportados na literatura e também observado neste estudo, sugerem que a GR está respondendo ao estresse por Ni para manter a glutathiona na forma reduzida, priorizando a formação do complexo estável Ni-GSH (RAO; SRESTY, 2000) e/ou a ativação do ciclo ascorbato-glutathiona para a remoção do H₂O₂ (ASADA, 1999). Concentrações elevadas de GSH conferiram tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo Ni em *A. thaliana* transgênica (FREEMAN et al., 2004). Em adição, a fitotoxidez do Ni em *P. sylvestris* causou redução na GSH e aumento na produção de GSSH nos espinhos (KUKKOLA; RAUTIO; HUTTUNEN, 2000), confirmando a importância da GSH, e consequentemente da GR na tolerância ao Ni em plantas.

A revelação da atividade da GR em PAGE não desnaturante revelou a princípio três isoenzimas da GR nas células de café controle, com a evidência de uma quarta banda de GR (banda IV) nas células de café tratadas com Ni, que se apresentou mais significativamente afetada pelo Ni após 12 h de exposição. Além disso, todas as isoenzimas da GR nas células tratadas com Ni exibiram mudanças na atividade. Dois genes codificando GR foram identificados em *A. thaliana*, *gr1* e *gr2*, que codificam isoenzimas da GR citossólica e plastidial, respectivamente (XIANG; OLIVER, 1998). Apesar de que em plantas a maior parte da atividade da GR ser localizada nos cloroplastos, aparentemente nas células em suspensão de café as isoenzimas de GR citossólicas são provavelmente predominantes devido ao cultivo no escuro, mas a atividade da GR plastidial não pode ser descartada.

No ciclo ascorbato-glutathiona, o H₂O₂ é reduzido a água via APX. A APX e a CAT pertencem a duas diferentes classes de enzimas de limpeza do H₂O₂ devido suas diferentes afinidades, com a APX tendo o K_m na gama μM e a CAT na gama mM. Portanto, enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das EAOs para a sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de EAOs gerado durante o estresse. Além disso, a APX faz limpeza do H₂O₂ em compartimentos que não possuem a CAT, como os cloroplastos. As plantas também contêm isoenzimas plastidiais e citossólicas da APX, que possuem diferentes sequências de aminoácidos, mas participam na limpeza do H₂O₂ em diferentes compartimentos (ASADA, 1999). Nas células de café, a atividade da APX aumentou rapidamente sob o tratamento com

NiCl₂. A atividade da APX aumentou sob tratamento com Ni em raízes de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 2001) e parte aérea (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998), *A. argenteum* e *A. maritimum* (SCHICKLER; CASPI, 1999).

A GOPX isolada de plantas é distinguível da APX em ambos, sequência de amino ácidos e função fisiológica. A GOPX participa em reações metabólicas como a biossíntese de lignina, decomposição do ácido indolacético (IAA), defesa contra patógenos e as respostas de plantas a uma vasta gama de estresses bióticos e abióticos (PASSARDI et al., 2004), incluindo metais pesados. A GOPX também pode ser detectada nas células de café e apresentou uma elevação geral na sua atividade em resposta ao tratamento com Ni, principalmente na dosagem 0,05 mM NiCl₂. O tratamento com Ni aumentou a atividade da GOPX em *C. cajan* (RAO; SRESTY, 2000), parte aérea de *Z. mays* (BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998), *T. aestivum* (PANDOLFINI; GABBRIELLI; COMPARINI, 1992), e em raízes dos ecotipos tolerantes e sensíveis ao Ni de *S. paradoxa* (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001), mostrando a importância da GOPX na resposta ao Ni em plantas.

