

CRISTINA GENEROSA DE SENNA QUEIROZ

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE POR RESFRIAMENTO EM
RAÍZES DE CAFÉ: IDENTIFICAÇÃO DOS DANOS
OXIDATIVOS POR MICROCALORIMETRIA,
ESPECTROSCOPIA EPR E ATIVIDADE DE
ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Cristina Generosa de Senna Queiroz
e aprovada pela Comissão Julgadora.

20/03/97 *Acum*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães.

Campinas - SP

1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
V.	322
Ex.	
MOD BC/	30944
PROC.	281/97
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/04/97
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00098943-4

Q32a

Queiroz, Cristina Generosa de Senna

Avaliação do estresse por resfriamento em raízes de café : identificação dos danos oxidativos por microcalorimetria, espectroscopia EPR e atividade de enzimas anti-oxidantes/ Cristina Generosa de Senna Queiroz. - - Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador : Antonio Celso Novaes de Magalhães.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Café - Pesquisa. 2. Enzimas. 3. Peroxidação. 4. Calorimetria. I. Magalhães, Antonio Celso Novaes de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 10 de Março de 1997

BANCA EXAMINADORA:

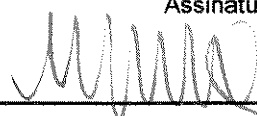
TITULARES:

Prof. Dr. Antonio Celso Novaes de Magalhães



Assinatura

Prof. Dr. Marcos Luiz dos Mares-Guia



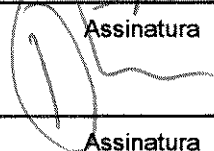
Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



Assinatura

Dr. Antonio Alonso



Assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Jorge Vega



Assinatura

Prof. Dra. Marlene Schiavinatto



Assinatura

Aos meus pais,

aos meus filhos,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Celso Magalhães, pela orientação dinâmica, segura, confiante, e sempre otimista, e pela atenção durante todas as fases deste trabalho, agradeço de forma especial.

Ao Prof. Dr. Marcos Luiz dos Mares-Guia, pelo impulso inicial, pela confiança em mim depositada, e pela oportunidade de realizar um trabalho conjunto.

Ao Dr. Antonio Alonso, pelas discussões e pela participação efetiva e dedicada neste trabalho.

Aos Professores Jorge Vega, Ladaslav Sodek e Paulo Mazzafera, pela leitura atenciosa e pelos valiosos comentários.

Aos Professores Carlos Rettori e Gaston Barberis, pelo interesse neste trabalho e disponibilidade do laboratório de Física Quântica.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pela colaboração, e aos colegas, pela convivência agradável e carinhosa.

Ao Prof. José Pires de Lemos Filho, pelas sugestões e estímulo.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Botânica e de Bioquímica da UFMG, pelo apoio constante e amizade.

Ao Cristiano e à Viviane, pessoas especiais, pelo carinho, pela força e colaboração.

Aos meus alunos da UFMG, estímulo constante na minha vida profissional.

À UFMG, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos e a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Summary	vii
1. Introdução	1
2. Objetivos	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Cultivo das plantas	13
3.2. Medidas de Crescimento	14
3.3. Calorimetria	14
3.3.1. Descrição e princípio operacional do calorímetro de condução.....	15
3.3.2. Calibração do calorímetro	19
3.3.3. Protocolo dos experimentos de calorimetria ...	21
3.4. Determinação do consumo de oxigênio	23
3.5. Medidas de liberação de eletrólitos	24
3.6. Medidas de peroxidação de lipídios	25
3.7. Determinação da fluidez de membranas pela técnica de EPR espectroscopia com marcadores de spin	27
3.7.1. Isolamento de microssomas	30
3.8. Medidas da atividade enzimática	31
3.8.1. Extração das enzimas	31
3.8.2. Avaliação da atividade enzimática	32
3.9. Redução de TTC (Cloreto de Trifeniltetrazólio) ...	33

4. Resultados	34
4.1. Medidas de crescimento	34
4.2. Calorimetria e crescimento	35
4.3. Respiração e calorimetria	38
4.4. Liberação de eletrólitos	39
4.5. Peroxidação de lipídios	40
4.6. Fluidez de membranas	42
4.7. Atividade enzimática e redução de TTC	51
5. Discussão	53
6. Conclusões	68
7. Literatura Citada	69

RESUMO

Em várias espécies de plantas superiores tropicais e subtropicais, tais como o café (*Coffea arabica* L.), a exposição a baixas temperaturas pode causar grandes danos aos tecidos. Estas condições geralmente induzem inibição do crescimento, alterações nas taxas metabólicas e alterações funcionais em membranas. Esta pesquisa buscou identificar as alterações no crescimento da raiz, em plântulas de café de 30 dias de idade, as quais foram submetidas ao estresse por resfriamento por 6 dias, nas temperaturas de 5, 10, 15, 20 e 25°C, no escuro. O protocolo experimental incluiu medidas das taxas de calor metabólico, peroxidação de lipídios e fluidez de membranas, em adição às atividades de algumas enzimas antioxidantes. Foram utilizadas basicamente técnicas não invasivas, tais como microcalorimetria, medidas de liberação de eletrólitos e EPR espectroscopia.

Os resultados mostraram que o crescimento da raiz foi completamente inibido após exposição a 5 e 10°C, e o processo foi irreversível após o retorno das plantas à temperatura controle (25°C). Os tecidos de raiz submetidos a temperaturas abaixo de 15°C, apresentaram taxas de calor metabólico sensivelmente mais baixas em comparação com o controle e os valores mostraram-se estreitamente correlacionados com a inibição do crescimento da raiz. Em

paralelo, a liberação de eletrólitos pelas raízes aumentou significativamente nas plântulas expostas a 5 e 10°C, as quais também exibiram irreversibilidade quando as plantas retornaram à temperatura de 25°C. O tratamento a 10°C induziu ainda aumento significativo na peroxidação de lipídios de membrana, quando comparado com 15 e 25°C.

Os espectros de EPR mostraram que os marcadores de spin 5-, 12- e 16-DSA (ácido doxil esteárico), foram capazes de intercalar com os lipídios de membrana celular de tecidos de raiz em segmentos apicais intactos. À profundidade do 5° e 16° átomos de carbono da cadeia acíclica, o radical nitróxido do marcador de spin detectou membranas mais rígidas em plântulas submetidas à temperatura de 10°C, comparado com as amostras tratadas a 15 e 25°C. Na posição do C-12 da cadeia a sonda apresentou um movimento muito restrito e foi insensível às alterações induzidas pelo resfriamento nas membranas.

As atividades de algumas enzimas antioxidantes, tais como ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e catalase, mostraram respostas variadas em tecidos submetidos à baixa temperatura (10°C). Ascorbato peroxidase e catalase não apresentaram alterações significativas em condições de resfriamento, enquanto a atividade da guaiacol peroxidase aumentou 55%, comparado ao controle, a 25°C. Por outro lado, a atividade de glutathione redutase diminuiu, paralelamente à capacidade de redução de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio).

Nossos resultados mostraram que o estresse por resfriamento em plântulas de café expostas a 10°C por 6 dias pode ser interpretado como um estresse oxidativo, que resultou em peroxidação de lipídios, aumento na rigidez de membranas, vazamento de eletrólitos e redução na atividade metabólica.

SUMMARY

In several tropical and sub-tropical higher plant species, such as coffee (*Coffea arabica* L.), exposure to low temperature can cause extensive tissue damage. These conditions usually induce growth inhibition, changes in metabolic rates, and functional membrane alterations. The present research attempted to investigate the changes in root growth, in 30 days old coffee seedlings which were subjected to chilling stress for 6 days, at temperatures of 5, 10, 15, 20, and 25°C, in darkness. The experimental protocol included measurements of metabolic heat rates, lipid peroxidation, membrane fluidity, in addition to the activities of selected antioxidative enzymes. The investigation utilized basically non invasive techniques such as microcalorimetry, electrolyte leakage and EPR spectroscopy.

The results showed that root growth was completely inhibited after exposure to 5 and 10°C, the process being irreversible after 6 days of incubation at these temperatures. Root tissues subjected to temperatures below 15°C presented significant lower rates of metabolic heat compared with controls at 25°C, and the values were closely correlated with the observed root growth inhibition. In parallel, figures on electrolyte loss significantly increased in root samples of 5 and 10°C incubated plants, which also exhibited irreversibility upon being transferred to the control temperature. In addition,

the 10°C treatment induced a significant increase in the level of lipid peroxidation of root cell membranes.

In root tip tissues the electron paramagnetic resonance spectra showed that the spin probes 5-, 12- and 16-doxylstearic acid were capable to intercalate within the cellular membrane lipids. Indeed, at the depth of the 5th and 16th carbon atoms of the alkyl chains the nitroxide radical detected more rigid membranes in seedlings exposed to 10°C compared with 15 and 25°C treated samples. At C-12 position of the chains the probe showed very restrict motion and was insensitive to chilling induced membrane alterations.

The activities of some antioxidative enzymes, such as ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and catalase showed varied responses in tissues subjected to low temperatures (10°C) for 6 days. Actually, ascorbate peroxidase and catalase did not show any appreciable change under chilling conditions, while guaiacol peroxidase activity increased 55% compared to the control, at 25°C. On the other hand, glutathione reductase activity decreased, in parallel to a significant reduction in reduced TTC values.

Our results showed that the chilling stress in seedlings of coffee exposed to 10°C for 6 days, might be interpreted as an oxidative stress, which resulted in lipid peroxidation, increase in membrane rigidity, electrolyte leakage and reduction in metabolic activity.

1. INTRODUÇÃO

Muitas plantas de origem tropical e sub-tropical apresentam diversos sintomas de danos quando são expostas a baixas temperaturas, sem que o ponto de congelamento tenha sido atingido (LYONS, 1973; LEVITT, 1980; NISHIDA & MURATA, 1996). O nível da tolerância das plantas ao resfriamento varia de acordo com a origem da espécie. Por exemplo, o limite inferior de temperatura, abaixo do qual ocorrem danos sensíveis, é 0 a 4°C para plantas de região temperada, ao redor de 8°C para as subtropicais e 12-14°C para as tropicais (LYONS, 1973). A susceptibilidade ao resfriamento limita a estação de crescimento, a distribuição geográfica e as condições de armazenamento de muitas plantas cultivadas e de seus produtos (RAISON & LYONS, 1986).

A capacidade das plantas para tolerar o estresse pelo resfriamento tem sido considerada de grande importância por pesquisadores interessados tanto no fenômeno básico quanto nos aspectos de aplicação agrônômica envolvidos nos processos adaptativos a baixas temperaturas (HERNER, 1990).

O resfriamento acarreta distúrbios metabólicos diversos, que podem resultar em inibição da atividade fotossintética (TING et al., 1991), reduções na respiração (LEOPOLDO & MUSGRAVE, 1979) com decréscimos na síntese de ATP (PRASAD et al., 1994b), incremento na respiração anaeróbica, com acumulação de toxinas (LEVITT, 1980), perda de íons pela célula

(SALTVEIT JR, 1991), acumulação de carboidratos e diminuição na translocação de fotoassimilados (PAUL et al., 1990).

Como acontece com outros tipos de estresse, a intensidade dos danos é dependente das condições durante o estresse: duração, irradiância, intensidade, umidade relativa e tempo de exposição. Folhas de pepino, por exemplo, podem sobreviver a uma exposição a 10°C por uma semana, mas apresentam sintomas de injúria quando expostas a 8°C por 3 dias ou em poucas horas a 5°C (MINCHIN & SIMON, 1973). Por outro lado, plantas expostas a temperaturas ligeiramente acima de 10-12°C (isto é, a temperaturas de resfriamento), podem ser aclimatadas gradativamente às condições de baixas temperaturas, o que lhes confere uma resistência maior a exposições posteriores ao resfriamento (LYONS, 1973).

O grau de tolerância ao frio pode se alterar entre variedades de uma espécie (JAHNKE et al., 1991; KRAUS et al., 1995), sendo normalmente maior em plantas submetidas à aclimação (LYONS & BREINDENBACH, 1979). A idade fisiológica da planta também afeta a susceptibilidade ao frio, sendo a maturação do pólen o mais sensível de todos os estágios de desenvolvimento (NISHIDA & MURATA, 1996).

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) encontra-se no grupo de espécies sensíveis ao resfriamento (LEVITT, 1980), tendo como origem as florestas altiplanas da Etiópia, onde a média de temperatura se situa entre 18,5 e 21,5°C (BRIDSON, 1982). A expansão da cafeicultura para diversas outras regiões do mundo,

restritas atualmente de 22° de latitude Norte (Cuba), até 26° de latitude Sul (Brasil), trouxe algumas limitações à produtividade desta cultura, devido ao fato de em algumas dessas áreas ocorrerem quedas temporárias de temperatura, com média anual abaixo de 16°C, a qual reflete diretamente na produtividade do café (ALÈGRE, 1959; MAESTRI E BARROS, 1977).

Há evidências de que a exposição a baixas temperaturas, em condições de campo ou de laboratório, afeta a fotossíntese do cafeeiro (BAUER et al., 1985, 1990; AMARAL, 1991), a produção de cafeína (FRISHKNECHT et al., 1982), o crescimento e o metabolismo do nitrogênio (AMARAL, 1991). Embora *Coffea arabica* seja de origem tropical e caracterizada como sensível ao resfriamento, existem variações em sua resposta a baixas temperaturas quando se comparam diferentes variedades. BAUER et al. (1990), analisando nove cultivares de café, provenientes da África Central, observaram que todos foram danificados pelo estresse por resfriamento, sendo as plantas jovens mais susceptíveis que as adultas. Entretanto, alguns genótipos mostraram diferenças em relação à velocidade de recuperação da atividade fotossintética e à extensão de necrose foliar. Em adição, há informações de que a resistência ao frio de plantas de café não pode ser aumentada por decréscimo gradual de temperatura (aclimatação) (BAUER et al., 1985), técnica que tem sido efetiva para conferir resistência em outras espécies.

Diversos esforços tem sido direcionados no sentido de identificar as bases fisiológicas e bioquímicas da injúria por

resfriamento, e a maioria dos estudos tem apontado as membranas celulares como o primeiro sítio das alterações induzidas por temperaturas baixas (LYONS, 1973, LYONS & BREIDENBACH, 1979).

Diversas pesquisas mostram claramente que os fosfolipídios de membranas sofrem uma transição de fase de um estado flexível líquido-cristal, para uma estrutura gel sólida, em torno de 10 a 12°C, que se correlaciona com a temperatura abaixo da qual ocorre injúria nas espécies sensíveis ao resfriamento. Esta alteração na fluidez dos lipídios em função da temperatura tem sido detectada por técnicas muito sensíveis, como espectroscopia EPR (ressonância eletrônica paramagnética), utilizando marcadores de spin (BRUCE & THAYER, 1983; WATANABE *et al.*, 1990) e calorimetria (RAISON & ORR, 1986).

Os eventos bioquímicos resultantes da diminuição da fluidez de membrana, incluem interferência nas funções das proteínas associadas às membranas, redução no suprimento de energia, perda de compartimentalização, liberação acentuada de íons, e outros eventos, que levam a desbalanços iônicos e perda de funções essenciais (LYONS, 1973; GRAHAN & PATTERSON, 1982).

Os efeitos do resfriamento nas membranas celulares tem sido abordados recentemente como um tipo de estresse oxidativo, resultante de efeitos deletérios de espécies de oxigênio reduzido, tais como superóxido ($O_2^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e oxigênio "singlet" (1O_2) (ELSTNER & OSWALD, 1994; LURIE *et al.*, 1994; PRASAD *et al.*, 1994 a,b). Estas espécies reativas de oxigênio são geradas em

células de plantas durante o funcionamento metabólico normal, especialmente nos cloroplastos e mitocôndrias.

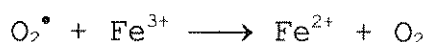
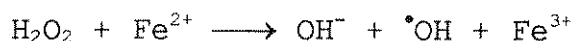
A maior parte da redução de oxigênio nos cloroplastos ocorre via ferredoxina reduzida (Fd_{red}), a qual reduz oxigênio molecular a radical superóxido, pela reação de Mehler (FOYER *et al.*, 1994):



Durante condições de fotoinibição, na qual a energia luminosa excede a capacidade dos fotossistemas, o excesso de energia pode ser direcionado para a formação de superóxido, particularmente quando uma situação de alta intensidade luminosa ocorre simultaneamente a um estresse por temperatura (BOWLER *et al.*, 1992).

Em mitocôndrias, paralelamente à redução tetravalente a H_2O , oxigênio molecular é também reduzido parcialmente a superóxido (PUNTARULO *et al.*, 1991). Sob condições de estresse, quando ocorre um desemparelhamento da atividade respiratória, esta produção pode aumentar. PRASAD *et al.* (1994b) demonstraram que sob condições de resfriamento, diminui consideravelmente a atividade da citocromo oxidase e a absorção de O_2 sensível a cianeto, liberando elétrons da cadeia transportadora para reduzir oxigênio molecular a radical superóxido. O complexo I de NADH-desidrogenase e ubiquinona-citocromo b foram propostos como os prováveis sítios de geração de superóxido na mitocôndria (NAKANO & ASADA, 1981; LEPRINCE *et al.*, 1994).

O radical superóxido sob ação da enzima superóxido dismutase (SOD), presente nas mitocôndrias e cloroplastos, gera H_2O_2 . O aumento da produção ou a acumulação de $\text{O}_2^\bullet$ e H_2O_2 em condições de estresse, pode levar à geração do potente radical $^\bullet\text{OH}$, pela reação de Haber-Weiss, catalizada por ferro (GUTTERIDGE & HALIWELL, 1990):



A toxicidade destas espécies de oxigênio é atribuída ao fato de que elas podem reagir com numerosos componentes celulares, causando desta forma uma cascata de reações oxidativas, que resultam em inativação de enzimas, peroxidação de lipídios de membranas, quebras da estrutura do DNA e degradação de proteínas e pigmentos (BOWLER *et al.*, 1992).

