

SISTEMA ANTIOXIDANTE DE CAFEIROS CULTIVADOS EM DIFERENTES ALTITUDES NA SERRA DA MANTIQUEIRA¹

Helbert Rezende de Oliveira Silveira²; Kamila Rezende Dázio de Souza³; Isabel Rodrigues-Brandão⁴; Meline de Oliveira Santos⁵; Patrícia de Fátima Pereira Goulart⁶; Jose Donizeti Alves⁷

¹Financiado pela FAPEMIG – APQ 02004-11

Doutor em Fisiologia Vegetal, Pós-Doutorando na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Campus da UFLA – herosrezende@yahoo.com.br

³Doutor em Fisiologia Vegetal, Pós-Doutorando PNPd/CAPES no Setor de Fisiologia Vegetal, UFLA – krdazio@hotmail.com

⁴Doutor em Fisiologia Vegetal, Pós-Doutorando na Embrapa Café, Campus da UFLA – brandao.brandona@hotmail.com

⁵Doutor em Fisiologia Vegetal, Bolsista na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Campus da UFLA – melineoli@hotmail.com

⁶Doutor em Ciência dos Alimentos, Professor no Centro Universitário de Lavras – pat.goulart@hotmail.com

⁷Doutor em Fisiologia Vegetal, Professor Titular no Departamento de Biologia, UFLA – jdalves@dbi.ufla.br

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de ascorbato e peróxido de hidrogênio, bem como a peroxidação lipídica em cafeeiros situados em três diferentes altitudes da região da Serra da Mantiqueira. Foram realizadas avaliações nas quatro estações do ano, em que coletou-se folhas completamente expandidas do terço mediano das plantas. Avaliou-se a geração de peróxido de hidrogênio, níveis de peroxidação lipídica e concentração de ascorbato. Os cafeeiros da maior altitude apresentaram, em todas as estações do ano, maiores concentrações de ascorbato, menor geração de peróxido de hidrogênio e menores níveis de peroxidação lipídica do que os cafeeiros da menor altitude. Os atributos ligados à maior qualidade da bebida de cafés de altitudes mais elevadas podem também estar relacionados com a maior atuação, na planta, do sistema antioxidante para neutralização das espécies reativas de oxigênio, reduzindo os danos às membranas celulares.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, peroxidação lipídica, estresse oxidativo, ascorbato

ANTIOXIDANT SYSTEM OF COFFEE PLANTS CULTIVATED IN DIFFERENT ALTITUDES AT “SERRA DA MANTIQUEIRA”

ABSTRACT: The aim of this work was to evaluate the levels of ascorbate and hydrogen peroxide, as well as the lipid peroxidation in coffee plants from three different altitudes at “Serra da Mantiqueira” region. The evaluations were performed in the four seasons of the year, when fully expanded leaves from the mid third of the plants were harvested. We evaluated the generation of hydrogen peroxide, levels of lipid peroxidation and concentrations of ascorbate. Coffee plants from high altitude showed, in all of the seasons through the year, higher ascorbate concentrations, lower hydrogen peroxide generation and lower levels of lipid peroxidation, when compared to those plants from the lowest altitude. The attributes related to the good drink quality in coffee from the high altitude may also be related to the best performance of the antioxidant system for reactive oxygen species neutralization, leading to the reduction of damages caused in cell membranes.

KEYWORDS: *Coffea arabica*, lipid peroxidation, oxidative stress, ascorbate.

INTRODUÇÃO

A região Sul de Minas é a maior produtora de café do estado e do Brasil, marcada por grandes variações edafoclimáticas, o que faz com que a qualidade do café se expresse de maneiras distintas. Dentro dessa região destaca-se, pela elevada qualidade sensorial dos cafés produzidos, a microrregião da Serra da Mantiqueira. As características singulares dos cafés desta microrregião e a consistência apresentada nos resultados dos principais concursos de qualidade realizados no Brasil comprovam a vocação para a produção de cafés especiais. Em razão dessas características, os cafés produzidos na microrregião da Serra da Mantiqueira vêm obtendo crescente reconhecimento pelo mercado internacional. (SILVEIRA, 2014)

As características relacionadas ao desenvolvimento e frutificação do cafeeiro são altamente influenciadas pelo ambiente, dessa maneira, torna-se necessária a associação de estudos comportamentais da planta a técnicas e ferramentas que permitam ampliar o conhecimento sobre o seu comportamento. Plantas cultivadas em elevadas altitudes estão expostas à maior irradiância, flutuações diurnas de temperatura, alta velocidade do vento, redução de pressão parcial de gases, limitação de água e nutrientes, curto espaço de tempo para o crescimento e desenvolvimento. Essas

condições a que as plantas estão expostas podem alterar suas respostas fisiológicas e morfológicas em comparação com as plantas cultivadas em baixa altitude (ZHU et al., 2010).

