

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO**

**RAIMUNDO ARAÚJO FILHO**

**AÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RESPOSTA A  
PROCESSOS DEGRADATIVOS DE LIPÍDEOS POLARES EM  
FOLHAS DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP SUBMETIDAS À  
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

**FORTALEZA - 2004**

**Raimundo Araújo Filho**

**AÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RESPOSTA A  
PROCESSOS DEGRADATIVOS DE LIPÍDEOS POLARES EM  
FOLHAS DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP SUBMETIDAS À  
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

**Tese submetida à Coordenação  
do Curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica, da Universidade  
Federal do Ceará, como  
requisito parcial para obtenção  
do grau de Doutor em  
Bioquímica .**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando  
Monteiro de Paula**

**FORTALEZA  
2004**

A689a Araujo Filho, Raimundo

2004 Ação de enzimas antioxidantes em resposta a processos degradativos de lipídeos polares em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) walp submetidas à deficiência hídrica/ Raimundo Araujo Filho. - Fortaleza: 2004

152f.: il.

Orientador: Fernando Monteiro de Paula

Tese (Doutorado) em Bioquímica

1.Status hídrico . 2. . Lipídios polares. 3.Enzimas antioxidantes. 4. *Vigna unguiculata*(L) walp. I.

Universidade Federal do Ceará. II. Título.

C.D.D. 574.192

RAIMUNDO ARAUJO FILHO

**AÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RESPOSTA A  
PROCESSOS DEGRADATIVOS DE LIPÍDEOS POLARES EM  
FOLHAS DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP SUBMETIDAS À  
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

Tese submetida à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica, da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Bioquímica

TESE APROVADA EM

**COMISSÃO JULGADORA:**

---

**Fernando Monteiro de Paula, Dr.**  
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular/ UFC  
Orientador

---

**Renato Azevedo Moreira, Dr.**  
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular/ UFC

---

**Maria Erivalda Farias de Aragão, Dra.**  
Depto. de Biologia/ UECE

---

**José Everardo Xavier de Matos, Dr.**  
Centro de Ciências / UNIFOR

---

**Carlos Dias da Silva Júnior, Dr.**  
Centro de Ciências / UNIFOR

**A DEUS**

**Fonte de toda existência e sabedoria**

**AOS MEUS PAIS (*in memoriam*)**

**Que souberam me orientar o caminho da verdade e do saber**

**(*in memoriam*) AOS MEUS IRMÃOS**

**Antônio gonçalves e Socorro gonçalves**

**AOS MEUS IRMÃOS**

**Pelo apoio constante ao longo de minha vida.**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, como orientador espiritual, dou-vos infinitas graças pela proteção neste processo de crescimento científico, guiando-me nos momentos de dificuldade.

A Prof. Dr. Fernando Monteiro de Paula pelo estímulo e apoio na orientação e execução deste trabalho. Pela amizade e confiança depositada, os meus sinceros agradecimentos.

A Profa. Dra. Maria Baccache Ary pelo apoio e amizade no decorrer desta Tese.

Aos colegas de laboratório Micheline, Eliane, Flávio, Rômulo, Neuza, Mirelle, Daniella, pela amizade e apoio.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação pela amizade e bons momentos passados juntos.

A Universidade de Fortaleza (UNIFOR), à CAPES, ao CNPq e FUNCAP, pelo apoio dado. Ao PADETEC pelas análises dos extratos de lipídeos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para execução desta produção.