A peroxidação de lipídios de membrana por radicais de oxigênio é um dos eventos mais significativos no estresse oxidativo, pois dentre as suas consequências podem-se citar a diminuição da fluidez de membranas e modificações da permeabilidade iônica (BINDOLI, 1988).

Proteínas são também particularmente susceptíveis à ação de radicais livres intermediários no processo de peroxidação lipídica, tais como radicais alcóxil e peróxil. Quando o dano ocorre em proteínas de membrana, este pode afetar a homeostase iônica, levando ao acúmulo de cálcio. Consequentemente, o

potencial para ativação de fosfolipases, proteases mediadas pelo cálcio, ou a acumulação de cálcio na mitocôndria podem causar várias alterações em membranas, deterioração celular e intensificação da lesão inicial (RICE-EVANS & BURDON, 1993). Radicais de oxigênio, como superóxido e hidroxila, podem inclusive, inativar irreversivelmente algumas das enzimas responsáveis pelo processo de detoxificação de radicais livres, como SOD e catalase, tornando-as mais susceptíveis à atividade proteolítica (DAVIES, 1987).

A indução de sistemas produtores de radicais de oxigênio tem sido demonstrada em resposta a diversos tipos de estresse além de resfriamento, como por exemplo, seca (ZHANG & KIRKHAM, 1996), deficiência mineral (POLLE & RENNENBERG, 1993), exposição a poluentes ambientais (IRIGOYEN *et al.*, 1992) e a metais pesados (CAKMAK & HORST, 1991; SHAW, 1995). Estresse oxidativo ocorre também associado à senescência foliar (DHINDSA *et al.*, 1981) e tratamentos com herbicidas (SCHMIDT & KUNERT, 1986).

Uma diferença fundamental entre plantas sensíveis e resistentes ao estresse oxidativo pode residir na capacidade de plantas resistentes de amenizar os efeitos lesivos dos radicais livres pelo aumento da síntese de compostos antioxidantes, tais como, α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico e glutathione ou ainda pela capacidade de ativar enzimas de varredura de radicais livres: superóxido dismutase, catalase,

peroxidases e as enzimas do ciclo ascorbato/glutathione (PURVIS & SHEWFEELT, 1993).

α -Tocoferol (Vitamina E) é um capturador de oxigênio "singlet" e outros radicais em membranas, impedindo a propagação das reações em cadeia de lipoperoxidação (BUETTNER, 1993). Ácido ascórbico (Vitamina C) desempenha um papel-chave na detoxificação de oxigênio ativado, reagindo diretamente com superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, e alternativamente pode também reciclar α -tocoferol (BUETTNER, 1993). Glutathione pode reagir diretamente com radicais livres ou regenerar ascorbato (CAKMAK et al., 1993); glutathione oxidada é, por sua vez, reduzida por NADPH (FOYER & HALLIWELL, 1976).

Vários autores tem apresentado esquemas de vias de detoxificação de radicais livres, introduzindo modificações no modelo proposto inicialmente por FOYER & HALLIWELL (1976) e HOSSAIN et al. (1984), e conhecido como via Halliwell-Asada (Figura 1).

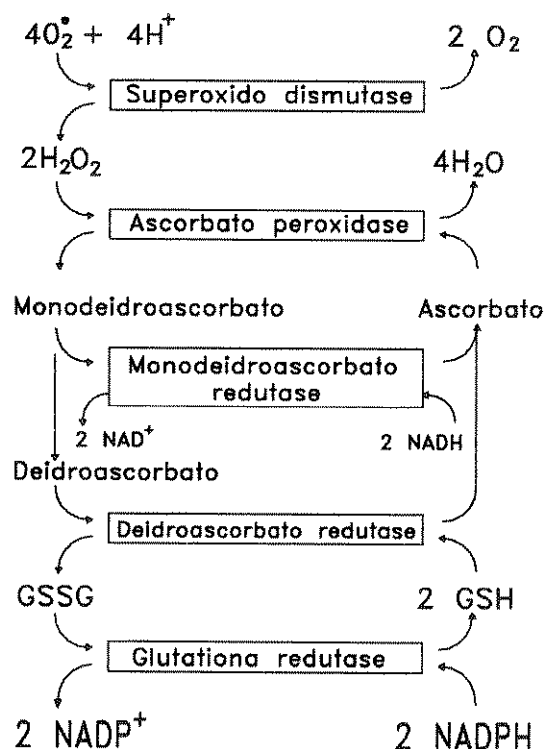


Figura 1. Vias de detoxificação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (POLLE & RENNENBERG, 1993).

A atividade coordenada destas defesas antioxidantes, dependente de poder redutor na forma de NAD(P)H, é essencial para proteger a célula dos efeitos lesivos de espécies de radicais de oxigênio, que são produzidas a elevadas taxas quando as plantas são expostas a condições de estresse.

Uma outra diferença entre plantas sensíveis e resistentes ao resfriamento consiste na capacidade de plantas resistentes de reduzir a produção de espécies ativas de oxigênio durante a exposição ao estresse, por um incremento na via alternativa de respiração mitocondrial, resistente ao cianeto. Um papel benéfico desta via em condições de estresse por resfriamento foi sugerido por vários pesquisadores (STEWART *et al.*, 1990;

PURVIS & SHEWFELT, 1993; FOYER et al., 1994; MOYNIHAN et al., 1995). Neste caso, a oxidação de ubiquinona pela oxidase alternativa poderia evitar a transferência de eletrons diretamente de ubiquinona para oxigênio molecular para gerar radical superóxido. É possível, portanto, que aumentos na atividade da via alternativa possam reduzir o dano oxidativo na mitocôndria. Como consequência, a peroxidação de lipídios de membranas e outros processos mediados por radicais livres, poderiam ser grandemente reduzidos (PURVIS & SHEWFELT, 1993). MOYNIHAN et al. (1995) sugerem que uma ativação desta via alternativa em condições de estresse por resfriamento, teria a vantagem de aumentar a produção de calor, a nível subcelular. Esta estratégia foi detectada por microcalorimetria em diversas espécies submetidas a condições de resfriamento, como pepino, batata, soja, ervilha e algodão (MOYNIHAN et al. 1995). Após 8 horas de exposição a 8°C, a produção de calor nestas espécies aumentou de 47 a 98%. No entanto, nenhum aumento na produção de calor foi observado em *Episcia cupreata*, uma espécie extremamente sensível ao resfriamento.

Conclui-se, portanto, que a resposta das plantas ao resfriamento é um processo bastante complexo, o qual se inicia com os eventos oxidativos que desestabilizam as membranas que, por sua vez, alteram diversas vias metabólicas, levando ao desenvolvimento dos sintomas de injúria. Torna-se então relevante investigar esta resposta, particularmente no café, uma espécie bastante sensível a baixas temperaturas e de grande

importância econômica, para a qual não há informações disponíveis sobre a ocorrência de processos oxidativos associados ao estresse. Uma compreensão melhor dos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse poderá oferecer subsídios posteriormente para a seleção de variedades de café tolerantes ao resfriamento.

2. OBJETIVOS

Este estudo foi conduzido visando esclarecer os eventuais mecanismos que determinam a susceptibilidade do cafeeiro a baixas temperaturas, particularmente os eventos associados às alterações na integridade das membranas celulares.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Cultivo das plantas

Sementes de café (*Coffea arabica* L.) cultivar Catuaí Vermelho foram fornecidas pela Seção de Genética, Instituto Agronômico, Campinas, SP.

Após remoção do endocarpo do fruto (pergaminho), as sementes foram colocadas para embeber em água destilada por 48 horas, a 25°C, e semeadas em potes de plástico de 1L preenchidos com vermiculita. As plantas permaneceram em câmaras de crescimento, no escuro, a 25°C. Água foi suprida por irrigações três vezes por semana. Os tratamentos a baixas temperaturas e as avaliações dos diversos parâmetros se iniciaram quando as plantas tinham 35 dias de idade (estádio de "palito-de-fósforo").

Como modelo para os estudos utilizaram-se principalmente segmentos de raízes. Este sistema oferece algumas vantagens sobre as técnicas convencionais de separação de organelas e de cultura de tecidos ou células, pois ele mantém a complexidade morfo-fisiológica do órgão como um todo, além de ser fácil de ser obtido e manipulado. Portanto, para avaliação da maioria dos parâmetros optou-se pelo sistema "in vivo", à exceção das medidas de lipoperoxidação e atividade enzimática.

3.2. Medidas de crescimento

Para identificar a região de máximo alongamento, as raízes primárias de plântulas de 30 dias de idade foram marcadas com tinta a óleo, a intervalos de 1mm, a partir do ápice da raiz. As medidas das distâncias entre as marcas permitiram a determinação da região de alongamento e o cálculo da taxa de crescimento da raiz, ao final de 6 dias.

Experimentos preliminares mostraram que os efeitos dos tratamentos se expressam ao final do período de 6 dias, por esta razão este tempo de tratamento foi definido para os experimentos posteriores.

Para avaliar o efeito da temperatura no crescimento da raiz, foram feitas medidas do comprimento da raiz principal das plântulas, antes e após exposição a temperaturas contínuas de 5, 10, 15, 20 e 25°C, por 6 dias, no escuro, em câmaras de crescimento. Após este período, as plântulas foram transferidas novamente para a temperatura de 25°C (controle), por mais 6 dias, e a capacidade de recuperar o crescimento foi avaliada em cada temperatura.

3.3. Calorimetria

Para avaliar o efeito de baixas temperaturas sobre a atividade metabólica em geral, foram feitas determinações da taxa de calor metabólico, utilizando calorimetria. Os mesmos

tratamentos térmicos descritos para medidas de crescimento foram aplicados para calorimetria.

3.3.1. Descrição e princípio operacional do calorímetro de condução

As análises calorimétricas foram realizadas num calorímetro de condução, construído no Brasil e nos EUA (LOVRIEN, 1989), similar ao instrumento descrito por WADSÖ (1970). O calorímetro de condução, descrito detalhadamente por MARES-GUIA et al., (1990) e NASCIMENTO (1992), e esquematizado na Figura 2, possui duas câmaras calorimétricas (amostra e referência), construídas em ouro, com tampas rosqueáveis para vedação completa. Cada câmara tem dois compartimentos conectáveis, com capacidade de cerca de 0,5 a 1,0 mL para o menor e 2,5 a 3,0 mL para o maior, permitindo a aplicação em separado, dos reagentes em estudo (Figura 2-A). A injeção de soluções nas câmaras calorimétricas é feita com o auxílio de seringas conectadas a tubos de silicone de pequeno calibre, permitindo a introdução de volume conhecido das soluções, separadamente, nos dois compartimentos de cada câmara. Os conteúdos dos compartimentos podem ser misturados, após o fechamento das câmaras, através de um acionador externo ao equipamento, e ligado à parte interna do calorímetro. É necessário geralmente um tempo de 15 a 20 minutos, após a aplicação das amostras, para que se obtenha o equilíbrio térmico do sistema.

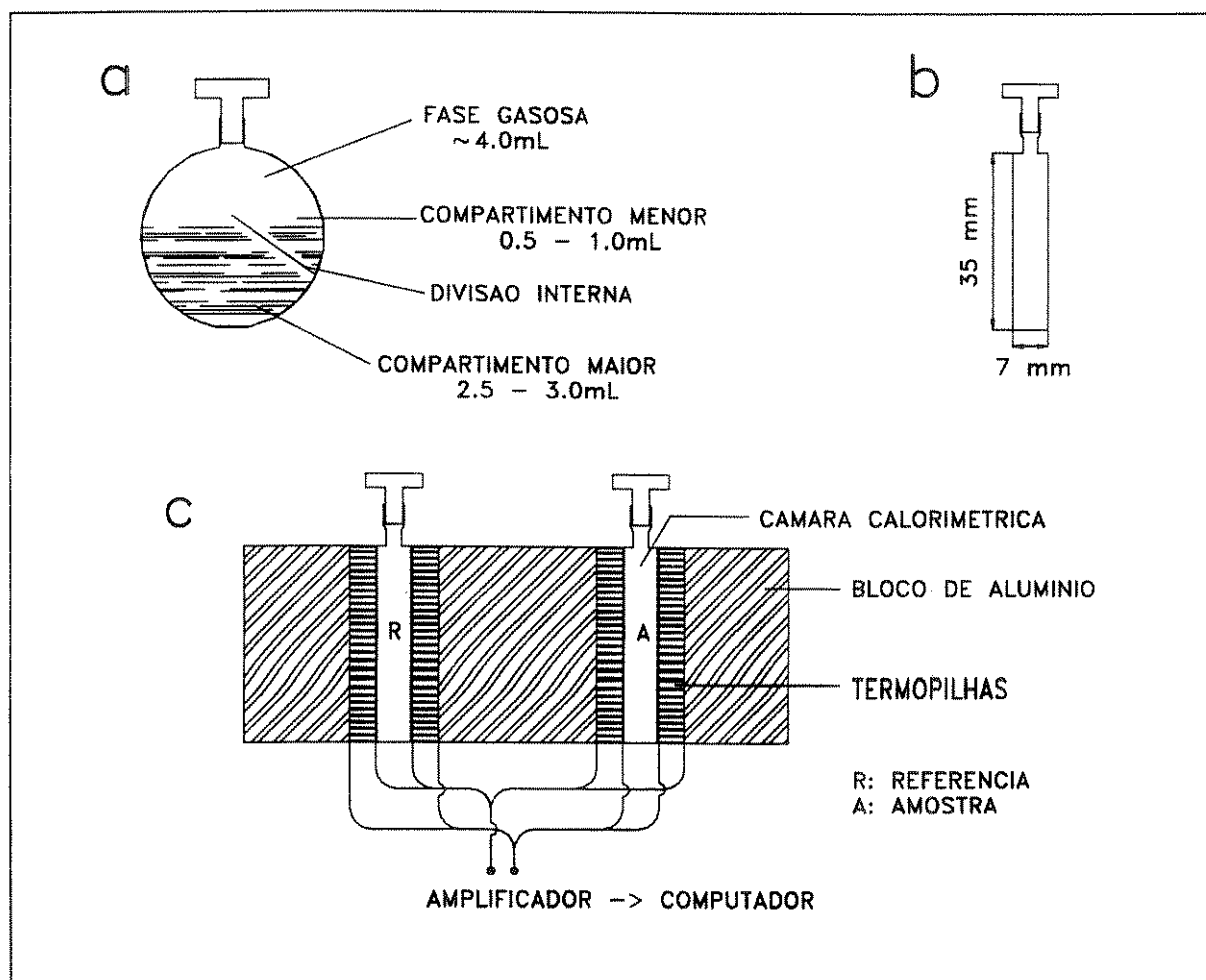


Figura 2. Diagrama do microcalorímetro. a) câmara calorimétrica: vista frontal; b) vista lateral; c) disposição das câmaras e termopilhas no microcalorímetro.

Nos estudos realizados neste trabalho, utilizaram-se volumes de $0,1\text{ mL}$ no compartimento menor e $1,0\text{ mL}$ no compartimento maior da câmara calorimétrica, os quais permitem deixar um volume de ar de cerca de 4 mL acima da fase líquida, garantindo suficiente concentração de oxigênio para a respiração dos tecidos colocados dentro das câmaras.

Cada câmara é envolvida por uma bateria de termopares (termopilha) cujo fator de conversão (figura de mérito) é de $7 \mu\text{W} \cdot \mu\text{V}^{-1}$, o que significa que um sinal de $1 \mu\text{V}$ gerado nas termopilhas corresponde a uma energia de $7 \mu\text{Watt}$. Este valor de figura de mérito é similar ao do calorímetro de fluxo, descrito por ANDERSON & LOVRIEN (1979). Cada conjunto formado por termopilha/câmara/termopilha (T/C/T) (Figura 2-B) está inserido num bloco de alumínio, que atua como um suporte rígido e como dreno de calor.

O calor gerado dentro das câmaras, decorrentes de um processo químico ou biológico, é difundido através da câmara, atravessa suas delgadas paredes condutoras e atinge as placas de termopilhas dispostas de cada lado das paredes das câmaras. Ao passar pelas termopilhas, o calor provoca uma diferença de potencial, que é amplificada de 100 a 5.000 vezes e registrada em um sistema eletrônico acoplado ao microcalorímetro. Este sistema consiste de um registrador eletrônico com base em um computador dotado de uma placa especial de alta resolução que permite a leitura de voltagens nas diversas faixas, cobrindo intervalos de tempo que podem ser estabelecidos de milisegundos a horas. Dessa forma, um processo qualquer que ocorra na câmara de observação, desencadeia uma resposta que é registrada como potência elétrica em função do tempo, produzindo uma curva designada termograma (Figura 3). Ao final do experimento, a integração da área registrada fornece o valor da energia total

envolvida no processo ($Q = \text{Potência} \times \text{Tempo}$), que é expresso em Joule (J).