Os dados deste experimentos indicam que 0,05 mM NiCl₂ deve ter induzido as defesas antioxidantes pelo rápido aumento da atividade de todas as principais enzimas antioxidantes testadas (SOD, CAT, GR, APX e GR), protegendo as células contra os efeitos deletérios das EAOs, o que poderia explicar a falta de aumento na peroxidação lipídica. Calos derivados de *Leucaena leucocephalla* (ROUT; SAMANTARY; DAS, 1999) e *Trema orientalis* (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 1999) cultivadas em solos contaminado com Ni exibiram maior atividade da CAT e GOPX e maior tolerância ao Ni que os calos obtidos de plantas cultivadas em solo não contaminado.

A tolerância ao Ni mostrou ser associada com a atividade elevada de enzimas antioxidantes em *Triticum durum*, onde uma cultivar tolerante a drogas apresentou maior tolerância ao Ni que uma cultivar sensível a drogas (PANDOLFINI; GABBRIELLI; CISCATO, 1996). Além disso, as enzimas antioxidantes GR, GOPX e APX, apresentaram atividade aumentada apenas nas plantas tolerantes a drogas (PANDOLFINI; GABBRIELLI; CISCATO, 1996). Estes resultados podem confirmar a importância das enzimas antioxidantes na tolerância ao Ni.

As células de café expostas a 0,5 mM NiCl₂ exibiram danos oxidativos baseados na avaliação visual e no aumento dos níveis de TBARS, levando a inibição do crescimento celular.

Este efeito deve ser devido a redução nos níveis dos mecanismos de tolerância ao Ni, que inclui o aumento insuficiente na atividade das enzimas antioxidantes testadas, que foram em geral menores quando comparado as atividades detectadas nos tratamentos com 0,05 mM NiCl₂. Portanto, com a elevação na concentração do Ni, um maior aumento da atividade das enzimas antioxidantes seria necessário para amenizar o estresse oxidativo induzido pelo Ni e manter a tolerância ao Ni nas células de café cultivadas em 0,5 mM NiCl₂. Em calos não tolerantes de *E. colona*, as atividades da CAT e GOPX foram inibidas com a elevação da concentração de Ni no meio de cultura, mas em calos tolerantes, o aumento nas atividades da CAT e APX foram observados como consequência da elevação da concentração de Ni (SAMANTARAY; ROUT; DAS, 2001), sugerindo que acréscimos nas enzimas antioxidantes foram necessários para a tolerância ao Ni em altas concentrações de Ni. Além disso, a atividade da CAT decresceu durante tratamento com Ni em *S. paradoxa* sensível ao Ni, mas o acréscimo na atividade da CAT em resposta ao tratamento com Ni foi observado num ecotipo tolerante ao Ni, onde apenas a parte aérea do ecotipo sensível ao Ni demonstrou um aumento na quantidade de TBARS após a mesma exposição ao Ni (GONNELLI; GALARDI; GABBRIELLI, 2001), mostrando a correlação entre sensibilidade ao Ni, peroxidação lipídica e resposta de enzimas antioxidantes.

Apesar do H₂O₂ ser uma EAO tóxica, ele também funciona como uma molécula sinalizadora e está também envolvido na regulação da expressão gênica por estresses abióticos (NEILL et al., 2002). Além disso, é suposto que a morte celular mediada pelo O₂¹ não é resultado direto dos danos *per se*, mas até certo ponto é geneticamente programada via EXECUTOR1 (FOYER; NOCTOR, 2005). Portanto, a toxidez gerada por 0,5 mM NiCl₂ pode ter levado a um desbalanço deletério na produção e limpeza das EAOs, levando a alterações na sinalização de outros processos fisiológicos nas células de café. Estudos sequentes com outras enzimas antioxidantes e compostos antioxidantes, como GSH, ascorbato e tocoferol, poderiam fornecer mais informações a respeito da resposta ao estresse oxidativo induzido pelo Ni em culturas de células em suspensão de café.

