

METABOLISMO ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE *ALTERNANTHERA TENELLA* COLLA SUBMETIDAS À ALTAS CONCENTRAÇÕES DE COBRE

MAURÍCIO CARLOS FLORES¹; hexamau@gmail.com; CRISTINA COPSTEIN CUCHIARA¹ ccuchara@hotmail.com; ILISANDRA ZANANDREA¹ izanandrea@hotmail.com; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA¹; eugenia.j.braga@hotmail.com JOSÉ ANTONIO PETERS^{1,2} japeters1@hotmail.com

¹Laboratório de Cultura de Tecidos, UFPel, Instituto de Biologia, Depto. Botânica, Campus Universitário S/N. Capão do Leão, RS. CEP: 96160-000 – pentamau@yahoo.com.br

²Professor orientador – japeters1@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um metal de transição, redox ativo e essencial para as plantas, bem como para todos os organismos vivos. As plantas necessitam desse nutriente, predominantemente do solo, para manter o crescimento e o desenvolvimento normal, e assegurar o cumprimento dos ciclos de vida. No entanto, nas últimas décadas, as atividades agrícolas e industriais tem contribuído para o aumento da sua ocorrência no ecossistema (YRUELA, 2009).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^*), são continuamente produzidas em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos durante o metabolismo normal da planta. Entretanto, a produção e remoção destas EROs são extremamente controladas (SHI-SENG, 2007), sendo esse equilíbrio alterado por diversos fatores estressantes, como por exemplo, o excesso da absorção de Cu. Nessa condição, a planta ativa o sistema antioxidante enzimático, aumentando a atividade de enzimas como a SOD (superóxidodismutase), CAT (catalase) e APX (ascorbatoperoxidase) (MITTLER, 2002).

Alternanthera tenella Colla, conhecida popularmente como apaga-fogo, e pertencente à família Amaranthaceae e, assim como outras plantas da mesma família, apresentam betalaínas na sua composição química (FERREIRA et al., 2003). As betalaínas podem ser divididas em betacianinas e betaxantinas, utilizadas na medicina popular e na indústria como corantes e conservantes antioxidantes (VOLP et al., 2009). Pesquisas atuais tem relacionado altas concentrações de Cu com o aumento da produção de metabólitos secundários, como betalaínas, e como consequência, retardo no crescimento e alterações fisiológicas (PEROTTI et al., 2010).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade das enzimas antioxidantes em plantas de *A. tenella* submetidas a diferentes concentrações de Cu.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de *A. tenella*, estabelecidas e multiplicadas *in vitro*

e aclimatizadas durante quinze dias em sala de crescimento, sob densidade de fluxo de fótons de $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. Posteriormente, as plantas foram transferidas para um sistema hidropônico e cultivadas em solução nutritiva completa de HOAGLAND; ARNON (1938) por três dias. No quarto dia, as plantas foram submetidas aos diferentes concentrações de Cu, por meio do uso da solução nutritiva acima citada contendo as seguintes concentrações de Cu: 0,041 (controle); 0,082; 0,164; 0,246 e 0,328 mM, na forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), permanecendo nas mesmas condições de densidade de fluxo de fótons e fotoperíodo por treze dias. As soluções foram renovadas a cada três dias e, no décimo terceiro dia de exposição aos tratamentos, folhas e raízes foram coletadas e avaliadas quanto à atividade das enzimas antioxidantes.

Para isso, ± 200 mg de matéria fresca de folhas e raízes foi macerado em N_2 , acrescido de 20% de PVPP (polivinilpirrolidona) e homogeneizado com 1,8 mL de meio de extração (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 20 mM). O homogenato foi centrifugado a 13.000 RPM por 20 minutos (4°C) e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de BRADFORD (1976).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) no meio de reação (fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; metionina 14 mM; EDTA 0,1 μM ; NBT 75 μM e riboflavina 2 μM). Uma unidade da SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio. Os resultados foram expressos em $\text{U} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada segundo NAKANO; ASADA (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato (ASA) a 290 nm. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H_2O_2 0,1 mM e extrato enzimático. O decréscimo na absorvância foi monitorado por um minuto e meio e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol ASA min}^{-1}\text{mg prote\u00edna}^{-1}$.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme descrito por AZEVEDO et al. (1998). O extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM) e a atividade da enzima foi monitorada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, durante um minuto e meio. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1}\text{mg de prote\u00edna}^{-1}$.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado constituído de cinco doses de Cu como níveis do fator tratamento (0,041; 0,082; 0,164; 0,246 e 0,328 mM) e quatro repetições (quatro plantas por repetição). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância por meio do programa Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A enzima SOD (Figura 1A), considerada a primeira linha de defesa antioxidante, tanto nas folhas quanto nas raízes, não apresentou diferença estatística significativa nos diferentes tratamentos com Cu ($p > 0,05$). Essa enzima tem a função de dismutar $\text{O}_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , conferindo proteção incompleta da célula e refletindo o funcionamento da mesma (SHI-SENG, 2007).