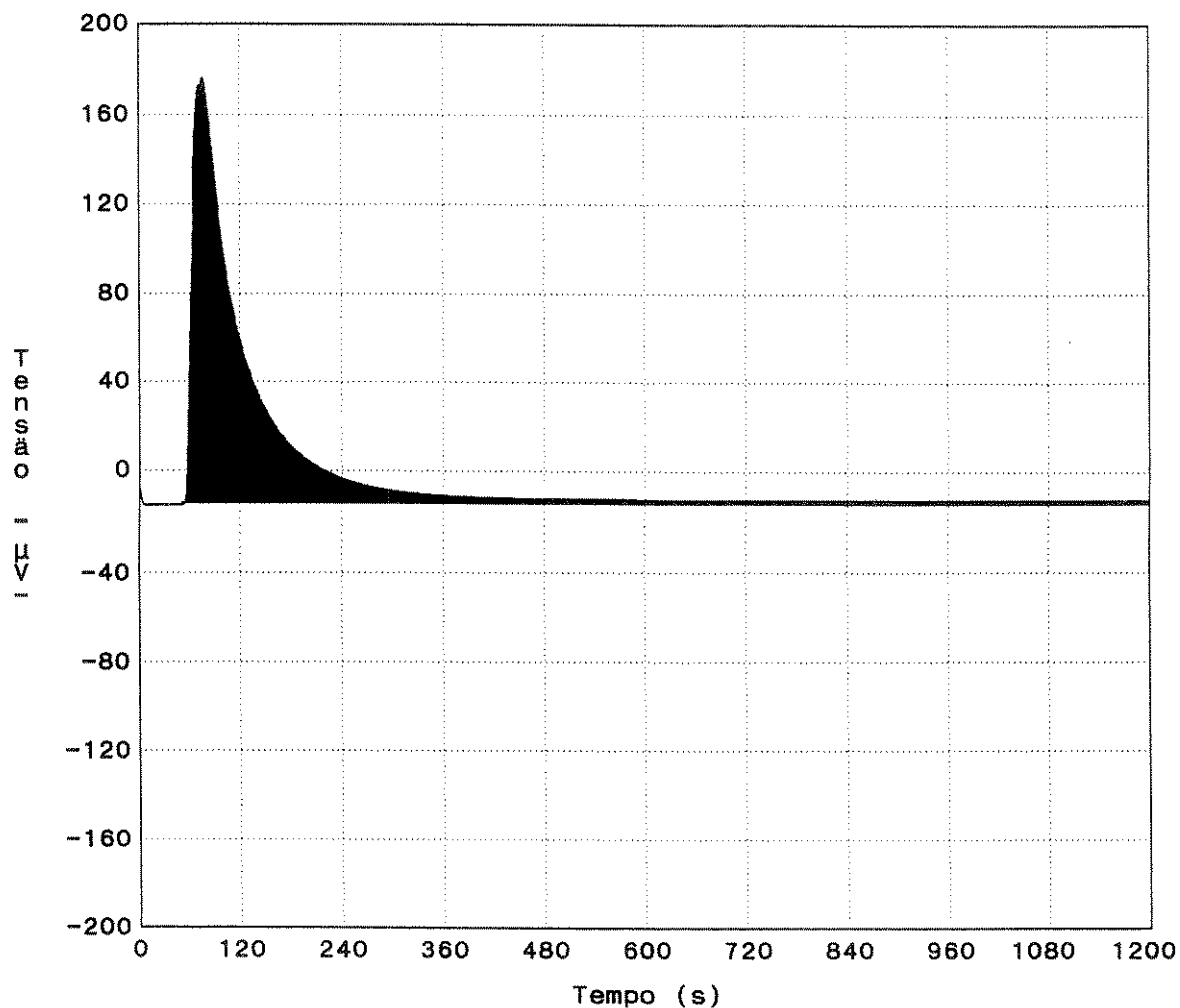


Figura 3. Termograma obtido pela reação de neutralização de TRIS com HCl 4,1mM. Valor da integral da área sob a curva: 96,27 mJ. Valor estimado: 96,87 mJ.

Todas as análises calorimétricas ocorreram a 25°C, em ambiente de temperatura controlada.

3.3.2. Calibração do calorímetro

Optou-se neste trabalho pela calibração química, utilizando-se a reação de neutralização de TRIS com HCl, baseado no calor de neutralização igual a -11.300 calorias/mol de H^+ (GRENTHE *et al.*, 1970).

Considerando-se que o microcalorímetro mede o calor liberado nas câmaras na faixa de 2 a 25mcal (dados técnicos), o qual corresponde à neutralização de 0,2 a 2,5 μ mol de H^+ , decidiu-se utilizar concentrações de HCl nesta faixa, obtendo-se termogramas como o da Figura 3, cujas integrais significam energia ($W.s=J$), e são proporcionais ao calor de reação gerado na célula microcalorimétrica.

Para obtenção dos termogramas que serviram de base para a curva de calibração, 0,8 mL de TRIS-HCl 0,2M, pH 8,0 foram lentamente injetados nos compartimentos maiores das duas câmaras do microcalorímetro (referência e amostra). Um volume de 0,5mL de TRIS-HCl foi injetado no compartimento menor da câmara de referência e, na câmara de amostra adicionou-se 0,5mL de solução de HCl (0,5 a 5,0 mM) ao compartimento menor.

Após o sistema alcançar o equilíbrio, a linha de base foi ajustada no ponto 0,0 e então iniciou-se a aquisição de dados. Decorridos 50 segundos foi feita a agitação das câmaras para efetuar a mistura dos reagentes contidos nos dois compartimentos de ambas as câmaras.

Terminado o tempo pré-estabelecido de aquisição de dados, obteve-se o valor da integral da área sob o termograma, comparando-o com o valor estimado preliminarmente. Foram obtidos os termogramas referentes às soluções de HCl contendo de $2,5 \times 10^{-7}$ a $2,5 \times 10^{-6}$ moles de H^+ . Com os resultados das integrais dos termogramas (média de duas repetições) e os respectivos valores teóricos calculados, obteve-se a curva de calibração mostrada na Figura 4.

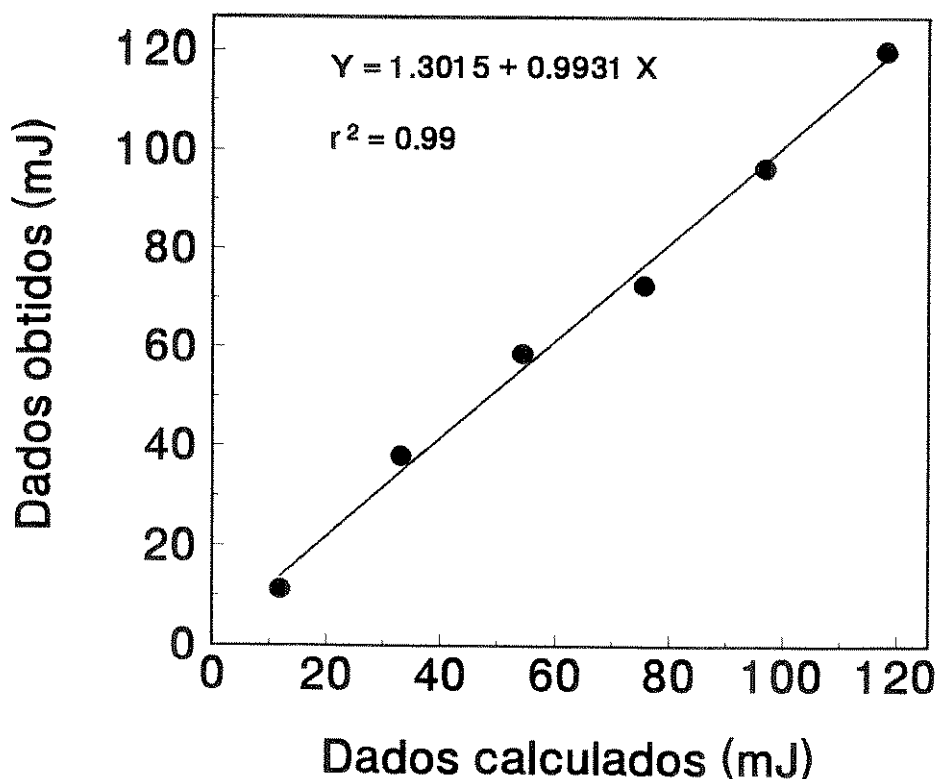


Figura 4. Curva de calibração do microcalorímetro realizada por reações de neutralização de TRIS com HCl.

3.3.3. Protocolo dos experimentos de calorimetria

Para as análises calorimétricas de segmentos de raiz, foram estabelecidos inicialmente os procedimentos operacionais para uso do microcalorímetro. Uma vez definidos estes procedimentos, iniciaram-se as análises calorimétricas com os segmentos de raízes, após exposição das plantas às temperaturas estabelecidas nos tratamentos.

Injetou-se inicialmente, 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,4 no compartimento maior de cada uma das câmaras do microcalorímetro. Após o fechamento das câmaras, aguardou-se até o sistema alcançar o equilíbrio térmico, obtendo-se uma linha de base estável. A seguir, segmentos de 1mm, retirados de extremidades de raízes, foram pesados (30mg massa fresca), introduzidos em um cateter com pequeno volume de tampão e injetados na câmara de amostra. Imediatamente a câmara foi fechada, adicionando-se o mesmo volume de tampão à câmara de referência. Um período de cerca de 15 minutos foi necessário para se atingir um novo equilíbrio de temperatura, caracterizado por um estado-estacionário na produção de calor dentro da câmara de amostra.

Para manter as concentrações de oxigênio dissolvido na câmara em níveis constantes, foi feita agitação do bloco de alumínio contendo as câmaras, a intervalos de 3 minutos. A Figura 5 mostra um termograma típico obtido com segmentos de raízes de plântulas cultivadas a 25°C (controle).

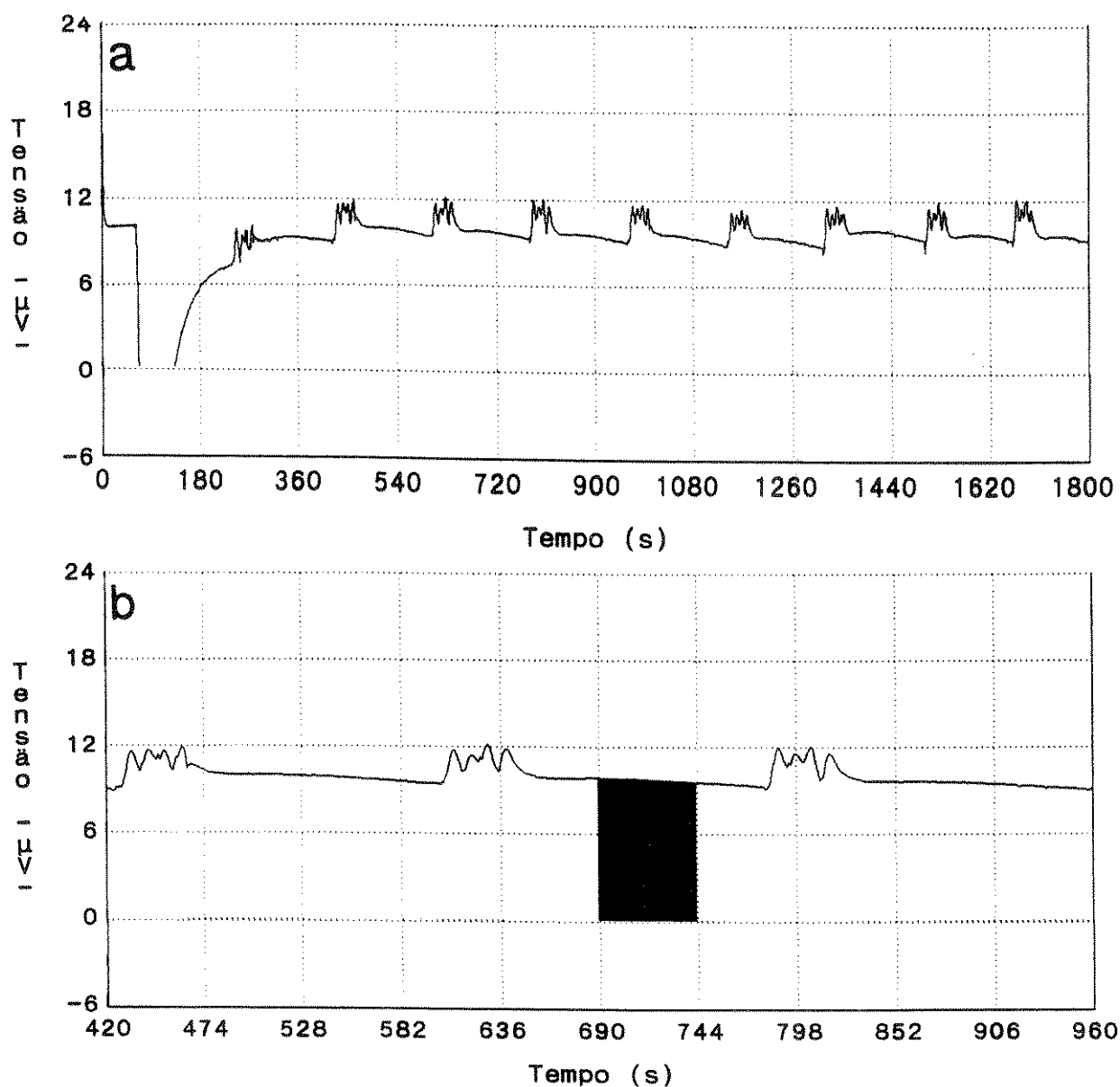


Figura 5. Produção de calor por segmentos apicais de raízes de plântulas de café mantidas a 25°C. a) Termograma mostrando agitações a intervalos de 3 minutos; b) Expansão do termograma entre 420 e 960 segundos contendo regiões de estado-estacionário. O valor da integral da área sob a curva, num intervalo de 60 segundos, corresponde a 3,66 mJ.

A curva em nível zero representa a linha de base produzida antes da introdução da amostra. Observa-se após cada agitação da amostra um fluxo constante de calor, estado-estacionário. A estimativa da taxa média de calor metabólico foi feita utilizando-se os valores obtidos nas diversas regiões do termograma, em estado estacionário, após cada agitação. Os valores da taxa de calor metabólico observados em segmentos de pontas de raiz mantiveram-se estáveis por mais de 60 minutos, padronizando-se o tempo de 30 minutos para todas as determinações calorimétricas posteriores. As taxas de calor metabólico foram expressas em $\mu\text{Watt}.\text{mg}^{-1}(\text{Massa Fresca})$.

3.4. Determinação do consumo de oxigênio

Para efeito de comparação dos valores da taxa de calor metabólico com o metabolismo aeróbico da raiz, foram realizadas medidas da taxa de respiração nos fragmentos apicais de raiz.

O consumo de oxigênio por segmentos de raiz foi determinado polarograficamente, através de um eletrodo tipo Clark, acoplado a um registrador gráfico. A incubação se processou em uma câmara de vidro vedada e estabilizada a 25°C, com agitação magnética. A cada leitura e antes da colocação da amostra, o meio de incubação foi mantido em equilíbrio em 100% O₂, para obtenção de uma linha de base estável.

Os fragmentos apicais de 1mm de raiz foram pesados (20mg de massa fresca) e transferidos para o meio de incubação,

composto de tampão fosfato 0,2M, pH 7,4. O consumo de oxigênio pela raiz foi avaliado durante 10 minutos e expresso como $\text{nmolO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Massa Fresca).

Amostras de segmentos de raiz semelhantes às utilizadas para medidas da taxa de calor e de respiração foram coletadas para determinação do fator de conversão massa fresca/massa seca.

3.5. Medidas de liberação de eletrólitos

Para avaliar o efeito de tratamentos por baixas temperaturas sobre a integridade das membranas celulares foram feitas medidas do grau de permeabilidade de membranas, do grau de peroxidação de lipídios de membrana e de fluidez de membranas.

As avaliações do grau de permeabilidade de membranas foram feitas utilizando-se medidas de liberação de eletrólitos pela raiz. Segmentos apicais de 1mm de raiz foram lavados com água deionizada, pesados (100mg de massa fresca) e transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 15mL manitol 0,2M (SALTVEIT, JR. 1991). Os fragmentos foram incubados a 25°C, por 50 minutos, com agitação. A liberação de eletrólitos foi medida como incremento na condutividade elétrica da solução, utilizando-se um condutivímetro previamente calibrado com soluções de KCl. A liberação de eletrólitos pelos segmentos de raiz foi expressa como $\mu\text{mho} \cdot \text{g}^{-1}$ (Massa Fresca).

3.6. Medidas de peroxidação de lipídios

Os níveis de peroxidação lipídica em segmentos de pontas de raízes foram expressos como teor de MDA (malondialdeído), determinado pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (BUEGE & AUST, 1978). O ácido tiobarbitúrico forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, que são produtos finais da cadeia de lipoperoxidação, entre os quais o MDA. Estes complexos podem ser detectados por espectrofotometria, a 535nm (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1990).

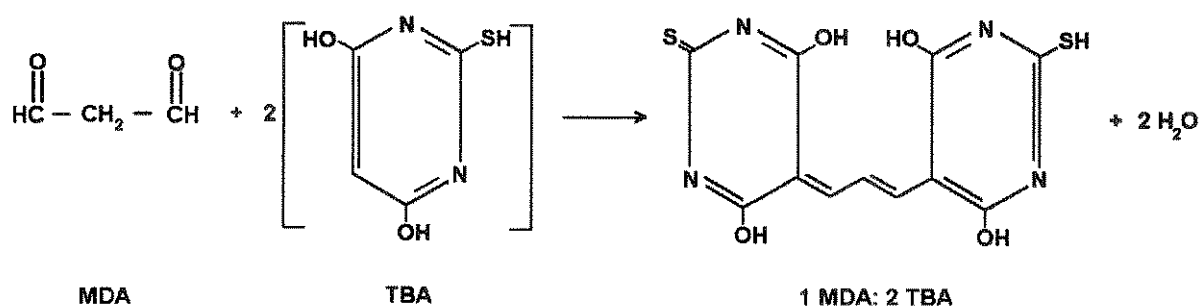


Figura 6. Formação do complexo MDA:TBA

Os segmentos de raiz foram pesados (50mg de massa fresca) e homogeneizados em HEPES 10mM, pH 7,0, a 4°C. O homogeneizado foi transferido para um meio contendo TCA-TBA-HCl (15% p/v-0,37% p/v-0,25N) e BHT (butilhidroxitolueno) 0,01%. A adição de BHT ao reagente TCA-TBA-HCl no momento de sua utilização, evita a auto-oxidação de lipídios catalizada por metais, durante o aquecimento com o reagente tiobarbitúrico (BUEGE & AUST, 1978).