Será importante investigar mais detalhadamente a indução do crescimento celular por baixas concentrações de Ni em células de café, que poderia ser utilizado para elevar a eficiência das culturas *in vitro*. Além disso, estudos futuros considerando também a influência do Ni na embriogênese somática, poderiam prover novas informações dos efeitos benéficos do Ni no cultivo de cultura de tecidos e células e na regeneração de espécies vegetais cultivadas. Foi

também demonstrado que baixas concentrações de Ni induziram o crescimento de calos, uma alta frequência de embriogênese somática e uma elevada taxa de sobrevivência após transferência das plantas ao solo em *Setaria italica* (ROUT; SAMANTARY; DAS, 1998).

3.4 Material e Métodos

3.4.1 Suspensão celular

Folhas do terceiro e quarto par de folhas de *C. arabica* variedade Catuaí Vermelho foram utilizadas para produzir as culturas celulares (NEUENSCHWANDER; BAUMANN, 1992). Os explantes foram mantidos em meio CIM sólido (pH 5,8) contendo sais MS, e suplementado com 10 mg.L⁻¹ de tiamina-HCl, 100 mg.L⁻¹ de inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 4 mg.L⁻¹ de cinetina e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D. As caloses produzidas em 8 a 9 semanas no escuro e apresentando uma coloração amarelo palha e aspectos friáveis foram selecionadas e transferidas para 30 mL de meio CIM líquido e mantidas a 100 rpm no escuro, a 25 ± 2 °C. A cada 15 dias, metade do volume do frasco foi transferido para um novo frasco contendo 15 mL de meio CIM. Neste estágio, agregados grandes foram eliminados com um forceps, e ao final de dois meses as suspensões celulares eram formadas por pequenos agregados homogêneos, com coloração creme.

3.4.2 Tratamento das células e crescimento celular

Células com sete dias de idade foram secas por sucção e lavadas com água estéril destilada e deionizada, e foram transferidas ao meio CIM na densidade de 4 g de células por 50 mL⁻¹. O NiCl₂ foi então adicionado nas concentrações finais zero (controle), 0,05 e 0,5 mM e as células foram cultivadas por 288 h sob as mesmas condições de cultivos descritas acima. As células coletadas em distintos períodos durante o ciclo celular, foram secas por sucção e lavadas com água estéril destilada e deionizada, pesadas para a determinação de massa celular e estocadas a -80 °C para análises sequentes.

3.4.3 Acúmulo de Ni

A análise quantitativa do Ni foi conduzida utilizando energia de fluorescência da dispersão de raios-X (EDXRF) com a técnica de excitação de radioisótopos conforme descrito previamente (NASCIMENTO-FILHO, 1999). As amostras de café foram secas a 60 °C por 14 dias. As amostras foram maceradas e homogeneizadas com H₃BO₄ na proporção 1:9 (m/m) e 1 g do homogeneizado foi utilizado na EDXRF.

3.4.4 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela medição da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito previamente (BUEGE; AUST, 1978). As células (300 mg) foram homogeneizadas com pistilo e mortar com 20% (m/m) de polivinilpirrolidona (PVPP) insolúvel e 1,3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. 250 µL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 20% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA). Esta solução foi incubada em banho quente a 95 °C por 20 min, e a reação foi paralisada pelo resfriamento rápido em banho de água e gelo. A absorbância das TBARS formadas foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm. As medidas foram corrigidas para turbidez inespecífica pela subtração da absorbância a 600 nm. A concentração das TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar $1,55 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4.5 Extração enzimática

Os passos seguintes foram conduzidos a 4 °C. As células de café foram homogeneizadas (2:1 volume de tampão/ massa fresca) em mortar e pistilo, com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 3 mM de DL-ditiotreitol e 5% (m/v) de PVPP insolúvel. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 30 min e o sobrenadante foi estocado cuidadosamente em alíquotas separadas a -80 °C, antes de fazer as análises de CAT, GR, APX, GOPX e SOD.