Condições adversas podem levar à maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que poderá culminar em estresse oxidativo. A homeostase celular é mantida pela ação de um sistema antioxidante que, dentre vários componentes, é formado pelos antioxidantes não enzimáticos ascorbato, glutatona, carotenóides e tocoferóis (SHARMA et al., 2012). Apesar da presença de um eficiente sistema antioxidante, danos oxidativos, ainda, ocorrem nas células vegetais, quer em virtude da produção descontrolada ou remoção ineficiente das EROs em casos de estresse oxidativo (BHATTACHARJEE, 2005). O nível de EROs determina o tipo de resposta: enquanto suas baixas concentrações podem induzir a expressão de genes de defesa, concentrações elevadas levam à morte celular. Em condições de estresse, as EROs induzem à desestruturação da membrana lipídica (acúmulo de malondialdeído - MDA) e perturbam muitas funções biológicas em decorrência dos danos estruturais de proteínas e (ZHU et al., 2010) ácidos nucleicos (BHATTACHARJEE, 2005).

Nesse sentido, o estudo da interação do ambiente com a lavoura cafeeira, baseado na fisiologia do desenvolvimento vegetativo e suas interações ecofisiológicas, é fundamental para o conhecimento acerca dos atributos que podem influenciar na qualidade dos cafés em diferentes altitudes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de ascorbato e peróxido de hidrogênio, bem como a peroxidação lipídica em cafeeiros de diferentes altitudes na Serra da Mantiqueira.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Carmo de Minas, localizado na Serra da Mantiqueira. Sua posição é determinada pelas coordenadas geográficas de: 22°07'21" de latitude sul e 45°07'45" de longitude oeste, com temperatura média anual de 19,1 °C e índice pluviométrico anual de 1568,9 mm. O clima do local, de acordo com a classificação de Köppen, é tropical de altitude (Cwb) com verões muito brandos e úmidos e invernos secos, com um período de estiagem de 5 a 6 meses (abril a setembro).

Foram selecionadas três cotas de altitudes: 965 m, 1.195 m e 1.430 m. A cultivar avaliada foi Bourbon Amarelo, *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo. Foram utilizadas estações meteorológicas automáticas, modelo E5000 – Irriplus, em cada cota de altitude para acompanhamento das condições climáticas locais. Os dados das estações meteorológicas foram cedidos pelo projeto “Protocolo de identidade, qualidade e rastreabilidade para embasamento da Indicação Geográfica dos Cafés da Mantiqueira” coordenado pelo Prof. Flávio Meira Borém.

As avaliações foram realizadas nas quatro estações do ano (Primavera, Verão, Outono e Inverno), no período de Setembro de 2011 a Agosto de 2012, sendo uma avaliação por estação, com coleta de material vegetal para as análises bioquímicas.

O material vegetal foi obtido, aleatoriamente, no terceiro ou quarto pares de folha completamente expandida, do terço médio de plantas. As coletas foram realizadas em cada uma das altitudes estudadas e em cada estação do ano, com seis repetições por altitude. As amostras foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer até a realização das análises.

A extração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi realizada a partir da maceração de duzentos miligramas de tecido foliar em nitrogênio líquido, seguida da homogeneização em 1,5 mL de ácido tricloroacético 0,1% (m/v). Em seguida, procedeu-se à centrifugação das amostras a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H₂O₂ foi determinado, medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio. A quantificação foi realizada com base em uma curva-padrão com concentrações conhecidas de H₂O₂ (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido foliar foram macerados em N₂ líquido, acrescido de 20% de polivinilpirrolidona (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico e 10% (m/v) de ácido tricloroacético, incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras determinadas em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em µmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca.

Os níveis de ascorbato foram determinados conforme descrito por Arakawa et al. (1981), com algumas modificações. Cinquenta miligramas de tecido de folhas foram macerados em ácido tricloroacético TCA 5% (m/v) e o homogeneizado centrifugado a 10.000 g por 15 minutos, a 4 °C. O ascorbato foi determinado após a redução do dehidroascorbato DHA pelo etanol a 95%. Vinte microlitros do sobrenadante foram adicionados ao meio de reação composto por TCA 5% (m/v), etanol 95% e fosfato de sódio 0,2 M, pH entre 7 e 8 (ajustado com NaOH 1,2 M). Em seguida, adicionou-se ácido fosfórico (H₃PO₄) 4% (v/v), bathophenantrolina 0,5% (p/v) e FeCl₃ 0,03% (m/v), homogeneizando-se a mistura vigorosamente e incubando-a, a 30 °C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas a 534 nm. Todas as soluções foram

preparadas em etanol 95%, exceto o TCA e o fosfato de sódio. A quantificação do ascorbato foi realizada com base na curva-padrão com concentrações conhecidas de ascorbato.