A mistura foi a seguir aquecida a 80°C por 15 minutos e rapidamente resfriada em banho de gelo. Após centrifugação a 1.000g por 10 minutos, a absorbância do sobrenadante foi lida a 535nm e os valores foram convertidos em equivalentes de MDA, utilizando-se o coeficiente de absorção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE & AUST, 1978).

O processo de peroxidação lipídica, descrito por BUEGE & AUST (1978) e GUTTERIDGE & HALLIWELL (1990), apresenta as seguintes etapas:

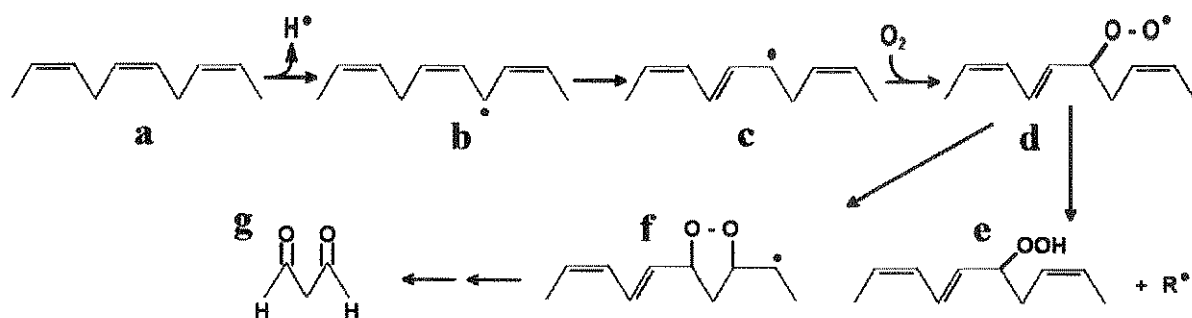


Figura 7. Processo de peroxidação lipídica

Ácidos graxos poli-insaturados (a) são particularmente susceptíveis à peroxidação, que inicia com o ataque de algumas espécies químicas que sejam suficientemente reativas para retirar um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia de um ácido graxo. Uma vez que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, sua remoção deixa um elétron desemparelhado no átomo de carbono ao qual estava ligado, formando um radical lipídico (b). O rearranjo de ligações duplas resulta na formação de dienos conjugados (c). Em células aeróbicas, o

radical de carbono pode sofrer um rearranjo molecular, seguido por reação com O_2 para formar um radical peroxil (d). Este pode atacar proteínas de membrana, retirar um hidrogênio de um ácido graxo adjacente para formar um hidroperóxido (e), ou formar um endoperóxido lipídico (f). A formação de endoperóxidos em ácidos graxos insaturados contendo ligações duplas interrompidas por, pelo menos 3 metilenos, pode levar à formação de MDA (g) e outros aldeídos como produto de hidrólise. Uma vez iniciado, o processo de peroxidação prossegue como uma reação em cadeia de radical livre.

3.7. Determinação da fluidez de membranas pela técnica de EPR espectroscopia com marcadores de spin.

A organização dos lipídios de membrana e sua mobilidade podem ser avaliadas por espectroscopia EPR (ressonância paramagnética do elétron), utilizando-se marcadores de spin (ALONSO *et al.*, 1995). Um dos tipos mais comuns desta técnica consiste na incorporação de marcadores de spin de ácidos graxos em membranas celulares. Marcadores de spin análogos aos componentes naturais de membranas, tais como ácidos graxos, são sintetizados com um grupo nitróxido ligado à molécula. Este grupo tem um sinal de ressonância paramagnética eletrônica muito conhecido e é capaz de fornecer informações sobre a dinâmica do meio biológico em que se encontra, particularmente sobre a flexibilidade das cadeias graxas da membrana. Os ácidos

graxos marcadores de spin 5-, 12- e 16-DSA (ácido doxil esteárico) são análogos ao ácido esteárico, tendo um radical nitróxido ligado em diferentes posições da cadeia: C-5, C-12 e C-16, respectivamente (Figura 8).

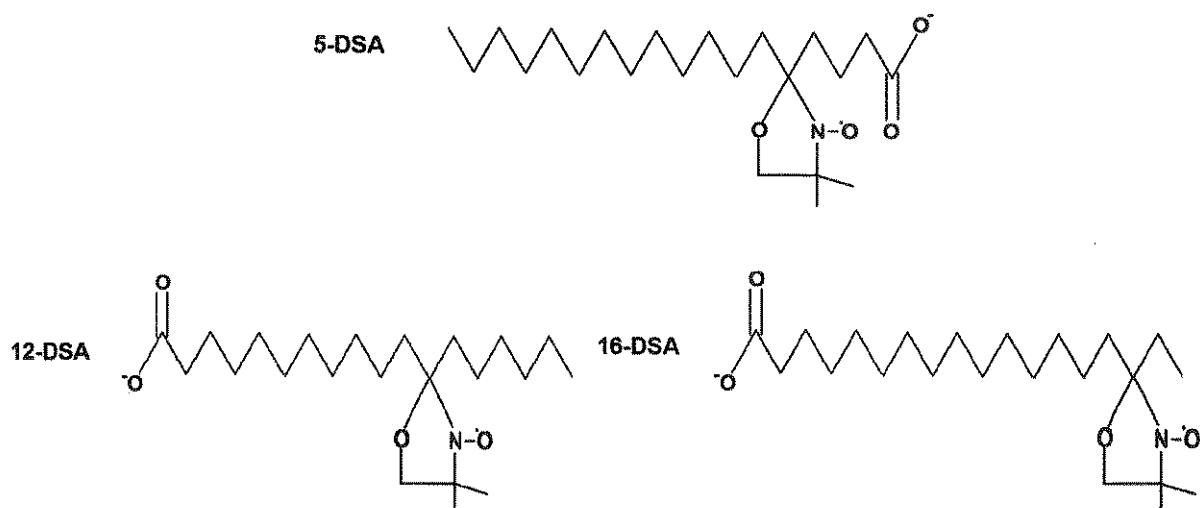


Figura 8. Marcadores de spin: 5, 12 e 16-DSA (SUBCZYNSKI et al., 1992).

Estes marcadores tornam-se orientados na membrana de tal forma que o eixo longo da molécula fica paralelo aos ácidos graxos de fosfolipídios (WATANABE et al., 1990) e permitem a avaliação do gradiente de fluidez da membrana.

Numa primeira etapa do trabalho, foi realizada a marcação de membranas com tecidos intactos de pontas de raiz (*in vivo*). Numa segunda etapa, utilizaram-se os marcadores sobre preparações microssomais de segmentos de raiz.

Para as determinações *in vivo*, uma alíquota da solução estoque do marcador (1 a 3 μL) dissolvido em etanol (5mg mL^{-1}), foi colocada sobre um vidro de relógio, adicionando-se a seguir

os segmentos apicais (1mm) de raiz (20mg de massa fresca), suspensos em 300 μ L de tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,4, com 1mM EDTA. Esta mistura foi incubada durante 5 minutos, com leve agitação, utilizando-se um pequeno pincel. Após a marcação, os fragmentos de raízes foram introduzidos em um tubo capilar (25 μ L) e transferidos para o equipamento de EPR.

A medida do grau de fluidez da membrana é estimada a partir do parâmetro de ordem S, como descrito por GAFFNEY (1976). Este parâmetro empírico pode variar de 0 a 1, sendo que baixos valores de S correspondem a uma membrana mais fluida (movimento livre), enquanto altos valores refletem uma membrana mais ordenada (estado mais rígido). O valor de S é calculado pela fórmula de GAFFNEY (1976), a partir dos parâmetros $2T'_{//}$ ($2T'$ paralelo) e $2T'_{\perp}$ ($2T'$ perpendicular), obtidos graficamente, conforme mostrado na Figura 14, do item Resultados.

No caso do movimento rápido, avaliado pelo marcador 16-DSA, o cálculo de S não é possível, uma vez que o parâmetro $2T'_{//}$ não é bem resolvido. Neste caso, a análise do espectro permite o cálculo do tempo de correlação rotacional, ou τ_c . Este parâmetro corresponde à taxa de movimento do marcador à medida que ele gira ao redor de seu eixo. Um aumento na fluidez da membrana é identificado por um menor valor de τ_c , que pode ser calculado pela fórmula de SIMON (1979), utilizando-se os parâmetros mostrados na Figura 14.

Neste trabalho foram determinados os espectros de EPR com os três marcadores: 5-, 12- e 16-DSA, em amostras de segmentos de raízes de plântulas submetidas a várias temperaturas.

Com a finalidade de comparar os espectros obtidos com o uso dos marcadores em tecidos intactos de raiz (*in vivo*), com a técnica de utilização dos marcadores em membranas isoladas (*in vitro*), efetuaram-se extrações de membranas microssomais de segmentos de raiz, às quais foram aplicados os marcadores.

3.7.1. Isolamento de microssomas

Para isolamento de microssomas de raiz seguiu-se a metodologia de BASU et al. (1994), com algumas modificações. Segmentos apicais de raiz (1,5g de massa fresca) foram macerados em meio de homogeneização, a 4°C, consistindo de: 50mM HEPES, 2µM PMSF (fluoreto de fenilmetil sulfonil), 1mM DTT (ditiotreitól) e 1mM EDTA (pH 6,5). O homogenado foi centrifugado a 20.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 105.000g por 60 minutos. A fração microssomal ("pellet") foi a seguir ressuspendida em 50µL de tampão fosfato 0,05M, pH 7,4. Aliquotas desta fração foram utilizadas para análises de EPR, conforme descrito anteriormente para as preparações de segmentos intactos de raiz.

3.8. Medidas da atividade enzimática

Para verificar o efeito de temperaturas baixas sobre a capacidade antioxidante da raiz de café, foram avaliadas as atividades de algumas enzimas de varredura de radicais livres, a saber: ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase e glutathione redutase.

3.8.1. Extração das enzimas

O extrato para ensaio de atividade enzimática foi obtido conforme descrito por BURDON et al. (1994), com algumas modificações. Aproximadamente 200 mg de massa fresca de segmentos apicais de raiz foram rapidamente homogeneizados a 4°C, em 5 mL do meio de extração, contendo: 50mM tampão fosfato, pH 7,8, 0,2mM EDTA, 0,1% (p/v) BSA, 0,1% (p/v) ascorbato, 0,05% (p/v) β -mercaptoetanol, 0,2% (v/v) triton X-100, 0,5% (p/p) PVP. Seguiu-se centrifugação a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi imediatamente desalinizado em coluna Sephadex G-50, pré-equilibrada com 100mM tampão fosfato (pH 7,0), contendo 0,2mM EDTA, e foi utilizado para ensaio das enzimas antioxidantes. A dosagem de proteínas do extrato foi feita pelo método de BRADFORD (1976), usando BSA como padrão.

3.8.2. Avaliação da atividade enzimática

A atividade de ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com NAKANO & ASADA (1981), monitorando-se a taxa de oxidação de ascorbato a 290nm, a 25°C ($E=2,8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O meio de reação, com volume final de 3,0mL, foi composto de 50mM tampão fosfato, pH 7,0, 0,5mM ascorbato, 0,1mM EDTA, 0,1mM peróxido de hidrogênio e 0,2mL de extrato da enzima. A reação foi iniciada com a adição de ascorbato, e o decréscimo na absorbância foi acompanhado de 10 a 180 segundos após esta adição.

Guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7) foi ensaiada conforme NAKANO & ASADA (1981), em meio similar ao descrito para ascorbato peroxidase, porém adicionou-se 18mM pirogallol ao invés de 0,5mM ascorbato. A oxidação de pirogallol dependente de peróxido de hidrogênio foi acompanhada a 25°C, no escuro durante 180 segundos a 430nm, devido à formação de purpurogalina, tendo coeficiente de absorbância de $2,47\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A atividade de catalase (EC 1.11.1.6) foi avaliada segundo metodologia de CAKMAK et. al. (1993). O meio de reação de 3mL, continha 25mM tampão fosfato, pH 7,0, 10 mM H_2O_2 e 0,1mL de extrato da enzima. A decomposição de peróxido de hidrogênio foi medida acompanhando-se o decréscimo na absorbância a 240nm ($E=39,4\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a 25°C, durante 180 segundos.

A avaliação da atividade de glutathione redutase (EC 1.6.4.2.) baseou-se no método descrito por CAKMAK et al., (1993), seguindo-se o decréscimo na absorbância a 340nm, devido

à oxidação de NADPH ($E=6,2\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a 25°C, durante 30 minutos. A mistura de reação consistiu de 25mM tampão fosfato pH 7,8, 0,5mM glutathiona oxidada (GSSG), 0,12 mM NADPH e 0,1mL extrato.

3.9. Redução de TTC (Cloreto de Trifeniltetrazólio)

Em adição às medidas de taxa de calor metabólico, por calorimetria, a atividade de desidrogenases nas células de raiz de plântulas de café foi avaliada através da capacidade de redução de TTC, após exposição à temperatura de resfriamento.

A capacidade de redução de TTC por segmentos de extremidades de raiz foi determinada conforme BURDON *et. al.* (1994), com algumas modificações. Segmentos de raiz (aproximadamente 30mg de massa fresca) foram coletados, pesados, e transferidos para 2mL de tampão fosfato 50mM, pH 7,0, contendo 1% de TTC. As amostras foram incubadas por 90 minutos, no escuro, a 25°C. A seguir, o TTC foi removido e os segmentos de raiz foram macerados em 3mL etanol 95% (v/v), para extração de formazan, resultante da redução de TTC. A amostra foi centrifugada a 500g por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 485nm. A capacidade de redução de TTC foi calculada em função do peso fresco das amostras e expressa como $\text{Abs.mg}^{-1}(\text{Massa Fresca})$. Testes preliminares com fragmentos de raiz fervidos não mostraram redução de TTC.

4. RESULTADOS

4.1. Medidas de crescimento

A análise do crescimento de radículas de plântulas de café mostrou que a região de alongamento da raiz primária limitou-se ao primeiro milímetro apical, o qual apresentou uma taxa de expansão de $2,45 \pm 0,26 \text{mm.dia}^{-1}$, em plântulas com 30 dias de idade, mantidas a 25°C.

Os tratamentos de resfriamento das plântulas a 5 e 10°C, durante 6 dias consecutivos, inibiram completamente o crescimento da raiz, mas afetaram apenas parcialmente a expansão radicular a 15 e 20°C, em comparação ao controle, mantido a 25°C (Figura 9). A capacidade de retornar à taxa de crescimento normal após os tratamentos de resfriamento é mostrada também na Figura 9. Observou-se que quando as plântulas retornaram à temperatura de 25°C, e o crescimento foi avaliado após 6 dias, as plântulas anteriormente submetidas a tratamentos de 15 e 20°C foram capazes de retomar o crescimento, o que não ocorreu nas plântulas tratadas a 5 e 10°C.

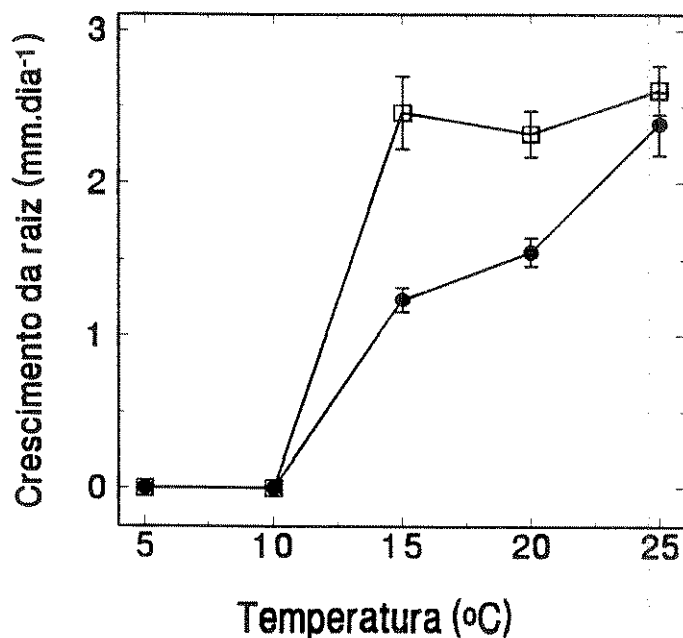


Figura 9. Crescimento de raízes de plântulas de café expostas a tratamentos de resfriamento por 6 dias (círculos fechados) e após transferência para 25°C por mais 6 dias (quadrados abertos). Valores são médias de 10 repetições $\pm$ desvio padrão.

4.2. Calorimetria e crescimento

As taxas de calor metabólico dos segmentos apicais de raiz mostraram-se sensivelmente mais baixas nas raízes das plântulas expostas às temperaturas inferiores a 15°C, indicando uma transição dependente da temperatura ao redor de 15°C (Figura 10). Os dados desta curva foram utilizados para cálculo da energia de ativação E_a , usando a equação de Arrhenius:

$$\log \text{ taxa de calor} = E_a / 2,3 RT$$

onde R é a constante dos gases e T temperatura absoluta.

Na prática, o valor de E_a foi determinado a partir da inclinação da reta log taxa de calor versus $1/T$ (Figura 10). O valor de E_a para temperaturas entre 10 e 15°C ($E_a=29,0\text{kcal/mol}$) foi cerca de 4 vezes maior do que na faixa de temperatura de 15 a 25°C ($E_a=7,0\text{kcal/mol}$).