## SUMÁRIO

|   |       |
|---|-------|
| LISTA DE TABELAS  | ix    |
| LISTA DE FIGURAS  | xi    |
| ABREVIATURAS  | xiv   |
| RESUMO  | xvi   |
| ABSTRACT  | xviii |
| I INTRODUÇÃO  | 01    |
| II REVISÃO DE LITERATURA  | 04    |
| 1 - Aspectos gerais da <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp  | 04    |
| 2. Comportamento das plantas em condições de déficit hídrico                                    | 08    |
| 3 - Tolerância protoplasmática  | 11    |
| 4 - Resistência das Membranas Celulares   | 12    |
| 5 - Ajustamento osmótico  | 15    |
| 6 - Alterações nos níveis de lipídeos polares das membranas celulares                           | 18    |
| 7 - Alterações das membranas celulares em resposta as modificações nos teores dos Ácidos Graxos | 21    |
| 8 - Peroxidação dos Lipídeos Membranares e mecanismos de formação de radicais livres            | 23    |
| 9 - Efeitos dos radicais livres no metabolismo vegetal  | 27    |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 9.1.  | Superóxido Dismutase (Dismutases de Superóxidos)  | 30 |
| 9.2.  | Catalase  | 32 |
| 9.3.  | Peroxidase de fenóis  | 34 |
| 9.4.  | Peroxidase do ascorbato (APX)   | 36 |
|       | Hipóteses   | 38 |
|       | Estratégias   | 38 |
| III - | MATERIAL E MÉTODOS- EXPERIMENTO I   | 40 |
| 1.    | Material vegetal  | 40 |
| 2 -   | Métodos   | 41 |
| 2.1 - | Condições de Cultivo  | 41 |
| 2.2 - | Avaliação do <i>status</i> hídrico das plantas  | 42 |
| 2.3 - | Avaliação do <i>status</i> da membranas   | 42 |
| 2.4 - | Extração de lipídeos  | 44 |
| 2.5 - | Carboidratos solúveis   | 44 |
| IV -  | RESULTADOS E DISCUSSÃO EXPERIMENTO I  | 46 |
| 1 -   | Avaliação do <i>status</i> hídrico das plantas  | 46 |
| 2 -   | Teor de Galactose presente nos Galactolipídeos  | 50 |
| 3 -   | Avaliação da resistência membranas e da percentagem<br>de danos através de teste de perdas de eletrólitos | 53 |
| 4 -   | Teor de Lipídeos Totais   | 58 |
| V -   | RESULTADOS E DISCUSSÃO EXPERIMENTO II   | 62 |
| 1.    | Material vegetal  | 62 |
| 2.    | Condições de Cultivo  | 62 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.    | Extração de lipídeos   | 63  |
| 4.    | Teor de Lipídeos Peroxidados   | 64  |
| 5.    | Teor de ácidos graxos totais   | 65  |
| 6.    | Análise das Diferentes Categorias Lipídicas  | 65  |
| 7.    | Ensaio Enzimático  | 66  |
| 7.1 - | Ensaio de atividades da Superóxido Dismutase<br>(Dismutase de Superóxido)            | 67  |
| 7.2-  | Ensaio de atividades da Catalase   | 68  |
| 7.3 - | Ensaio de atividades da Peroxidase de Fenóis   | 68  |
| 7.4 - | Ensaio de atividades da Ascorbato Peroxidase   | 69  |
|       | RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO II   | 70  |
| 1.    | Teor de Lipídeos Peroxidados   | 70  |
| 2 -   | Teor de ácidos graxos totais   | 73  |
| 3 -   | Análise das Diferentes Categorias Lipídicas  | 79  |
| 4.    | Índice de Insaturação dos Ácidos Graxos Totais e das<br>Principais Classes Lipídicas | 91  |
| 5.    | Análise de atividade das diferentes enzimas<br>antioxidativas                        | 99  |
|       | Discussão Geral  | 110 |
|       | Referências Bibliográficas   | 116 |

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 01</b> – Características botânicas e agronômicas das quatro cultivares avaliadas.   | 40 |
| <b>Tabela 02</b> – Potencial Hídrico em MPa de quatro cultivares de feijão-de-corda submetida a ciclos de deficiência hídrica seguido de reidratação durante o ciclo fenológico.  | 48 |
| <b>Tabela 03</b> – Percentagem de Danos (PD) em plantas de feijão-de-corda, submetida à deficiência hídrica do solo, considerando a percentagem de integridade absoluta de plantas hidratada (PIA $-0,3$ Mpa), estressadas de (PIA $-0,6$ Mpa), (PIA $-1,5$ Mpa) e reidratadas. | 54 |
| <b>Tabela 4</b> – Percentagem de Danos (PD) em plantas de feijão-de-corda irrigadas, considerando a percentagem de integridade absoluta do dia zero de cultivo (PIA $D_0$ e o ultimo dia de estresse PIA $D_f$ , durante o ciclo fenológico).                                   | 57 |
| <b>Tabela 5</b> – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para MGDG, DGDG, em folhas de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp) para o cultivar EPACE-10.   | 86 |
| <b>Tabela 6</b> – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para LN, PC e PL, em folhas de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp) para o cultivar EPACE-10.  | 87 |
| <b>Tabela 7</b> – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para MGDG, DGDG, em folhas de feijão-de-corda   | 88 |

(*Vigna unguiculata* L. Walp) para o cultivar EPACE-11.