Os dados foram analisados por meio de ANAVA pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR 4.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram verificados maiores teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos cafeeiros que estavam localizados na menor altitude, enquanto os menores teores foram encontrados na maior altitude (Figura 1). Observou-se uma maior concentração de H_2O_2 nas estações de crescimento ativo (primavera e verão) e menores teores nas estações de crescimento reduzido (outono e inverno).

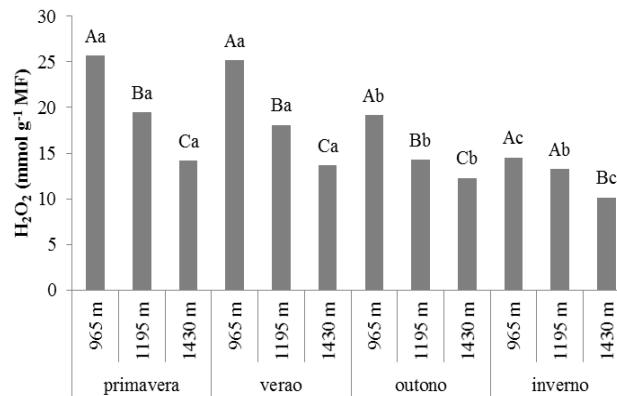


Figura 1: Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de cafeeiros submetidos a diferentes altitudes; 965 m, 1195 m e 1430 m nas quatro estações do ano. Letras maiúsculas comparam as altitudes em cada estação do ano e letras minúsculas comparam cada altitude ao longo das estações do ano. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Com relação aos teores de malondialdeído (MDA), produto resultante da peroxidação lipídica, também foram mais elevados na menor altitude, enquanto os menores valores foram encontrados na maior altitude (Figura 2). Comparando-se os níveis de peroxidação lipídica entre as estações do ano, plantas da menor altitude apresentaram os menores valores no inverno, enquanto as plantas da maior altitude tiveram seus níveis aumentados nesta estação. Para altitude intermediária, maiores valores foram encontrados no verão.

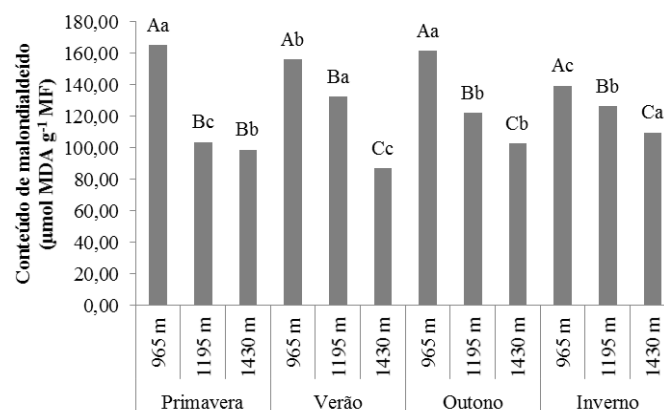


Figura 2: Conteúdo de malondialdeído (MDA), em folhas de cafeeiros submetidos a diferentes altitudes; 965 m, 1195 m e 1430 m nas quatro estações do ano. Letras maiúsculas comparam as altitudes em cada estação do ano e letras minúsculas comparam cada altitude ao longo das estações do ano. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os cafeeiros localizados nas menores altitudes apresentaram maiores atividades do metabolismo fotossintético, respiratório e fotorrespiratório (SILVEIRA, 2014). Este metabolismo ativo, juntamente com a exposição destes cafeeiros a maiores temperaturas, podem ser os responsáveis pelo aumento na produção de EROs nas menores altitudes.

A produção e eliminação de EROs em equilíbrio é perturbada sob uma série de condições estressantes, como salinidade, seca, alta luminosidade, aumento na temperatura, patógenos e assim por diante (GILL; TUTEJA, 2010). Quando o nível de EROs excede a capacidade antioxidante de uma célula, há ocorrência de estresse oxidativo. Maior nível de EROs pode causar danos a biomoléculas tais como lipídios, proteínas e DNA. Estas reações podem alterar as propriedades intrínsecas da membrana, como a fluidez, o transporte de íons, a perda de atividades enzimáticas, a inibição da síntese de proteínas, danos no DNA e, em último caso, levar à morte celular (SHARMA et al., 2012). Neste trabalho foi verificado que, em menor altitude, onde as temperaturas foram mais elevadas ao longo do ano, houve uma elevada produção de EROs que culminou com maior peroxidação lipídica nas plantas expostas a esta condição. Ao contrário do observado nos teores de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica, as plantas localizadas na maior altitude apresentaram maiores teores de ácido ascórbico (AsA) (Figura 3). Nas estações mais frias do ano, outono e inverno, foi observado maior teor de AsA quando comparado às demais estações, primavera e verão. Provavelmente essa maior concentração de AsA evitou que, em condições de estresse por redução na temperatura, houvesse maior produção de EROs e, conseqüentemente, maiores danos ao sistema fotossintético do cafeeiro.