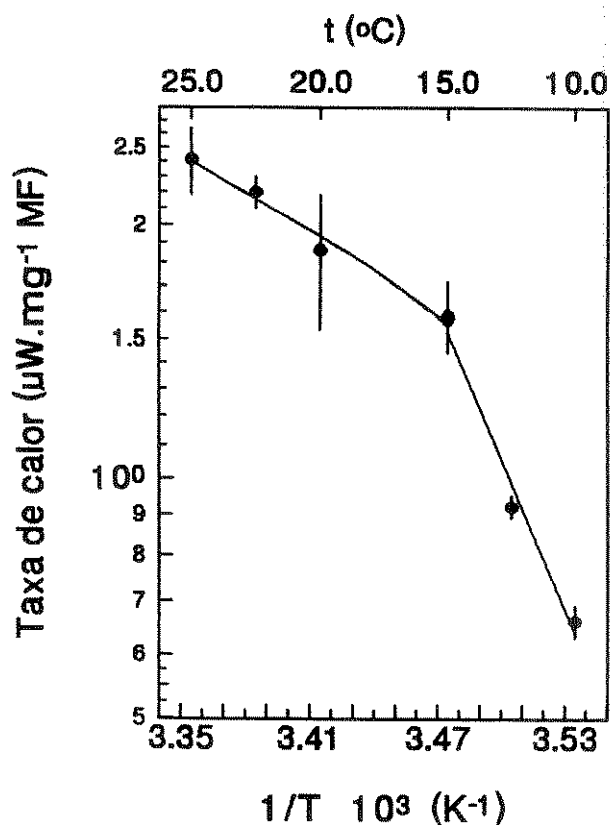


Figura 10. Gráfico de Arrhenius de taxas de calor metabólico de segmentos apicais de raízes de plântulas de café expostas a temperaturas de resfriamento por 6 dias. Valores são médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão.

Observou-se também uma estreita correlação entre taxas de crescimento e taxas de calor metabólico (Figura 11). Nota-se que, nas plântulas submetidas a 10°C o crescimento da raiz foi totalmente inibido, enquanto a taxa de calor metabólico foi de 0,66 $\mu\text{Watt}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$, que corresponde a 27% do controle, a 25°C.

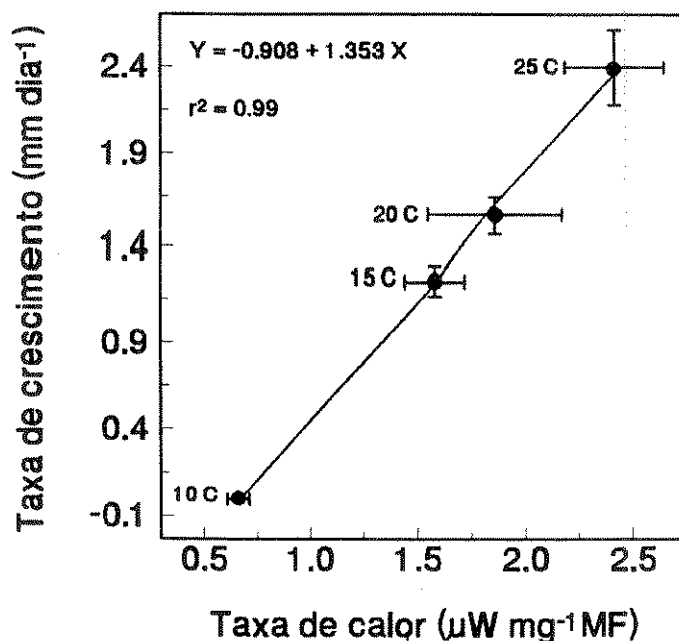


Figura 11. Correlação entre taxas de calor e de crescimento em segmentos apicais de plântulas de café expostas a temperaturas de resfriamento. As barras verticais e horizontais indicam desvio padrão.

Os resultados mostram que ocorreu uma queda contínua, tanto na taxa de crescimento da raiz quanto na produção de calor metabólico, à medida que a temperatura diminuiu de 25 para 10°C, sendo esta queda bem mais acentuada no intervalo entre 15 e 10°C.

4.3. Respiração e calorimetria

O consumo de oxigênio nos segmentos apicais de raízes de plântulas de café crescidas à temperatura de 25°C foi de $0,54 \pm 0,06 \text{ nmolO}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$ e a taxa de calor metabólico correspondeu a $2,41 \pm 0,23 \text{ } \mu\text{W}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$. Para efeito de comparação com os valores de taxa de calor metabólico, os dados obtidos com as duas técnicas foram expressos na mesma unidade, optando-se por transformar os valores da taxa de calor em consumo de oxigênio, conforme os cálculos apresentados a seguir.

A taxa de calor metabólico de $2,41 \text{ } \mu\text{W}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$ corresponde a $2,41 \text{ } \mu\text{J}.\text{s}^{-1}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$, pois $W=j.\text{s}^{-1}$. Convertendo-se joule em caloria, a taxa de calor se torna igual a $0,58 \text{ } \mu\text{cal}.\text{s}^{-1}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$. Considerando-se o intervalo de tempo de um minuto, tem-se $34,59 \text{ } \mu\text{cal}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$. Sabendo-se que no processo de oxidação metabólica de 1 mol de glicose são gerados aproximadamente 320kcal (WANG et al., 1979), a taxa de calor metabólico obtida nos segmentos de raiz corresponde a uma utilização de $0,11 \text{ nmol de glicose}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$. Como a oxidação total de 1 mol de glicose utiliza 6 mol de O_2 , tem-se que a taxa de calor obtida equivale a um consumo médio de $0,65 \pm 0,06 \text{ nmolO}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$, que não difere do valor de respiração avaliado por eletrodo de oxigênio: $0,54 \pm 0,06 \text{ nmolO}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}(\text{MF})$. Estes cálculos indicam que as

medidas da taxa de calor metabólico da raiz, obtidas por microcalorimetria de condução, refletiram essencialmente o metabolismo aeróbico.

4.4. Liberação de eletrólitos

A taxa de liberação de eletrólitos pelas raízes apresentou um aumento acentuado nas plântulas expostas a 5 e 10°C, em comparação com os tratamentos a 15, 20 e 25°C (Figura 12).

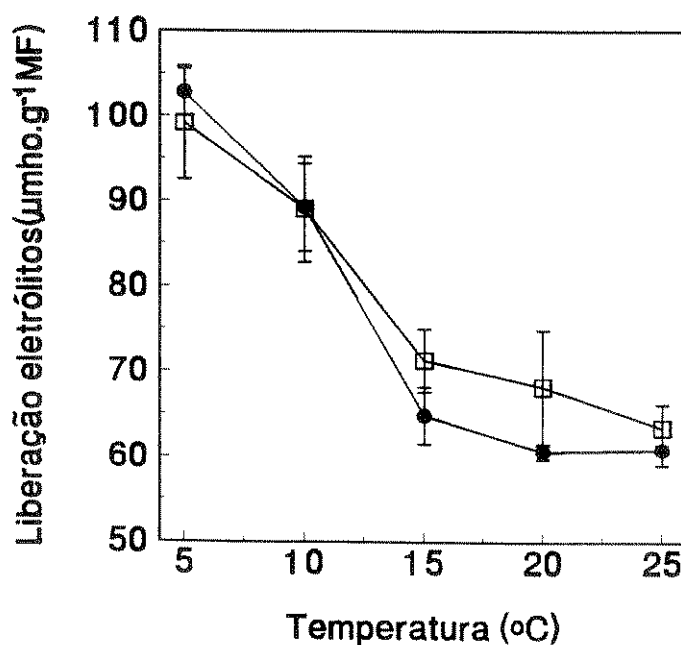


Figura 12. Liberação de eletrólitos por segmentos apicais de raízes de plântulas de café expostas a temperaturas de resfriamento por 6 dias (círculos fechados) e após transferência a 25°C por mais 6 dias (quadrados abertos). Valores são médias e desvio padrão de três repetições.

Para investigar se as plantas afetadas pelo resfriamento seriam capazes de recuperar quando transferidas de volta à temperatura de 25°C, as plantas foram expostas novamente à temperatura do controle por um período adicional de 6 dias, e foram feitas novas avaliações das taxas de liberação de íons. Observou-se que após o retorno à temperatura de 25°C, as plântulas anteriormente submetidas a 5 e 10°C continuaram a perder eletrólitos (Figura 12), sugerindo que ocorreram alterações irreversíveis na permeabilidade das membranas, durante o período de exposição às temperaturas de resfriamento.

4.5. Peroxidação de lipídios

A Figura 13 mostra que durante os 5 primeiros dias de exposição das plântulas à temperatura de 10°C não foi detectado aumento no processo de peroxidação de lipídios, o que ocorreu a partir do sexto dia de tratamento em condições de resfriamento.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram um significativo aumento na formação de malondialdeído em raízes expostas a 10°C por 6 dias, sendo os valores 44% mais altos no tratamento por resfriamento, comparado com o controle a 25°C.

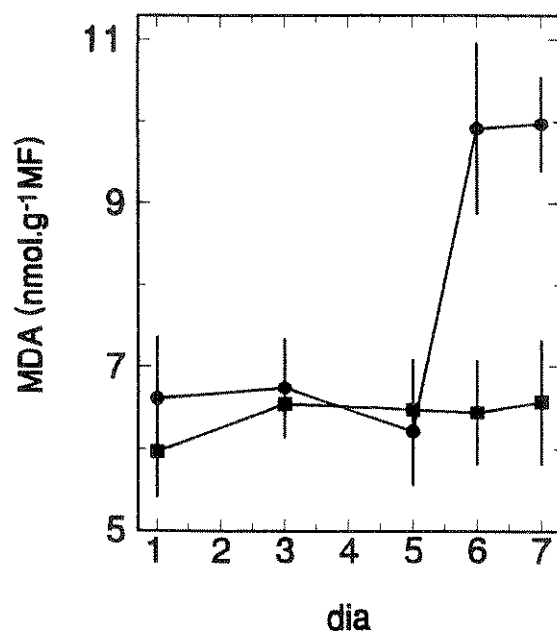


Figura 13. Variações na peroxidação lipídica em segmentos apicais de raízes de café, em função do tempo de exposição das plântulas às temperaturas de 25°C (quadrados) e 10°C (círculos). Valores são médias e desvio padrão de 4 repetições.

Tabela 1. Alterações na peroxidação de lipídios em segmentos apicais de raízes de plântulas de café expostas a temperaturas de resfriamento por 6 dias. Valores são médias e desvio padrão de 4 repetições.

Temperatura (°C)	MDA [nmol.g ⁻¹ (MF)]
10	9,79 ± 0,51a*
15	6,98 ± 0,48b
25	6,76 ± 0,96b

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, com $P \leq 0,05$ (Teste de Tukey)

4.6.Fluidiez de membranas

A figura 14 apresenta os espectros de EPR a 25°C para os marcadores de spin 5-, 12- e 16-DSA, incorporados em membranas celulares de segmentos apicais de raízes de plântulas aclimatadas a 25°C e em microssomas obtidos dos mesmos tecidos.

Devido à grande força hidrofóbica destes marcadores de spin, e às condições adequadas de preparação das amostras, estas sondas foram capazes de penetrar a parede celular e intercalar com os lipídios de membrana, sendo os espectros de EPR similares aos espectros observados em membranas plasmáticas (ALONSO *et al.*, 1995). Os espectros obtidos mostram que os marcadores se distribuíram adequadamente na membrana em tecidos intactos e em microssomas.

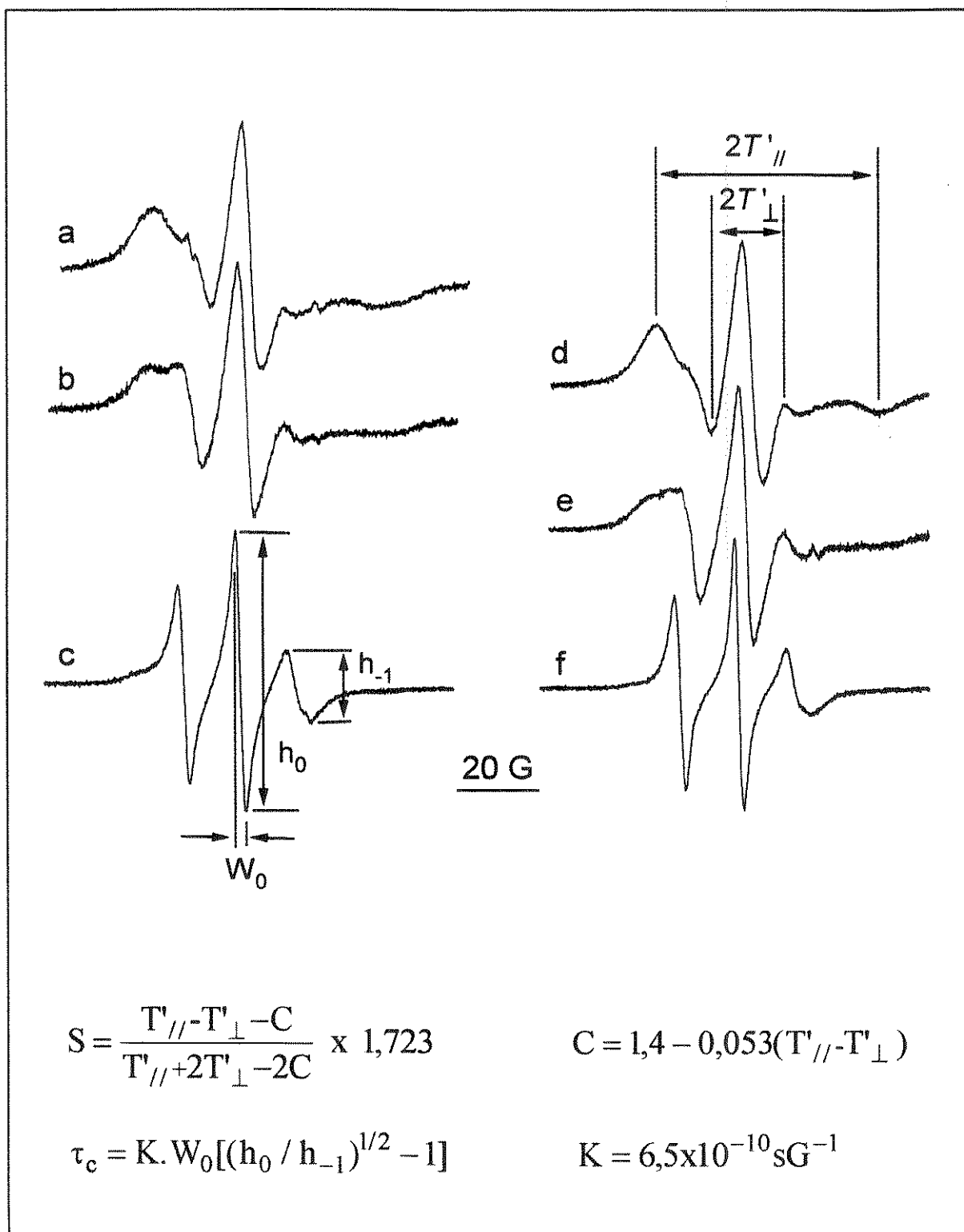


Figura 14. Espectros de EPR a 25°C dos marcadores de spin 5-, 12- e 16-DSA em membranas celulares de segmentos intactos de raízes de plântulas de café (a,b,c) e em microsomas (d,e,f).

Medidas do parâmetro de ordem S , utilizando o marcador de spin 5-DSA, durante 7 dias consecutivos, mostraram que o grau de fluidez das membranas permaneceu estável durante os 4-5 dias subsequentes à imposição do tratamento de resfriamento (Figura 15). A partir do quinto dia de tratamento das plântulas a 10°C as membranas celulares tornaram-se gradualmente mais rígidas, alcançando altos valores de S no sétimo dia de observação.

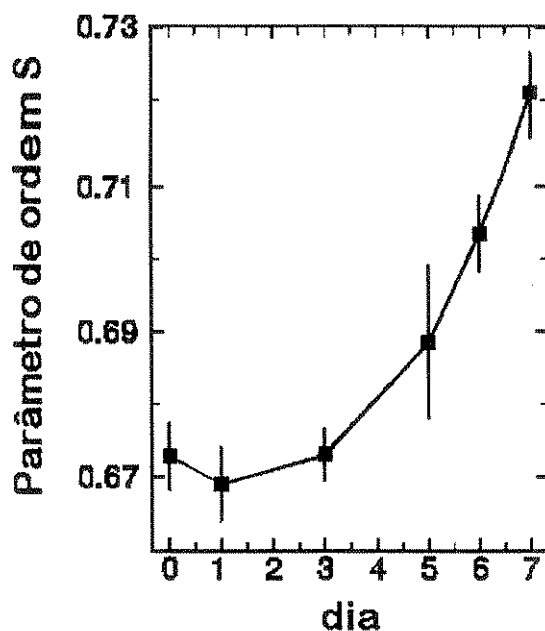


Figura 15. Variações no parâmetro de ordem S , para 5-DSA, estruturado em membranas de segmentos apicais de raízes de plântulas de café, em função do tempo de exposição das plântulas à temperatura de 10°C. Valores são médias e desvio padrão de três repetições.

O aumento na rigidez de membranas celulares após exposição das plântulas de café à temperatura de 10°C, foi detectado também com o marcador de spin 16-DSA, conforme indicado pelo aumento significativo no parâmetro τ_c , comparado com 15 e 25°C (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetro de Ordem S, para 5-DSA, e Tempo de Correlação Rotacional, τ_c , para 16-DSA, a 25°C, ambos estruturados em segmentos apicais de raízes de plântulas de café submetidas a diferentes temperaturas, durante 6 dias. Valores são médias e desvio padrão de 3 repetições.