A atividade das enzimas APX e CAT (Figura 1B e 1C) aumentou com o incremento das concentrações de Cu, porém foram mais marcantes no sistema radicular das plantas de *A. tenella* do que na parte aérea. O aumento da atividade de APX e CAT serve para manter estáveis os níveis de H_2O_2 . O H_2O_2 , precursor de OH^+ , é altamente tóxico e necessita ser degradado pela CAT e APX. A atividade da APX justifica a manutenção dos níveis de H_2O_2 como sinalizadores do estresse, já que esta enzima tem maior afinidade pelo H_2O_2 do que a CAT. A CAT, a segunda enzima a atuar na remoção do H_2O_2 quando este está em maior quantidade na célula, também é responsável por remover o H_2O_2 gerado na via fotorrespiratória dentro dos peroxissomos (MITTLER, 2002).

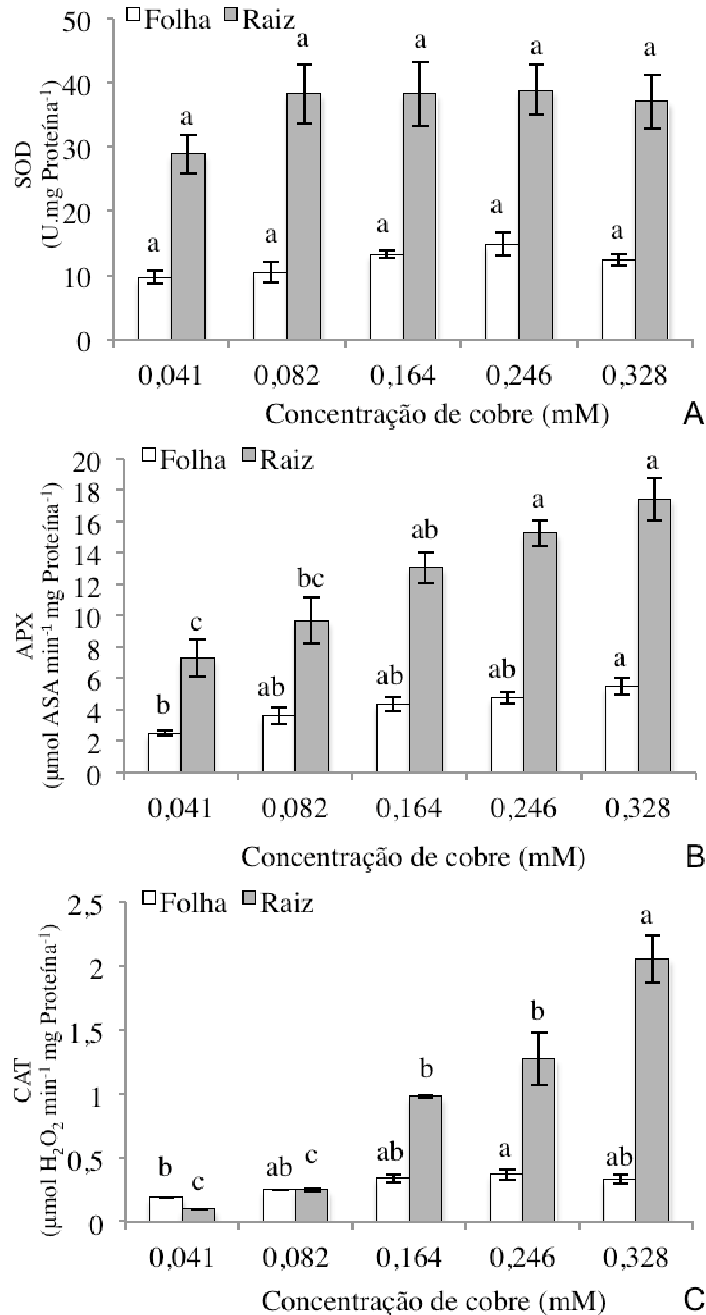


Figura 1. Efeito do excesso de cobre (Cu) sobre os parâmetros bioquímicos em plantas de *Alternanthera tenella*: (a) Ascorbatoperoxidase (APX); (b) Catalase e (CAT); (c) Superóxidodismutase (SOD). Medias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) dentro de cada característica avaliada \pm SE, $n = 20$.

CONCLUSÃO

O aumento das concentrações de Cu não compromete a sobrevivência das plantas de *A. tenella*, devido à ativação do sistema antioxidante, mais pronunciado nas raízes, como forma de proteção ao estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280- 292, 1998.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 48-254, 1976.
- FERREIRA, E. A.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, E. A. M.; RUFINO, R. J. N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV-*Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphorbia heterophylla*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 263-271, 2003.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1997.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley, California, University of California College of Agriculture, Agricultural Experimental Station. Circular 347, 1938. p. 1–39.
- MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **WinStat – Sistema de Análise Estatística para Windows versão 1.0**. Universidade Federal de Pelotas, 2007.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 405–410, 2002.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.
- PEROTTI, J.C.; RODRIGUES, I.C.S.; KLEINOWSKI, A.M.; RIBEIRO, M.V.; EINHARDT, A.M.; PETERS, J.A.; BACARIN, M.A.; BRAGA, E.J.B. Produção de betacianina em erva-de-jacaré cultivada *in vitro* com diferentes concentrações de sulfato de cobre. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.1874-1880, 2010.
- SHI-SHENG, K. Effects of Copper on the Photosynthesis and Oxidative Metabolism of *Amaranthus tricolor* Seedlings. **Agricultural Sciences in China**, v.6, n.10, p.1182-1192, 2007.
- VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.
- YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, v.36, p.409-430, 2009.