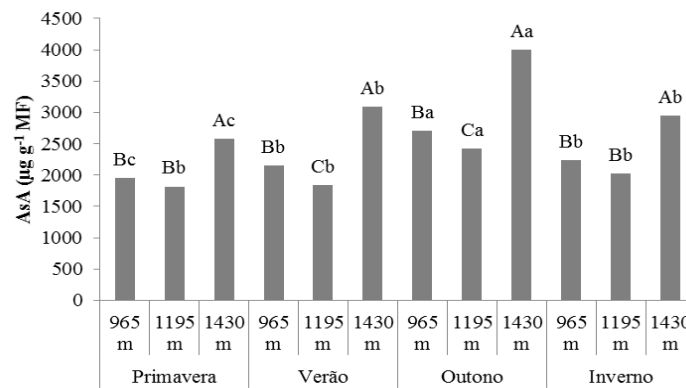


Figura 3: Conteúdo de ácido ascórbico (AsA) em folhas de cafeeiros submetidos a diferentes altitudes; 965 m, 1195 m e 1430 m nas quatro estações do ano. Letras maiúsculas comparam as altitudes em cada estação do ano e letras minúsculas comparam cada altitude ao longo das estações do ano. Letras diferentes indicam diferenças significativas a 0,05 de probabilidade, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Estudos têm comprovado que, em plantas cultivadas em altitudes elevadas, ocorre um aumento na concentração de antioxidantes e de outros compostos solúveis que estão associados à sobrevivência nestas condições (ÔNCELL et al., 2004; REN et al., 1999). Assim sendo, o ácido ascórbico, antioxidante de baixo peso molecular, encontrado em maiores concentrações nos cafeeiros localizados em altas altitudes, provavelmente, agiu neutralizando e reduzindo os teores de EROs, evitando que ocorressem danos celulares em cafeeiros expostos ao estresse por baixas temperaturas. Isto pode ser comprovado pelos menores níveis de H_2O_2 e de peroxidação lipídica nas plantas da maior altitude.

Os cafeeiros localizados nas menores altitudes apresentaram um metabolismo mais ativo (SILVEIRA, 2014), que, juntamente com a exposição destes cafeeiros a maiores temperaturas e menores conteúdos de AsA, ocasionou o aumento na produção de EROs (H_2O_2) nas menores altitudes, culminando com o aumento de peroxidação lipídica nestes cafeeiros.

Por outro lado, cafeeiros cultivados em maior altitude possuem desenvolvimento mais tardio e lento que os cultivados em baixas e intermediárias altitudes prolongando o desenvolvimento do fruto. Existe exatamente uma combinação dos atributos como acidez baixa, corpo baixo e doçura alta, indicando que os cafés produzidos em maior altitude apresentam potencialmente melhores características para obtenção de bebidas finas (SILVA et al., 2004). Esses atributos relacionados à maior qualidade da bebida podem estar relacionados à maior atuação, na planta, do sistema antioxidante para neutralização das EROs, reduzindo os danos às membranas celulares.

CONCLUSÃO

Existe uma diferença entre a geração de peróxido de hidrogênio, níveis de peroxidação lipídica e de ascorbato em *Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo cultivados em diferentes altitudes da Serra da Mantiqueira. A maior qualidade da bebida dos cafeeiros de altitude mais elevada pode estar relacionada também à menor geração de EROs e maiores concentrações de antioxidantes, culminando com menor peroxidação lipídica nas células dessas plantas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKAWA, N. et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio, v. 45, n. 5, p. 1289-1290, May 1981.
- BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. **Current Science**, Columbus, v. 89, n. 7, p. 1113-1121, Oct. 2005.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.
- ÖNCEL, I. et al. Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants. **Acta Oecologica**, Paris, v. 26, n. 3, p. 211-218, Dec. 2004.
- REN, H. X. et al. Antioxidative responses to different altitudes in *Plantago major*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 42, n. 1, p. 51-59, Aug. 1999.
- SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-26, 2012.
- SILVA, R. F. et al. Qualidade do café-cereja descascado produzido na região sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1367-1375, Nov./dez. 2004.
- SILVEIRA, H. R. O. **Variação sazonal de atributos ecofisiológicos e metabólicos de café arábica em três altitudes**. 2014. 73p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants : protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.
- ZHU, J. T. et al. Ecophysiological adaptation of *Calligonum roborovskii* to decreasing soil water content along an altitudinal gradient in the Kunlun Mountains, Central Asia. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 57, n. 6, p. 826-832, Nov. 2010.