Temperatura de tratamento (°C)	S	τ_c (nanosegundos)
10	0,722 ± 0,002a*	2,17 ± 0,08a
15	0,700 ± 0,005b	1,77 ± 0,12b
25	0,698 ± 0,004b	1,82 ± 0,09b

* As médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, com $P \leq 0,05$ (Teste de Tukey)

Uma vez que foram detectadas alterações na fluidez de membranas celulares em plantas submetidas à temperatura de 10°C, nos espectros obtidos a 25°C, optou-se por fazer um estudo mais detalhado com os marcadores de spin, obtendo-se os espectros de EPR em diversas temperaturas, de 5 a 25°C, a intervalos de 1°C. A Figura 16 apresenta as alterações dos parâmetros $2T'_{//}$ e S, em função da temperatura de corrida dos

espectros, utilizando-se o marcador 5-DSA. As medidas foram feitas com plântulas submetidas às temperaturas de 10, 15 e 25°C, em tecidos intactos de raízes, e em microssomas de plantas mantidas a 25°C. A fluidez da membrana foi a mesma, nas plantas mantidas a 25°C, tanto quanto avaliada em tecidos intactos, quanto em membranas microssomais. As membranas de plantas expostas a 10°C apresentaram menor grau de fluidez, em toda a faixa de temperatura do espectro (5 a 25°C).

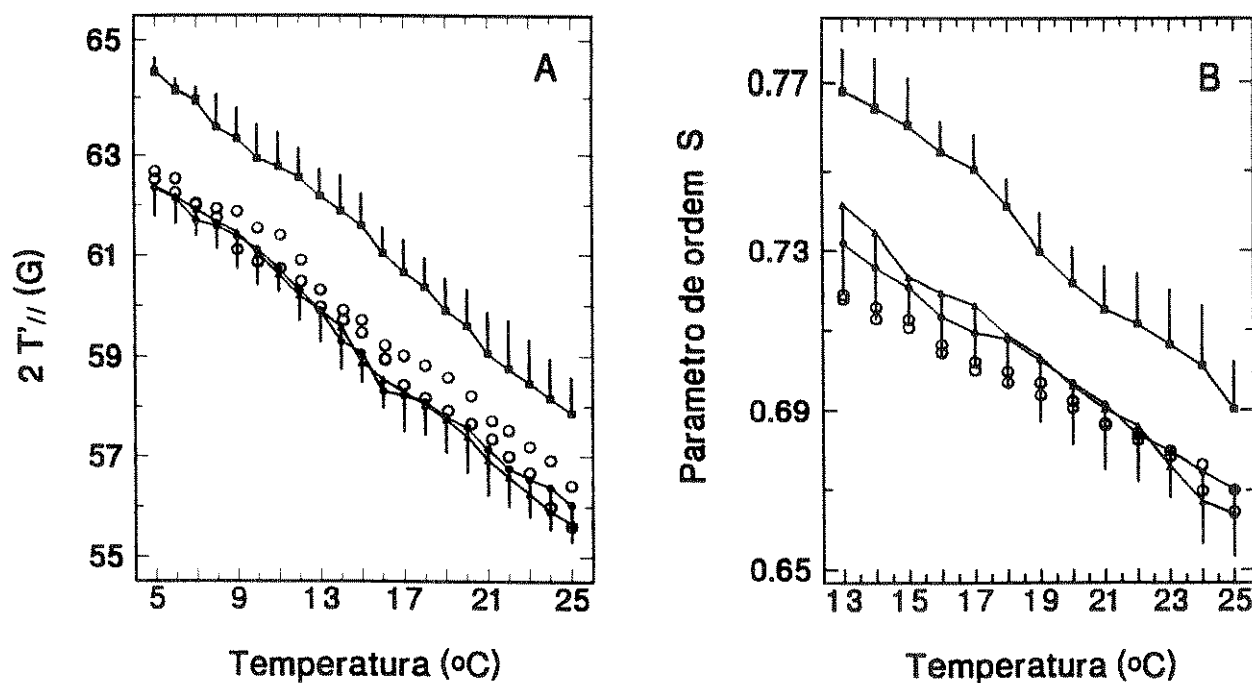


Figura 16. Parâmetros de EPR do marcador de spin 5-DSA em membranas celulares de segmentos intactos de raízes e em microssomas do mesmo tecido, em função da temperatura durante as medições. Os símbolos indicam três temperaturas de tratamento para tecidos intactos: 10°C (quadrado), 15°C (triângulo) e 25°C (círculo). Os microssomas (círculo aberto) foram obtidos de plantas mantidas a 25°C. As médias e desvio padrão foram obtidos de 3 experimentos independentes.

O marcador 12-DSA mostrou-se pouco sensível às alterações na fluidez das membranas induzidas por tratamentos de resfriamento, pois o parâmetro $2T'_{//}$ e o parâmetro de ordem S não detectaram diferenças entre as temperaturas de 10, 15 e 25°C (Figura 17).

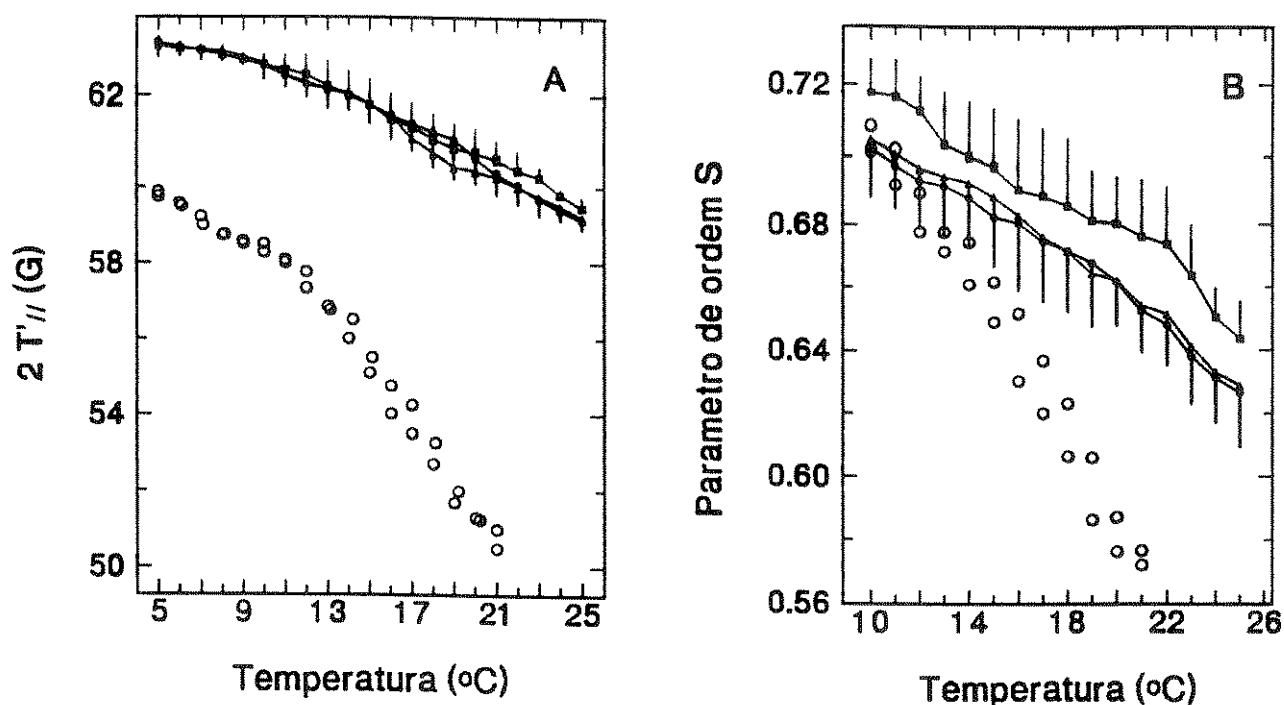


Figura 17. Parâmetros de EPR do marcador de spin 12-DSA em membranas celulares de segmentos intactos de raízes e em microssomas do mesmo tecido, em função da temperatura durante as medições. Os símbolos indicam 3 temperaturas de tratamento para tecidos intactos: 10°C (quadrado), 15°C (triângulo) e 25°C (círculo). Os microssomas (círculo aberto) foram obtidos de plantas mantidas a 25°C. As médias e desvio padrão foram obtidos de 3 experimentos independentes.

A curva de $2T'_{//}$ versus temperatura para o marcador 12-DSA (Figura 17-A), apresentou nas amostras de microssomas um acentuado aumento na fluidez a partir de 12°C, prosseguindo até 21°C, quando ocorreu a perda de resolução do parâmetro $2T'_{//}$, não permitindo conseqüentemente o cálculo do parâmetro de ordem além desta temperatura (Figura 17-B).

Os valores do tempo de correlação rotacional, τ_c , avaliados através do marcador 16-DSA, em função do recíproco da temperatura absoluta, são apresentados na Figura 18. Esta sonda, que se localiza mais profundamente na membrana, também detectou maior grau de rigidez da membrana em plantas submetidas a 10°C, o que pode ser inferido pelos valores mais altos de τ_c destas amostras. Observou-se também que o efeito de rigidez sobre a membrana foi maior para as temperaturas mais baixas do espectro, tanto para microssomas quanto para tecidos intactos. Os valores de tempo de correlação rotacional avaliados em microssomas obtidos de plântulas mantidas a 25°C foram similares aos de tecidos intactos dos tratamentos a 15 e 25°C, na faixa de temperatura de 5 a 20°C, e um pouco menores na faixa de 20 a 25°C.

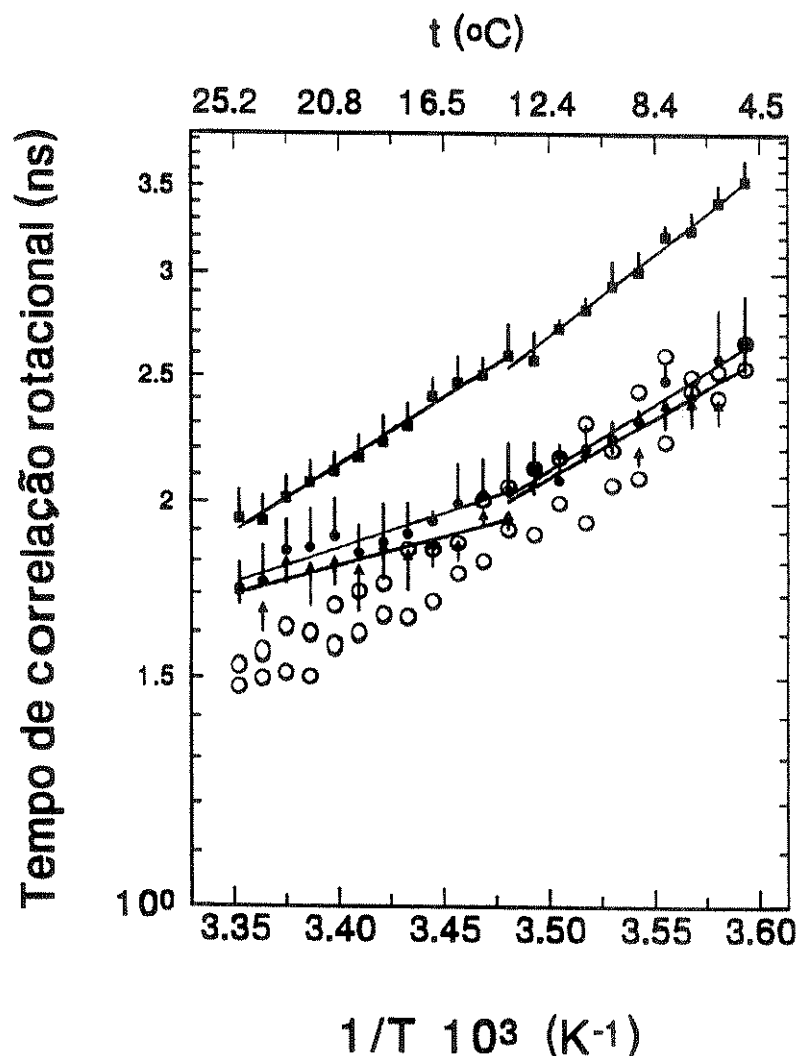


Figura 18. Gráfico de Arrhenius do tempo de correlação rotacional (τ_c) do marcador de spin 16-DSA, estruturado em membranas celulares de segmentos intactos de raízes e em microsomas do mesmo tecido, em função da temperatura durante as medições. Os símbolos indicam 3 temperaturas de tratamento para tecidos intactos: 10 $^{\circ}C$ (quadrado), 15 $^{\circ}C$ (triângulo) e 25 $^{\circ}C$ (círculo). Os microsomas (círculo aberto) foram obtidos de plantas mantidas a 25 $^{\circ}C$. As análises de regressão foram feitas considerando-se os intervalos de temperatura 25-15 $^{\circ}C$ e 15-5 $^{\circ}C$. As médias e desvio padrão foram obtidos de 3 experimentos independentes.

As curvas apresentadas na Figura 18 mostram discretas diferenças nos coeficientes de inclinação para os intervalos de temperatura de 5 a próximo de 15°C e de aproximadamente 15 a 25°C. As mudanças nas inclinações, que foram mais evidentes nas plântulas submetidas a 15 e 25°C, sugerem uma transição de fase ao redor de 15°C. As inclinações nos gráficos de Arrhenius foram utilizadas para o cálculo da energia de ativação para o marcador 16-DSA, apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Energia de ativação para a difusão rotacional do marcador de spin 16-DSA em membranas celulares de raízes de plântulas de café submetidas a diferentes temperaturas de tratamento. As médias e desvio padrão foram calculados a partir dos dados da Figura 18.

Temperatura de tratamento (°C)	E_a (Kcal/mol)	
	25-15°C	15-5°C
10	$4,8 \pm 0,7a^*$	$5,4 \pm 0,5a$
15	$2,2 \pm 0,6b$	$4,5 \pm 0,7a$
25	$2,5 \pm 0,5b$	$4,9 \pm 0,8a$

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, com $P \leq 0,05$ (Teste de Tukey)

Nas três temperaturas de tratamento (10, 15 e 25°C) a sonda detectou a mesma barreira de energia (4,5-5,4 kcal/mol) para seu movimento de reorientação na faixa de temperatura de 5 a 15°C. Entre 15-25°C, a energia de ativação não variou para

plantas submetidas a 10°C, mas foi significativamente mais baixa (2,0-2,5 kcal/mol) nas plantas tratadas a 15 e 25°C. Desta forma, enquanto as plantas tratadas a 10°C apresentaram aparentemente a mesma fase de membrana, em toda a faixa de temperatura em que foram feitas as medições, as plantas submetidas a 15 e 25°C sofreram uma aparente transição de fase próximo a 15°C. Esta transição representa uma mudança de uma membrana mais ordenada (5-15°C) para uma mais fluida (15-25°C), uma condição na qual o marcador tem maior liberdade de movimento.

4.7. Atividade enzimática e redução de TTC

As atividades das enzimas envolvidas nos processos de detoxificação de peróxido de hidrogênio, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e catalase, responderam diferentemente ao estresse por resfriamento à temperatura de 10°C (Tabela IV). Ascorbato peroxidase e catalase não mostraram alterações significativas após o tratamento a baixa temperatura, por 6 dias consecutivos, enquanto que a atividade específica da guaiacol peroxidase aumentou 55%. Glutathione redutase, que promove o fornecimento de glutathione reduzida para a célula, apresentou decréscimo na atividade, concomitantemente à uma acentuada diminuição na atividade de desidrogenases, avaliada pela capacidade de redução de TTC. As pontas de raízes das

plântulas não mostraram alterações no teor de proteínas, após exposição à temperatura de 10°C.

Tabela 4. Atividade de ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, glutathiona redutase, redução de TTC, e teor de proteínas de segmentos apicais de raízes de plântulas de café, expostas às temperaturas de 25 e 10°C durante 6 dias. Valores são médias e desvio padrão de quatro repetições.

	Temperatura de tratamento (°C)	
	25	10
Ascorbato Peroxidase (nmol Ascorbato.min ⁻¹ .mg prot. ⁻¹)	315,75 ± 56,13a	272,22 ± 11,28a
Guaiacol Peroxidase (nmol purpurogalina.min ⁻¹ .mg prot. ⁻¹)	522,99 ± 6,24a	810,00 ± 70,92b
Catalase (nmol H ₂ O ₂ .min ⁻¹ .mg prot. ⁻¹)	9,09 ± 1,41a	9,81 ± 3,27a
Glutathiona Redutase (nmol NADPH.min ⁻¹ .mg prot. ⁻¹)	14,64 ± 0,69a	13,29 ± 0,72b
Redução de TTC (Abs485nm.gMF ⁻¹)	3,18 ± 0,61a	1,25 ± 0,51b
Teor de proteína (mg.g MF ⁻¹)	58,40 ± 7,85a	54,23 ± 3,89a

As médias seguidas pela mesma letra em cada linha não diferem estatisticamente com $P \leq 0,05$ (Teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e biofísicos determinados neste trabalho refletiram a sensibilidade de ápices de raízes de plântulas de café a temperaturas de resfriamento, particularmente na faixa de 5 a 10°C. Sob estas condições, o crescimento das raízes foi drasticamente inibido e foi acompanhado por uma grande redução na taxa de calor metabólico e por alterações significativas na permeabilidade das membranas. Este comportamento típico, observado frequentemente em plantas sensíveis ao resfriamento, é coerente com os dados existentes na literatura sobre a sensibilidade do cafeeiro a baixas temperaturas, que afetam particularmente a fotossíntese (BAUER et al., 1985, 1990; AMARAL, 1991), a produção de cafeína (FRISHKNECHT et al., 1982), o crescimento e o metabolismo de nitrogênio (AMARAL, 1991). É importante destacar que, embora nos diversos estudos realizados anteriormente em *Coffea arabica* tenham sido utilizadas plantas de 8 a 24 meses de idade, foram detectadas alterações fisiológicas na mesma faixa de temperatura empregada neste trabalho, com plântulas de 35 dias de idade. Isto mostra que raízes jovens, obtidas de plântulas, podem constituir um sistema sensível e fácil de obter, visando monitorar processos fisiológicos diversos em condições de estresse.