3.4.6 Ensaio da CAT

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998), com algumas pequenas modificações. A atividade da CAT foi ensaiada em espectrofotômetro a 25 °C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 2,5 µL de solução a 30% (v/v) de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 15 µL de extrato vegetal e a atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da degradação do H₂O₂ a 240 nm durante 1 min contra um branco livre de extrato vegetal.

3.4.7 Ensaio da GR

A atividade da GR foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998). A atividade da GR foi ensaiada em espectrofotômetro a 30 °C em uma mistura consistindo de 3 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 1 mM de glutathiona oxidada (GSSG) e 0,1 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato enzimático. A taxa de redução da GSSG foi seguida pelo monitoramento do aumento na absorbância a 412 nm durante 2 min.

3.4.8 Ensaio da APX

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981), pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm a 30 °C. O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ e 100 µL de extrato enzimático, num volume total de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição do ascorbato. O decréscimo na absorbância foi monitorado de 10 a 60 s.

3.4.9 Ensaio da GOPX

A atividade da GOPX foi determinada conforme descrito por Matsuno e Uritani (1976). O meio de reação continha 250 µL de tampão fosfato-citrato (0,2 M de fosfato de sódio dibásico:

0,1 M de ácido cítrico) pH 5,0, 150 μ L de extrato enzimático e 25 μ L de 0,5% (v/v) de guaiacol, que foi misturado em vortex e incubado a 30 °C por 15 min. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em banho de água e gelo, seguido pela adição de 25 μ L da solução de metabisulfito de sódio a 2% (m/v). Após misturar em vortex, a mistura de reação ficou em repouso por 10 min e a atividade da GOPX foi avaliada pela leitura da absorbância a 450 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde ao aumento de 0,001 na absorbância por min.

3.4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Os tampões de eletroforese e os géis foram preparados conforme descrito previamente (LAEMMLI, 1970), exceto que o SDS foi excluído. A eletroforese foi conduzida sob condições não desnaturantes em géis de poliacrilamida a 9% (m/v), para a revelação da atividade de CAT, GR e SOD. Uma corrente de 30 mA/gel foi aplicada por 8 h (géis para revelação da atividade de CAT), 4 h (géis para revelação da atividade de GR) ou 3 h (géis para revelação da atividade de SOD) a 4 °C. Quantidades iguais de proteína foram colocados em cada linha.

3.4.11 Revelação da atividade da SOD

Após separação eletroforética, a atividade da SOD foi determinada conforme descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Azevedo et al. (1998). Os géis foram lavados em água destilada e deionizada e incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 1 mM de EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% (v/v) de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED). Ao final deste período, a mistura de reação foi retirada dos géis, que foram lavados com água destilada e deionizada e então iluminados em água até o desenvolvimento de bandas descoloridas relativas à atividade da SOD, num gel de revelação púrpura. Para paralisar a reação, os géis foram transferidos para ácido acético a 6% (v/v).

3.4.12 Revelação da atividade da CAT

A atividade da CAT em géis nativos foi determinada conforme descrito por Woodbury; Spencer and Stahmann (1971). Os géis foram incubados em 0,003% (v/v) de H₂O₂ por 10 min e revelados em uma solução contendo 1% (m/v) de FeCl₃ e 1% (m/v) de K₃Fe(CN₆) por 10 min.

3.4.13 Revelação da atividade da GR

A atividade da GR em géis nativos foi determinada conforme descrito previamente (LEE; LEE, 2000) com modificações conforme descrito por Medici et al. (2004). Os géis foram lavados em água destilada e deionizada, e incubados no escuro por 30 min em temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 0,25 mM de Tris, 0,5 mM de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), 0,7 mM de 2,6-dicloro-*N*-(4-hidroxifenil)-1,4-benzoquinonaimina de sódio (DPIP), 3,4 mM de GSSG e 0,5 mM de NADPH.