**Tabela 8** – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para LN, PC e PL, em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para o cultivar EPACE-11.

89

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Evolução do Potencial Hídrico em plantas de feijão-de-corda (*VignaUnguiculata* L. Walp) mantidas irrigadas 47
- Figura 02** – Evolução do potencial hídrico em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L.Walp) submetida a deficiência hídrica do solo 47
- Figura 03** – Teor de galactose do extrato de lipídeos totais em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, para os cultivares Epace 10 e Epace 11 (A), Epace 1 e BR Piaui )B). 51
- Figura 4** - Percentagem de danos %PD em cultivares de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) submetidas à deficiência hídrica do solo. 53
- Figura 5-a** – Teor de Lipídeos totais (mg/gMF) em folhas de plantas irrigadas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp). 59
- Figura 5-b** – Teor de Lipídeos totais (mg/gMF) em folhas de plantas irrigadas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp). 59
- Figura 6** – Teor de lipídeos peroxidados, medidos pela formação do complexo MDA-TBA, em folhas de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 11B) 71
- Figure 7** – Teor de Ácidos graxos (%) em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cv. Epace-10 sob condições de déficit hídrico, aos 15 dias de estresse (A), aos 21 dias de estresse (B) e 48 horas após a reidratação, aos 23 dias (C). 75

- Figure 8** – Teor de Ácidos graxos (%) em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cv. Epace-11 sob condições de déficit hídrico, aos 15 dias de estresse (A), aos 21 dias de estresse (B) e 48 horas após a reidratação, aos 23 dias (C). 76
- Figura 9** - Diferentes categorias lipídicas presentes nos extratos de lipídeos totais, após separação por CCM, em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para os cultivares Epace-10 (A) e Epace-11 (B). 80
- Figura 10** - Índice de Insaturação dos Ácidos Graxos Totais para as cultivares Epace-10 e Epace-11 em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp). 94
- Figura 11** - Índice de Insaturação, em porcentagem, em MGDG e PC, partir de extratos lipofílicos de folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para os cultivares Epace-10 (A) e Epace-11 (B). 96
- Figura 12** – Atividade específica da enzima SOD em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 100
- Figura 13** – Atividade específica da enzima CAT em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 103
- Figura 14** – Atividade específica da enzima APX em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 105

**Figura 15** – Atividade específica da enzima peroxidase dos fenóis em 107  
folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Waip), para  
os cultivares Epace 10 e Epace 11.

**ABREVIATURAS**

|             |  |
|-------------|--|
| <b>APX</b>  | <b>Ascorbato peroxidase</b>            |
| <b>CAT</b>  | <b>Catalase</b>                        |
| <b>CL</b>   | <b>Lipídios concentrados</b>           |
| <b>CT</b>   | <b>Total concentrado</b>               |
| <b>CTL</b>  | <b>Concentração de lipídios totais</b> |
| <b>GL</b>   | <b>Galactolipídeos</b>                 |
| <b>DAG</b>  | <b>Diacilglicerol</b>                  |
| <b>LN</b>   | <b>Lipídios neutros</b>                |
| <b>DGDG</b> | <b>Digalactosil diacilglicerol</b>     |
| <b>MAG</b>  | <b>Monoacilglicerol</b>                |
| <b>MGDG</b> | <b>Monogalactosil diacilglicerol</b>   |
| <b>PC</b>   | <b>Fosfatidil Colina</b>               |
| <b>PG</b>   | <b>fosfatidil Glicerol</b>             |
| <b>PE</b>   | <b>Fosfatidil Etanolamina</b>          |
| <b>PI</b>   | <b>Fosfatidil Inositol</b>             |
| <b>PL</b>   | <b>Fosfolipídeos</b>                   |
| <b>POX</b>  | <b>Peroxidase dos fenóis</b>           |
| <b>PS</b>   | <b>Fosfatidil Serina</b>               |
| <b>ROS</b>  | <b>Espécies Reativas de Oxigênio</b>   |
| <b>TAG</b>  | <b>Triacilglicerol</b>                 |

|            |                              |
|------------|------------------------------|
| <b>TBA</b> | <b>Ácido Tio-barbitúrico</b> |
| <b>TCA</b> | <b>Ácido Tricloroacético</b> |
| <b>SOD</b> | <b>Superóxido dismutase</b>  |
| <b>SL</b>  | <b>Esfingolípidos</b>        |