A capacidade das plântulas de recuperar o crescimento após retorno a 25°C, mostrou-se altamente dependente da temperatura

do estresse a qual as plantas foram submetidas anteriormente (Figura 9). As medidas de recuperação do crescimento, consideradas como um teste de viabilidade, indicaram danos irreversíveis aos tecidos nas temperaturas abaixo de 15°C, dentro do período analisado. Os dados de liberação de eletrólitos (Figura 12) também refletem estas alterações, pois mesmo após retorno às condições normais para crescimento, as plântulas anteriormente submetidas às temperaturas de 5 e 10°C, continuaram a perder eletrólitos. O aumento na liberação de íons que ocorre durante injúria por resfriamento, indica perda parcial da permeabilidade seletiva (LURIE et al., 1994) em consequência de danos estruturais nas membranas (GRAHAN & PATTERSON, 1982) e diminuição da disponibilidade de energia para manutenção dos gradientes iônicos através das membranas (SOBCZYK et al., 1985).

O conjunto de dados obtidos neste trabalho parece refletir a influência destes dois fatores sobre a liberação de eletrólitos pelas raízes de café, sob condições de resfriamento, pois tanto observaram-se mudanças estruturais em membranas, caracterizadas por aumentos na rigidez (Figura 15) e peroxidação lipídica (Figura 13), quanto ocorreram danos acentuados no metabolismo aeróbico dos tecidos, indicados por microcalorimetria (Figura 10) e capacidade de redução de TTC (Tabela 4).

As taxas de produção de calor, avaliadas em plântulas submetidas a diferentes temperaturas, mostraram estreita

correlação com as taxas de crescimento das plântulas crescidas na mesmas condições (Figura 11). Uma correlação entre estes dois parâmetros foi relatada por HANSEN et al. (1992), porém em ausência de estresse. Estes autores mediram a liberação de calor de meristemas apicais de diferentes clones de *Sequoia sempervirens*, e observaram que as taxas de calor foram linearmente relacionadas à taxa de crescimento em clones de 60 dias de idade e em árvores de 25 anos. Estes resultados sugeriram que as medidas de taxa de calor metabólico podem ser utilizadas como um meio eficiente e simples para seleção de árvores de sequoia com potencial genético para crescimento rápido.

A Figura 11 mostra ainda que é possível obter com a técnica de microcalorimetria um parâmetro bioenergético importante, que é a energia de manutenção. Nota-se que nas plantas submetidas a 10°C por um período de 6 dias, não ocorreu crescimento da raiz, contudo, a taxa de calor metabólico da região de alongamento da raiz foi de 0,66 $\mu\text{W}.\text{mg}^{-1}$ (Massa Fresca), que corresponde a 27% do controle mantido a 25°C. Esta taxa de calor, detectada em ausência de crescimento, refere-se à energia de manutenção (PENNING DE VRIES, 1975), e significa o custo energético mínimo para manter a atividade metabólica em condições de estresse. Este custo inclui respiração para "turnover" de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana, manutenção de gradientes iônicos, e adaptações fisiológicas para manter a atividade celular.

Os dados de microcalorimetria mostram que as reduções na taxa de calor metabólico foram bastante acentuadas nas temperaturas inferiores a 15°C, indicando uma transição dependente da temperatura ao redor de 15°C (Figura 10), com grandes aumentos na energia de ativação abaixo desta temperatura. Comportamento semelhante ao de raízes de plantas de café foi relatado por CRIDDLE et al. (1988), em culturas de células e segmentos apicais da parte aérea de plantas de tomate, utilizando calorimetria diferencial de varredura (DSC). Estes autores mostraram através de gráficos de Arrhenius, alterações bruscas nas inclinações das curvas a temperaturas críticas de 11 e 14°C. Os desvios da linearidade corresponderam a um aumento na energia de ativação de 13,1 para 23,6 kcal.mol⁻¹. Por outro lado, em preparações de tecidos de cenoura, uma espécie considerada tolerante ao resfriamento, o desvio da linearidade só ocorreu próximo a 0°C. Da mesma forma, *Larix laricina*, uma conífera do hemisfério Norte, caracterizada como resistente ao frio não apresentou descontinuidade nas curvas de Arrhenius de 1 a 30°C, avaliada por DSC (HANSEN et al., 1989).

As transições bruscas nas taxas de calor metabólico, observadas por microcalorimetria em espécies sensíveis ao resfriamento, podem ser atribuídas essencialmente à combinação de dois fatores: a) alterações estruturais em membranas, principalmente na fração lipídica e b) aumentos na energia de ativação de reações enzimáticas, as quais podem estar ou não associadas a mudanças de fase de membranas (GRAHAM & PATTERSON,

1982). Diversos autores, trabalhando com plantas sensíveis ao resfriamento, tem identificado descontinuidades em gráficos de Arrhenius do consumo de oxigênio em células vegetais (LYONS & BREIDENBACH, 1979), bem como de atividades de enzimas envolvidas na respiração, como succinato oxidase, em *Vigna radiata* (RAISON & CHAPMAN, 1976) e várias desidrogenases, em soja (DUKE et al., 1977).

A presença de altos níveis de MDA nos tecidos das plantas de café submetidas ao resfriamento parece indicar uma acumulação de radicais livres de oxigênio nas células, desencadeando o processo de peroxidação de lipídios de membranas. Quando o processo de peroxidação lipídica ocorre em mitocôndrias surgem efeitos pronunciados nas enzimas da matriz, as quais perdem sua atividade, devido principalmente à oxidação de grupos sulfidrílicos essenciais (BINDOLI, 1988). Além deste efeito, vários componentes da cadeia respiratória mitocondrial são sensíveis aos danos peroxidativos, particularmente aqueles localizados entre NADH desidrogenase e ubiquinona, e entre ubiquinona e citocromo c (BINDOLI, 1988).

Uma adaptação frequentemente utilizada pelas plantas para limitar o processo de peroxidação em membranas consiste no aumento da produção de antioxidantes, tais como α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathiona, e elevada atividade de enzimas antioxidantes (SCHMIDT, 1986; BUETTNER, 1993). Neste trabalho foi verificado que, após o tratamento das plântulas de café à

temperatura de 10°C, as enzimas ascorbato peroxidase e catalase, reconhecidas pela ação antioxidante, não alteraram sua atividade, enquanto que guaiacol peroxidase apresentou um aumento de 55% na atividade específica.

A enzima guaiacol peroxidase, assim como ascorbato peroxidase é bastante efetiva na via de captura de peróxido de hidrogênio (ASADA, 1992; MEHLHORN *et al.*, 1996), e sua indução parece estar associada com a acumulação de peróxido de hidrogênio, em presença de alto teor de compostos fenólicos reduzidos. Esta indução foi relatada em plantas expostas a diversos tipos de estresse, tais como exposição à radiação UV-B (RAO *et al.*, 1996), aumentos nos níveis de O₃ e SO₂ (KUBO *et al.*, 1995), CO₂ (SCHWANZ *et al.*, 1996), mercúrio e cádmio (SHAW, 1995), deficiências de magnésio (POLLE *et al.*, 1994) e zinco (CAKMAK & MARSCHNER, 1993) e infecção por fungos patogênicos (NICKERSON *et al.*, 1993). Recentemente, PRASAD *et al.* (1995) relataram a indução da atividade da guaiacol peroxidase mitocondrial em plântulas de milho expostas à temperatura de 14°C. Aqueles autores sugeriram que as peroxidases mitocondriais, tais como guaiacol peroxidase, desempenham papel similar à catalase na proteção da mitocôndria em relação ao dano oxidativo.

Guaiacol peroxidase tem propriedades que a distinguem da ascorbato peroxidase, tais como: a) ascorbato peroxidase localiza-se principalmente nos cloroplastos e parcialmente no

citosol, e guaiacol peroxidase localiza-se no vacúolo, parede celular, citosol (CHEN & ASADA, 1989) e mitocôndria (PRASAD et al. 1995); b) guaiacol peroxidase mostra alto grau de especificidade para guaiacol e pirogallol, mas pouca atividade para ascorbato como doador de elétrons (CHEN & ASADA, 1989). É interessante destacar que, paralelamente às diferenças estruturais e funcionais existentes entre estas duas enzimas, seus substratos e produtos podem interagir, de forma a manter uma disponibilidade de fenóis reduzidos na célula. CHEN & ASADA (1990) mostraram que guaiacol peroxidase, extraída de folhas de espinafre, pode catalizar a oxidação de *p*-aminofenol por H₂O₂, produzindo o radical aminofenox que, por sua vez oxida ascorbato para produzir radicais monodeidroascorbato e deidroascorbato. MEHLHORN et al. (1996), em recente revisão sobre a detoxificação de peróxido de hidrogênio por peroxidases dependentes de ascorbato e guaiacol, formulou a hipótese da existência de um "turnover" entre ácido ascórbico e compostos fenólicos. Quando guaiacol peroxidase extraída de nabo foi pré-incubada na presença de ácido cafêico, ácido clorogênico e outros compostos 3,4-diidroxifenólicos, a capacidade da enzima de utilizar ácido ascórbico como co-substrato aumentou consideravelmente, uma resposta que pode estar relacionada à capacidade do ácido ascórbico de reduzir derivados de *o*-quinona. Portanto, nestas condições os compostos fenólicos estariam atuando como primeiro agente redutor de peróxido de hidrogênio e ascorbato como o segundo agente, à semelhança do

que foi relatado por CHEN & ASADA (1990). MEHLHORN *et al.*, (1996) sugerem que ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase não são mutuamente exclusivas na sua capacidade funcional, como até então tem sido considerado. Em certas circunstâncias, guaiacol peroxidase pode apresentar atividade de ascorbato peroxidase e vice-versa. Isto confere um grau de flexibilidade às defesas antioxidantes na célula e pode proporcionar uma importante mudança no metabolismo, que se divide entre a biossíntese de lignina e a captura de excesso de peróxido de hidrogênio. Existem referências na literatura indicando que a produção de compostos fenólicos aumenta após exposição a baixas temperaturas (GRAHAM & PATTERSON, 1982) e que estes compostos, particularmente flavonóides, apresentam propriedade antiradical, dirigida principalmente a $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot$ e $^1\text{O}_2$ (FOYER *et al.*, 1994), assim como aos radicais peroxil ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxil ($\text{RO}\cdot$) (SAIJA *et al.*, 1995).

Os resultados deste estudo com plântulas de café sugerem que um mecanismo semelhante ao descrito por CHEN & ASADA (1990) e MEHLHORN *et al.* (1996), possa estar operando em células de pontas de raiz de café, sob condições de estresse, levando ao consumo de ascorbato para a detoxificação de H_2O_2 da célula diretamente, via ascorbato peroxidase, e para a regeneração de compostos fenólicos, que serão posteriormente utilizados como substrato pela guaiacol peroxidase. Se a captura de peróxido de hidrogênio por fenóis ocorrer a uma taxa muito rápida, a

disponibilidade de fenóis reduzidos poderá decrescer antes que ocorra a sua regeneração por ascorbato. Um dos problemas resultantes desta defasagem é que, quando os fenóis são oxidados a quinonas, estas tendem a condensar-se com grupos reativos de proteínas, especialmente grupos -SH e -NH₂ (LOOMIS, 1974).

Para evitar estes danos oxidativos em proteínas e garantir o funcionamento do mecanismo antioxidante que utiliza ascorbato e fenóis, torna-se portanto necessário um fornecimento simultâneo de ascorbato reduzido. A regeneração de ascorbato reduzido pode ser catalisada tanto por monodeidroascorbato redutase dependente de NADH, ou por deidroascorbato redutase dependente de glutathione reduzida (GSH), acoplada com a atividade da glutathione redutase (CAKMAK et al., 1993). A literatura apresenta consideráveis evidências experimentais associando a redução de glutathione disulfeto (GSSG) à disponibilidade de NADPH (FOYER & HALLIWELL, 1976; WINKLER et al., 1994). Desta forma compõe-se um sistema de acoplamento redox entre glutathione e ascorbato, essencial para detoxificar a célula de peróxido de hidrogênio (WINKLER et al., 1994). Neste trabalho com café pode ser observado que a atividade da glutathione redutase foi mais baixa nas raízes das plântulas submetidas ao resfriamento, do que nas plantas mantidas a 25°C, sugerindo que o sistema de acoplamento redox glutathione - ascorbato foi comprometido, na situação de estresse oxidativo onde, teoricamente, a exigência de fornecimento de GSH pela

célula seria aumentada. Tudo indica que a disponibilidade de GSH diminuiu por falta de poder redutor, pois ocorreram nestes tecidos acentuados decréscimos na atividade de desidrogenases e na taxa de calor metabólico. Esta diminuição do metabolismo aeróbico pode ter contribuído portanto, para intensificar os danos induzidos pelos radicais de oxigênio.

Uma abordagem alternativa, empregada neste trabalho para avaliar o impacto do estresse por resfriamento em processos associados a membranas, foi a utilização da técnica de EPR, um método não invasivo que permite a investigação de alterações estruturais em membranas de tecidos intactos.

Foi observado que os marcadores de spin derivados de ácido esteárico podem ser incorporados em segmentos de pontas de raízes de café, sob condições que mantem a integridade das membranas. Os espectros de EPR obtidos foram típicos (SUBCZYNSKI *et al.*, 1992) e os valores do parâmetro de ordem S e do tempo de correlação rotacional, a 25°C, foram semelhantes aos de membranas de eritrócitos (ALONSO *et al.*, 1995).

Os dados apresentados neste trabalho mostraram que em plantas mantidas a 25°C, o grau de fluidez foi similar, quando avaliado em tecidos intactos e em preparações microssomais, utilizando-se o marcador 5-DSA. Após submeter as plântulas à temperatura de 10°C, por 6 dias consecutivos, as membranas das células de pontas de raiz mostraram-se nitidamente mais rígidas, quando os parâmetros de fluidez foram obtidos com os

marcadores 5 e 16-DSA. Os dados incluídos na Figura 15 mostram um padrão de variação do espectro de EPR semelhante aquele observado para as alterações da concentração de MDA (Figura 13), sugerindo uma correlação positiva entre estes dois fenômenos. Este comportamento tornou-se particularmente evidente após 6 dias de exposição das plântulas a condições de estresse por resfriamento. Existem várias referências na literatura de que alterações no estado físico das membranas, como decréscimos na fluidez, podem ser consequências de peroxidação lipídica, que tem sido detectada utilizando-se marcadores de spin (DOBRETISOV *et al.*, 1977; BRUCH & THAYER, 1983; WATANABE *et al.*, 1990) e sondas de fluorescência (CHEN & YU, 1994). A presença de hidroperóxidos lipídicos no interior das membranas celulares altera consideravelmente a organização de membranas, devido à sua polaridade, podendo afetar a fluidez da membrana e a permeabilidade, bem como as funções de proteínas presentes em membranas (BURDON *et al.*, 1994). Há evidências de que a diminuição da fluidez das membranas após peroxidação lipídica é devido principalmente à formação de ligações covalentes entre radicais lipídicos adjacentes (CHEN & YU, 1994, CURTIS *et al.*, 1994), que poderia levar a um decréscimo na liberdade de movimento das cadeias de ácidos graxos. Estas interações entre cadeias de lipídios de membrana poderiam também causar o rompimento do arranjo de ordenamento de lipídios, contribuindo desta forma para vazamento de solutos de membranas (DHINDSA *et al.*, 1981, RICE-EVANS & BURDON, 1993).

No caso das plântulas de café, os decréscimos na fluidez de membranas, observados após o resfriamento a 10°C, são resultantes do alto grau de peroxidação lipídica, numa situação em que a ação dos sistemas antioxidantes enzimáticos provavelmente não foi suficiente para proteger as membranas dos danos oxidativos.

O marcador de spin 12-DSA apresentou um padrão diferente dos marcadores 5 e 16-DSA, em tecidos intactos e em microssomas. Nas plantas mantidas a 25°C, observou-se uma acentuada diferença na fluidez de membranas entre microssomas e amostras de tecidos intactos (Figura 17). O parâmetro $2T'_{//}$ revelou uma bicamada lipídica consideravelmente mais fluida em microssomas em todas as temperaturas de corrida do espectro de EPR, e apresentou diferentes inclinações acima e abaixo de 11°C, sugerindo uma transição de fase nesta temperatura. É relevante destacar que o marcador 12-DSA não foi sensível às alterações na fluidez de membranas induzidas pelo resfriamento, apresentando valores de $2T'_{//}$ semelhantes nos tratamentos a 25, 15 e 10°C. Além disso, os valores de $2T'_{//}$ em tecidos intactos foram bem maiores do que os obtidos para a sonda 5-DSA, em plantas mantidas a 25 e 15°C. Este resultado foi considerado inesperado, pois a mobilidade das cadeias polimetileno dos lipídios geralmente aumenta à medida em que estas se afastam da região polar dos lipídios e se aproximam do centro hidrofóbico da membrana (LIKHTENSHEIN, 1976; BRUCH & THAYER, 1983). Existem informações na literatura de que a formação de

complexos proteína-lipídio leva à ocorrência de micro-regiões dentro da membrana nas quais a mobilidade dos lipídios é relativamente menor (LIKHTENSHEIN, 1976; KOSTER *et al.*, 1994;). Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho, é razoável supor que uma eventual proteína estrutural, presente nas membranas de tecidos intactos, e ausente nas preparações microssomais, tenha contribuído para a limitação do movimento do marcador 12-DSA, levando aos altos valores observados para o parâmetro $2T'_{//}$. Esta hipótese talvez pudesse ser investigada através de um estudo mais detalhado destas membranas, utilizando-se modelos com lipídios isolados, e/ou membranas intactas incorporadas com marcadores de proteínas.