3.4.14 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.4.15 Delineamento experimental

O experimento foi baseado em um delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado. Os dados foram analisados estatisticamente e os resultados expressam a média e o desvio padrão da média (\pm SEM) de 4 repetições independentes para crescimento celular, 3 repetições independentes para TBARS, atividade de CAT, GR, GOPX e APX, ou duas repetições independentes para as medidas de acúmulo de Ni.

Referências

- ANZA, M.; RIGA, P.; GARBISU, C. Time course of antioxidant response of *Capsicum annuum* subjected to progressive magnesium deficiency. **Annals of Applied Biology**, Warwik v. 146, p. 123-134, 2005.
- ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.
- 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 leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel-induced oxidative damage and responses in *Zea mays* shoots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, p. 689-694, 1998.
- BACCOUCH, S.; CHAOUI, E.L.; EL FERJANI, E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 7, p. 1085-1097, 2001.
- BARONDEAU, D.P.; KASSMANN, C.J.; BRUNS, C.K.; TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism, **Biochemistry**, Washington, v. 43, p. 8038-8047, 2004.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase- Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 276-282, 1971.
- BHATIA, N.P.; WALSH, K.B.; ORLIC, I.; SIEGELE, R.; ASHWATH, N.; BAKER, A.J.M. Studies on spatial distribution of nickel in leaves and stems of the metal hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* using nuclear microprobe (micro-PIXE) and EDXS techniques. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, p. 1061-1074, 2004.
- BOOMINATHAN, R.; DORAN, P.M. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. **New Phytologist**, Oxford, v. 156, p. 205-215, 2002.

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, 1976.

BROADHURST, C.L.; CHANEY, R.L.; ANGLE, J.S.; ERBE, E.F.; MAUGEL, T.K. Nickel localization and response to increasing Ni soil levels in leaves of the Ni hyperaccumulator *Alisum murale*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 265, p. 225-242, 2004.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 52, p. 302-310, 1978.

CARDOSO, P.F.; GRATÃO, P.L.; GOMES-JUNIOR, R.A.; MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 267-272, 2005.

CHAOUI, A. MAZHOUDI, S.; GHORBAL, 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**, Clare, v. 127, p. 139-147, 1997.

CHEN, C.; WANG, Y.; LIN, Y. Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes, **Archives of Toxicology**, New York, v. 77, p. 123-130, 2003.

CITTERIO, S.; SANTAGOSTINO, A.; FUMAGALLI, P.; PRATO, N.; RANALLI, P.; SGORBATI, S. Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 256, p. 243-252, 2003.

DAZA, M.C.; SANDALIO, L.M.; QUIJANO-RICO, M.; DEL RIO, L.A. Isoenzyme pattern of superoxide dismutase in coffee leaves from cultivars susceptible and resistant to the rust *Hemileia vastatrix*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 41, p. 521-526, 1993.

DUNWELL, J.M.; PURVIS, A.; KHURI, S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 7-17, 2004.

ELSTNER, E.F. **Biochemistry of plants: Metabolism of activated oxygen species**. London: Academic Press, 1987. p. 253-315.

FIDALGO, F.; SANTOS, A.; SANTOS, I.; SALEMA, R. Effects of long term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 145, p. 185-192, 2004.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; PEREIRA, G.J.G.; MOLINA, S.M.G.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 125-131, 2002.

FOYER, C.H; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

FREEMAN, J.L.; PERSANS, M.W.; NIEMAN, K.; ALBRECHT, C.; PEER, W.; PICKERING, I.J.; SALT, D.E. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2176-2191, 2004.

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, 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.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

GOLDSTEIN, S.; CZASPKI, G. Transition metals and oxygen radicals. In: RICHTER, G.; SOLEZ, K.; AISEN, P.; COHEN, G. (Ed.). **International review of experimental pathology**. New York: Academic Press, 1990, p.133-164.

GONNELLI, C.; GALARDI, F.; GABBRIELLI, R. Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 507-514, 2001.

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

INGLE, R.A.; MUGFORD, S.T.; REES, J.D.; CAMPBELL, M.M.; SMITH, J.A.C. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2089-2106, 2005.