## RESUMO

O gênero *Vigna* é uma das leguminosas melhor adaptadas às regiões quentes. Exercendo uma efetiva participação na dieta alimentar da população, por constituir-se em excelente fonte de proteínas e carboidratos de baixo custo. O estresse hídrico é um dos grandes problemas da agricultura mundial, provocando inibições no crescimento e produtividade em diferentes culturas. Este trabalho teve como objetivos analisar vários parâmetros a partir de quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp em duas etapas, denominadas de Experimento I e Experimento II. No experimento I os cultivares Epace 10, Epace 11, Epace 1 e BR 10 Piauí foram analisados em parâmetros fisiológicos, como *status* hídrico, resistência de membranas celulares e lipídeos membranares totais. No Experimento II, apenas os cultivares Epace 10 e Epace 11 foram estudados, em virtude dos outros dois cultivares não terem apresentados um comportamento bem definido em relação a deficiência hídrica no Experimento I. No Experimento II aspectos bioquímicos, tais como o teor de lipídeos peroxidados, ácidos graxos totais, diferentes categorias lipídicas, índice de insaturação e análise das diferentes enzimas antioxidantes foram analisados. No estudo do *status* hídrico foi observado uma menor tolerância do cultivar Epace 11 e uma maior tolerância do Epace 10. Os cultivares Epace 1 e BR 10 Piauí não tiveram um comportamento bem definido em relação ao estresse hídrico e a resistência membranares. O cultivar Epace 11 apresentou elevados danos em suas membranas e teve também seus teores de lipídeos totais reduzidos de forma mais importantes que os demais cultivares. Mesmo após a reirrigação, este cultivar apresentou um grande decréscimo em relação ao

controle, principalmente devido a uma redução de lipídeos plastidiais, como o monogalactosil diacilglicerol (MGDG) e o digalactosil diacilglicerol (DGDG). Os teores de ácidos graxos totais também confirmaram a tendência anteriormente observada para Epace 11. Na etapa que trata da análise das atividades de enzimas antioxidativas (SOD, CAT, APX e POX), foi observado em Epace 11 um aumento pronunciado de SOD em resposta aos diferentes níveis de deficiência hídrica, enquanto a atividade específica da CAT, decresceu gradativamente, em relação ao tratamento controle. As plantas submetidas à deficiência hídrica, dos dois cultivares estudados, apresentaram atividade da enzima APX superior aos tratamentos controle e a atividade da enzima peroxidase dos fenóis (POX) mostrou ser mais elevada para o cultivar Epace 11 quando comparada com Epace 10. Os resultados obtidos neste trabalho tanto na análise dos lipídeos, ácidos graxos e índice de insaturação, como na atividade das diferentes enzimas do sistema de destoxificação nos dois cultivares estudados, evidenciaram uma menor tolerância do cultivar Epace 11, em relação a Epace 10, à ação do déficit hídrico. A degradação acentuada dos ácidos graxos poliinsaturados, a redução do índice de insaturação, a menor atividade das enzimas de destoxificação e a maior atividade da enzima peroxidase dos fenóis, em Epace 11, confirmam a maior vulnerabilidade deste cultivar. Portanto, uma correlação negativa pode ser estabelecida entre os diferentes parâmetros analisados para Epace 11, a integridade membranar e conseqüentemente o próprio metabolismo celular.

## ABSTRACT

The cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp is one of the best adapted legume to tropical areas. This plant has an effective participation in the diet of the population, since it is an excellent source of proteins and has low cost carbohydrates. The water stress is one of the great problems of the world agriculture, inducing inhibitions in the growth and productivity in different cultures. This work had the objective to analyze several parameters starting from four cultivars of *Vigna unguiculata* (L.) Walp in two stages, denominated of experiment I and II. In the experiment I the cultivars Epace 10, Epace 11, Epace 1 and BR 10 Piauí were analyzed in physiologic parameters, as water status, resistance of cellular membranes and total lipid membrane. In the experiment II, only the cultivars Epace 10 and Epace 11 were studied, because the others two cultivars did not present a very defined behaviour in relation to water deficiency in the experiment I. In the experiment II biochemical aspects, such as the contents of peroxidated lipids, total fatty acids, different categories of lipids, insaturation index and the different antioxidant enzymes were analyzed. In the study of the water status a smaller tolerance was observed of the cultivar Epace 11 and a highest tolerance of Epace 10. The cultivars Epace 1 and BR 10 Piauí did not have a very defined behaviour in relation to the water stress and the membrane resistance. The cultivar Epace 11 presented high damages in his membranes and had also contents of reduced total lipids in a way more important than the others cultivars. Even after the reirrigations, this cultivar presented a great decrease in relation to