Diferentemente do marcador 12-DSA, a sonda 16-DSA, que se incorpora mais profundamente na bi-camada lipídica, detectou uma membrana mais rígida em plantas submetidas a 10°C, por 6 dias, como pode ser visto pelos valores mais altos de τ_c para estas amostras (Figura 18). As mudanças nas inclinações das curvas de τ_c versus $1/T$, mostradas na Figura 18, foram mais evidentes em plantas tratadas a 15 e 25°C do que a 10°C, que mantem aparentemente a mesma fase de membrana em toda a faixa de temperatura de corrida do espectro. Os dados obtidos com as plantas submetidas às temperaturas de 15 e 25°C sugerem uma transição de fase de membrana à temperatura ao redor de 15°C. Esta transição estaria indicando uma mudança característica de uma membrana mais ordenada para uma mais fluida, uma condição

na qual a sonda tem maior liberdade de movimento, na faixa de temperatura de 15 a 25°C. Abaixo da temperatura de transição, os lipídios assumem um arranjo mais ordenado e compactado, no qual o marcador 16-DSA apresenta uma alta barreira de energia para seu movimento (Tabela 3). Nesta situação, as distâncias entre as cadeias peroxidáveis dos lipídios são menores e, conseqüentemente, mais favoráveis à peroxidação (McLEAN *et al.*, 1992). Esta transição de fase de lipídios tem sido apontada como o mecanismo molecular inicial que desencadeia os sintomas de injúria por resfriamento em plantas (LYONS, 1973, NISHIDA & MURATA, 1996). Em espécies sensíveis, à medida que a temperatura diminui, alguns lipídios da membrana agregam-se em grupos e solidificam, resultando em uma mistura heterogênea de grupos líquido-cristalinos e outros de lipídios solidificados. A conversão dos lipídios de membrana do estado líquido-cristalino para gel é acompanhada por uma agregação progressiva de proteínas de membrana. A atividade normal da membrana pode continuar enquanto os lipídios de membrana estão predominantemente no estado líquido-cristalino, mas à medida que ocorre mudança de fase, a membrana perde sua capacidade funcional (LYONS & BREINDENBACH, 1979). Lipídios extraídos de mitocôndrias de algumas plantas sensíveis ao resfriamento, como soja, tomate, pepino e *Vigna*, quando analisados por EPR e calorimetria, mostraram uma transição de fase em temperaturas que se relacionam com as respostas fisiológicas das plantas ao resfriamento, na faixa de 14 a 15°C (RAISON & ORR, 1986). Por

outro lado, nenhuma transição de fase foi detectada em lipídios de plantas tolerantes ao resfriamento, como cevada e trigo.

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que ocorreram danos fisiológicos significativos quando as plântulas de café foram submetidas a temperaturas abaixo da temperatura de transição de fase dos lipídios, detectada por EPR, e são coerentes com a hipótese de que a sensibilidade do café ao resfriamento está relacionada a alterações induzidas pela temperatura na estrutura das membranas celulares, as quais representariam o primeiro sítio de injúria, nestas condições de estresse.

6. CONCLUSÕES

O estresse por resfriamento em plântulas de café expostas a 10°C por 6 dias consecutivos, foi caracterizado como um estresse oxidativo, que resultou em peroxidação de lipídios, aumento na rigidez de membranas, vazamento de eletrólitos e redução na atividade metabólica.

O grande aumento na atividade da enzima guaiacol peroxidase sugere que compostos fenólicos podem desempenhar um papel importante no processo de detoxificação de peróxido de hidrogênio em raízes de café.

As alterações na rigidez das membranas em resposta ao resfriamento, foram discriminadas em tecidos intactos com o uso dos marcadores de spin 5-, 12- e 16-DSA. A micro-região da membrana, correspondente ao nível do carbono 12 da cadeia acil dos lipídios mostrou-se insensível às alterações peroxidativas, apresentando-se parcialmente imobilizada, possivelmente por uma interação lipídio-proteína.

Microcalorimetria e EPR se mostraram eficientes para avaliar a resposta das plantas ao estresse, empregando-se tecidos intactos, podendo ser utilizadas como critérios para monitoramento de estresse ambiental e, eventualmente, para a seleção de linhagens de café com maior tolerância a temperaturas de resfriamento.

7. LITERATURA CITADA

- ALÈGRE, G. 1959. Climats et caféiers d'Arabic. Agron. Trop. 14:23-58.
- ALONSO, A., MEIRELLES, N.C., TABAK, M. 1995. Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study. Biochim. Biophys. Acta 1237:6-15.
- AMARAL, J.A.T. 1991. Crescimento vegetativo estacional do cafeeiro e suas inter-relações com fontes de nitrogênio, fotoperíodo, fotossíntese e assimilação do nitrogênio. Universidade Federal de Viçosa, Tese de Doutorado.
- ANDERSON, P.C., LOVRIEN, R.E. 1979. A flow calorimeter for assay of hormone and metabolite-induced changes in steady-state heat production by tissue. Anal. Biochem. 100:77-86.
- ASADA, K. 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol. Plant. 85:235-241.
- BASU, A., BASU, U., TAYLOR, G.J. 1994. Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. Plant Physiol. 104:1007-1013.
- BAUER, H., WIERER, R., HATHEWAY, W.H., LARCHER, W. 1985. Photosynthesis of *Coffea arabica* after chilling. Physiol. Plant. 64:449-454.

- BAUER, H., COMPLOJ, A., BODNER, M. 1990. Susceptibility to chilling of some central-African cultivars of *Coffea arabica*. Field Crops Res. 24:119-129.
- BINDOLI, A. 1988. Lipid peroxidation in mitochondria. Free Rad. Biol. Medic. 5:247-261.
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M.V., INZÉ, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:83-116.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:255-260.
- BRIDSON, D.M. 1982. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae sub fam. Cinchonoideae) for part 2 of flora of tropical East Africa: Rubiaceae. Kew Bull. 36:817-859.
- BRUCH, R.C., THAYER, W.S. 1983. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. Biochim. Biophys. Acta 733:216-222.
- BUEGE, J.A., AUST, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52:302-310.
- BUETTNER, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. 300:535-543.

- BURDON, R.H., GILL, V. BOYD, P.A., O'KANE, D. 1994. Chilling, oxidative stress and antioxidant enzyme responses in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Royal Soc. Edinburg. 102B:177-185.
- CAKMAK, I., HORST, W.J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). Physiol. Plant. 83:463-468.
- CAKMAK, I., STRBAC, D., MARSCHNER, H. 1993. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. J. Exp. Bot. 44:127-132.
- CHEN, G-X., ASADA, K. 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isosymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiol. 30:987-998.
- CHEN, G-X., ASADA, K. 1990. Hydroxyurea and p-aminophenol are the suicide inhibitors of ascorbate peroxidase. J. Biol. Chem. 265:2775-2781.
- CHEN, J.J., YU, B.P. 1994. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. Free Rad. Biol. Medic. 17:411-418.
- CRIDDLE, R.S., BREIDENBACH, R.W., LEWIS, E.A., EATOUGH, D.J., HANSEN, L.D. 1988. Effects of temperature and oxygen depletion on metabolic rates of tomato and carrot cell cultures and cuttings measured by calorimetry. Plant Cell Envir. 11:695-701.

- CRIDDLE, R.S., BREIDENBACH, R.W., HANSEN, L.D. 1991. Plant calorimetry: how to quantitatively compare apples and oranges. *Therm. Acta* 193:67-90.
- DAVIES, K.J.A. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. 1. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262:9895-9901.
- DHINDSA, R.S., PLUMB-DHINDSA, P., THORPE, T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32:93-101.
- DOBRETISOV, G.E., BORSCHEVSKAYA, V.A., PETROV, V.A., VLADIMIROV, Y.A. 1977. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 84:125-128.
- DUKE, S.H., SCHRADER, L.E., MILLER, M.G. 1977. Low temperature effects on soybean (*Glicine max* [L.] Merr. cv. Wells) mitochondrial respiration and several dehydrogenases during imbibition and germination. *Plant Physiol.* 60:716-722.
- ELSTNER, E.F., OSWALD, W. 1994. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proc. Royal Soc. Edinburg* 102B:131-154.
- EVANS, W.H., GRAHAM, J.M. 1989. Membrane structure and function. IRL Press, Oxford, 86p.
- FOYER, C., HALLIWELL, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21-25.

- FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92:696-717.
- FRISCHKNECHT, P.M., ELLER, B.M., BAUMANN, T.W. 1982. Purine alkaloid formation and CO₂ gas exchange in dependence of development and environmental factors in leaves of *Coffea arabica* L. *Planta* 156:295-301.
- GAFFNEY, B.J. 1976. Practical considerations for the calculation of order parameters for fatty acid or phospholipid spin labels in membranes. IN: *Spin Labelling Theory and Applications*. L.J. Berliner, Academic Press, New York, pp.567-571.
- GRAHAM, D., PATTERSON, B.D. 1982. Responses of plants to low, non freezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:347-372.
- GRENTHE, I., OTS, H., GINSTRUP, O. 1970. A calorimetric determination of the enthalpy of protonation of THAM at 5, 20, 25, 35, and 50°C. *Acta Chem. Scand.* 24:1067-1080.
- GUTTERIDGE, J.M.C., HALLIWELL, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15:129-138.
- HANSEN, L.D., LEWIS, E.A., EATOUGH, D.J., FOWLER, D.P., CRIDDLE, R.S. 1989. Prediction of long-term growth rates of larch clones by calorimetric measurement of metabolic heat rates. *Can. J. For. Res.* 19:606-611.

- HANSEN, L.D., WOODWARD, R.A., BREINDENBACH, R.W., CRIDDLE, R.S. 1992. Dark metabolic heat rates and integrated growth rates of coast redwood clones are correlated. *Therm. Acta* 211:21-32.
- HERNER, R.C. 1990. The effects of chilling temperatures during seed germination and early seedling growth. IN: *Chilling Injury of Horticultural Crops*. C. V. Wang, ed., Edition, CRC Press, Boca Raton FL, pp.51-69.
- HOSSAIN, M.A., NAKANO, Y., ASADA, K. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiol.* 25:385-395.
- IRIGOYEN, J.J., EMERICH, D.W., SÁNCHEZ-DÍAZ, M. 1992. Alfafa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiol. Plant.* 84:67-72.
- JAHNKE, L.S., HULL, M.R., LONG, S.P. Chilling stress and oxygen metabolizing enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Envir.* 14:97-104.
- KOSTER, K.L. TENGBE, M.A., FURTULA, V., NOTHNAGEL, E.A. 1994. Effects of low temperature on lateral diffusion in plasma membranes on maize (*Zea mays* L.) root cortex protoplasts: relevance to chilling sensitivity. *Plant Cell Envir.* 17:1285-1294.

- KRAUS, T.E., McKERSIE, B.D., FLETCHER, R.A. 1995. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *J. Plant Physiol.* 145:570-576.
- KUBO, A., SAJI, H., TANAKA, K., KONDO, N. 1995. Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Mol. Biol.* 29:479-489.
- LEOPOLD, A.C., MUSGRAVE, M.E. 1979. Respiratory changes with chilling injury of soybeans. *Plant Physiol.* 64:702-705.
- LEPRINCE, O., ATHERTON, N.M., DELTOUR, R., HENDRY, G.A.F. 1994. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. An electron paramagnetic resonance study. *Plant Physiol.* 104:1333-1339.
- LEVITT, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1, Academic Press, London, 497p.
- LIKHTENSHEIN, G.I. 1976. Spin labeling methods in molecular biology, John Wiley & Sons, New York, 341 p.
- LOOMIS, W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Meth. Enzym.* 31:528-544.
- LOVRIEN, R., WILLIAMS, K.K., FERREY, M.K., AMMEND, D.A. 1989. Calorimetric versus growth microbial analysis of cellulase enzymes acting on cellulose. *App. Environ. Microb.* 53:2935-2941.

- LURIE, S., RONEN, R., LIPSKER, Z., ALONI, B. 1994. Effects of paclobutrazol and chilling temperatures on lipids, antioxidants and ATPase activity of plasma membrane isolated from green bell pepper fruits. *Physiol. Plant.* 91:593-598.
- LYONS, J.M. 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:445-466.
- LYONS, J.M., BREINDENBACH, R.W. 1979. Strategies for altering chilling sensitivity as a limiting factor in crop production. IN: *Stress physiology in crop plants* (H. Mussell and R.C. Staples, eds.), John Wiley & Sons, New York, pp.179-195.
- MAESTRI, M., BARROS, R.S. 1977. Coffee. IN: *Ecophysiology of Tropical Crops*, P.T. Alvim and T.T. Kozlowski, eds., Academic Press, New York, pp. 249-278.
- MARES-GUIA, M., NASCIMENTO, V.V., LOVRIEN, R., MELO, M.N. 1990. Microcalorimetric determination of glucose utilization by *Leishmania*. *Therm. Acta* 172:203-211.
- MCLEAN, L.R., HAGAMAN, K.A. 1992. Effect of lipid physical state on the rate of peroxidation of liposomes. *Free Rad. Biol. Medic.* 12:113-119.
- MEHLHORN, H., LELANDAIS, M., KORTH, H.G., FOYER, C.H. 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett.* 378:203-206.

- MINCHIN, A., SIMON, E.W. 1973. Chilling injury in cucumber leaves in relation to temperature. J. Exp. Bot. 24:1231-1235.
- MOYNIHAN, M.R., ORDENTLICH, A., RASKIN, I. 1995. Chilling-induced heat evolution in plants. Plant Physiol. 108:995-999.
- NAKANO, Y., ASADA, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22:867-880.
- NASCIMENTO, V.V. 1992. Estudo da utilização de carboidratos por promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis*, através de microcalorimetria de condução. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, tese de Mestrado.
- NICKERSON, R.G., TWORKOSKI, T.J., LUSTER, D.G. 1993. *Colletotrichum coccodes* and thidiazuron alter specific peroxidase activities in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). Physiol. Mol. Plant Pathol. 43:47-56.
- NISHIDA, I., MURATA, N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 47:541-568.
- PAUL, M.J., LAWLOR, D.W., DRISCOLL, S.P. 1990. The effect of temperature on photosynthesis and carbon fluxes in sunflower and rape. J. Exp. Bot. 41:547-555.
- PENNING DE VRIES, F.W.T. 1975. The cost of maintenance processes in plant cells. Ann. Bot. 39:77-92.

- POLLE, A., RENNENBERG, H. 1993. Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. IN: Plant adaptation to environmental stress (L.Fowden, T. Mansfield, and J. Stoddart, eds., Edition, Chapman & Hall, London, pp.263-273.
- PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D., MARTIN, B.A., STEWART, C.R. 1994a. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D., STEWART, C.R. 1994b. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. *Plant Physiol.* 105:619-627.
- PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D., STEWART, C.R. 1995. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. *Plant Physiol.* 108:1597-1605.
- PUNTARULO, S., GALLEANO, M., SANCHEZ, R.A., BOVERIS, A. 1991. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Bioch. Biophys. Acta* 1074:277-283.
- PURVIS, A.C., SHEWFELT, R.L. 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol. Plant.* 88:712-718.

- SCHWANZ, P., PICON, C., VIVIN, P., DREYER, E., GUEHL, J-M., POLLE, A. 1996. Responses of antioxidative systems to drought stress in pendunculate oak and maritime pine as modulated by elevated CO₂. *Plant Physiol.* 110:393-402.
- SHAW, B.P. 1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biol. Plant.* 37:587-596.
- SIMON, I. 1979. Differences in membrane unsaturated fatty acids and electron spin resonance in different types of myeloid leukemia cell. *Biochim. Biophys. Acta* 556-408-442.
- SOBCZYK, E.A., MARSZALEK, A., KACPERSKA, A. 1985. ATP involvement in plant tissue responses to low temperature. *Physiol. Plant.* 63:399-405.
- STEWART, C.R., MARTIN, B.A., REDING, L., CERWICK, 1990. Respiration and alternative oxidase in corn seedling tissues during germination at different temperatures. *Plant Physiol.* 92:755-760.
- SUBCZYNSKI, W., MARKOWSKA, G., GRUSZECKI, W.I., SIELEWIESIVK, J. 1992. Effects of polar carotenoids on dimyristoyl phosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochim. Biophys. Acta* 1105:97-108.
- TING, C.S., OWENS, T.G., WOLFE, D.W. 1991. Seedling growth and chilling stress effects on photosynthesis in chilling-sensitive and chilling-tolerant cultivars of *Zea mays*. *J. Plant. Physiol.* 137:559-564.

- WADSÖ, I. 1970. Microcalorimeters. *Quart. Rev. Biophys.* 3:383-427.
- WANG, D.I.C., COONEY, C.I., DEMAINE, A.L., DUNHILL, P., HUMPHREY, A.E., LILLY, M.D. 1979. Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Sons, New York, 184p.
- WATANABE, H., KOBAYASHI, A., YAMAMOTO, T., SUZUKI, S., HAYASHI, H., YAMAZAKI, N. 1990. Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. *Free Rad. Biol. Medic.* 9:507-514.
- WINKLER, B.S., ORSELLI, S.M., REX, T.S. 1994. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Rad. Biol. Medic.* 17:333-349.
- ZHANG, J., KIRKHAM, M.B. 1996. Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants. *Plant Sci.* 113:139-147.