INOUE, M. Phytochelatins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 65-78, 2005.

KRAMER, U.; PICKERING, I.J.; PRINCE, R.C.; RASKIN, I.; SALT, D.E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi species*, **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 1343-1353, 2000.

KUKKOLA, E.; RAUTIO, P.; HUTTUNEN, S. Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings, **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 197-210, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, 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 Science**, Clare, v. 159, p. 75-85, 2000.

LLOYD, D.R.; CARMICHAEL, P.L.; PHILLIPS, D.H. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions, **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 11, p. 420-427, 1998.

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

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 13, p. 1091-1101, 1972.

MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 31, p. 1-9, 2004.

MOLAS, J. Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an in vitro excess of nickel. **Photosynthetica**, Prague, v. 34, p. 513-522, 1997.

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

NASCIMENTO-FILHO, V. **Técnicas Analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF)**. Piracicaba, ESALQ-USP, 1999. 32 p.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NEUENSCHWANDER, B.; BAUMANN, T.W. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 10, p. 608-612, 1992.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; CISCATO, N. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, n. 12, p. 1611-1627, 1996.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 15, p. 719-725, 1992.

PARIDA, B.K.; CHHIBBA, I.M.; NAYYAR, V.K. Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, p. 113-119, 2003.

PASSARDI, F.; LONGET, D.; PENEL, C.; DUNAND, C. The class III peroxidase multigene family in rice and its evolution in land plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, p. 1879-1893, 2004.

PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; GOMEZ, E.; TIEMANN, K.J.; PARSONS, J.G.; CARRILO, G. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 119, p. 291-301, 2002.

POULIK, Z. The danger of cumulation of nickel in cereals on contaminated soil. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 63, p. 25-29, 1997.

RAO, K.V.M.; SRESTY, T.V.S. Antioxidative parameters in seedling of pige on pea (*Cajanus cajan* L.) Millspaugh to Zn and Ni stress. **Plant Science**, Clare, v. 157, n. 1, p. 113-128, 2000.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; RODRIGUEZ-SERRANO, M.; CORPAS, F.J.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 in pea leaves. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, p. 1122-1134, 2004.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Chromium, nickel and zinc tolerance in *Leucaena leucocephalla* (K8). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, p. 151-157, 1999.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. The role of nickel on somatic embryogenesis in *Setaria italica* L. *in vitro*, **Euphytica**, Dordrecht, v. 101, p. 319-324, 1998.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R.; DAS, P. Chromium and nickel tolerance of *Trema orientalis* (Blume) L. in tissue culture. **Acta Physiologia Plantarum**, Krakow, v. 21, n. 1, p. 27-35, 1999.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R.; DAS, P. Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of *Echinochloa colona* (L.) Link *in vitro*, **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, p. 1281-1290, 2001.

SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.C.; 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, p. 2115-2126, 2001.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 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.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D.L.; POLLE, A. Cadmium-induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 887-898, 2001.

SINHA, S.; PANDEY, K. Nickel induced toxic effects and bioaccumulation in the submerged plant, *Hydrilla verticillata* (L.F.) royle under repeated metal exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 71, p. 1175-1183, 2003.

STEARNS, J.C.; SHAH, S.; GREENBERG, B.M.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 701-708, 2005.

VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D. Nickel hyperaccumulation in shoot cultures of *Alisum markgrafii*. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 49, p. 121-124, 2005.

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

XIANG, C.; OLIVER, D.J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1539-1550, 1998.

WITTE, C.P.; TILLER, S.; ISIDORE, E.; DAVIES, H.V.; TAYLOR, M.A. Analysis of two alleles of the urease gene from potato: polymorphisms, expression, and extensive alternative splicing of the corresponding mRNA. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 91-99, 2005.

WOODBURY, W.; SPENCER, A.K.; STAHMANN, M.A. Improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 301, 1971.