the control, mainly due to reduction of plastidial lipids, as the monogalactosil diacylglycerol (MGDG) and the digalactosil diacylglycerol (DGDG). The contents of total fatty acids also confirmed the tendency observed previously for EPACE 11. In this stage the analysis of the activities of enzymes antioxidatives (SOD, CAT, APX and POX), it was observed in Epace 11 a pronounced increase of SOD in response to the different levels of water deficiency, while the specific activity of CAT decreased, in relation to the control treatment. In the plants submitted to the water deficiency, two of the cultivar studied EPACE 10 and EPACE 11, presented activity of the enzyme APX higher than the control treatments and the activity of the phenol peroxidase (POX) showed to be higher for cultivar Epace 11 when compared with Epace 10. The results obtained in this work, in the analysis of the lipids, fatty acids and insaturation index, as in the activity of the different enzymes of the detoxification system in the two cultivars studied, suggest a smaller tolerance of cultivar Epace 11, in relation to Epace 10, to the water stress. The accentuated degradation of the polyunsaturated fatty acids, the reduction of the index insaturation, the smallest activity of the detoxification enzymes and the largest activity of the enzyme peroxidase of the phenols, in Epace 11, confirm the highest vulnerability of this cultivar. Therefore, a negative correlation can be established among the different parameters analyzed for Epace 11, the membrane integrity and consequently the own cellular metabolism.

## I - INTRODUÇÃO

Dos fatores ambientais, a escassez de água destaca-se como um dos mais fortes elementos que limitam a expressão genética das plantas, e a produtividade agrícola. Normalmente, nesses ecossistemas a falta de água também é acompanhada de temperaturas elevadas. O déficit hídrico se instala nas plantas quando a perda em água excede sua capacidade de absorção através do sistema radicular (OLIVEIRA, 2002).

Em resposta a essas condições, determinadas espécies vegetais adaptam-se, através mecanismos que possibilitam a sua sobrevivência. Contudo, sabe-se que normalmente quase todos os mecanismos que possibilitam a adaptação à seca, acabam por prejudicar direta ou indiretamente as atividades metabólicas e, por conseguinte, a produção. Entretanto, a busca de materiais e a compreensão dos mecanismos de adaptação, são uma questão fundamental nessa área.

Durante muito tempo, os esforços foram direcionados no sentido de identificar as bases fisiológicas e bioquímicas dos mecanismos em resposta aos diferentes tipos de estresses. Mais recentemente, nova abordagem está sendo direcionada no sentido de também identificar as bases moleculares dos diferentes mecanismos de resistência à seca.

As atividades metabólicas de plantas são profundamente mudadas sob injúria, ou quando submetidas a estresses bióticos e abióticos de uma forma geral. Plantas respondem a esses agentes alterando seu metabolismo celular e invocando vários mecanismos de defesa (ENYEDI *et al.*, 1992; MEHDY, 1994). Sobrevivência sob estas condições estressantes depende da habilidade da

planta para perceber o estímulo, gerar e transmitir sinais, e instigar mudanças bioquímicas que, conseqüentemente, ajustem o seu metabolismo (ENYEDI *et al.*, 1992).

Diversas culturas têm sido objeto de amplos estudos, por serem tipicamente cultivadas em regiões áridas e semi-áridas. Dentre elas o feijão-de-corda, uma das mais expressivas fontes de proteína encontrada na dieta de um enorme contingente de pessoas que habita essas regiões, (STONE, 2001).

No plano do melhoramento genético vegetal, um dos grandes entraves tem sido a identificação de características que possam estar associadas a mecanismos de resistência a estresses abióticos. A associação de um caráter a um determinado tipo de estresse pode auxiliar, de forma mais rápida, a busca de novos materiais que apresentem características desejáveis ao melhoramento genético vegetal. No estudo do estresse condicionado por deficiência hídrica, seria a obtenção de plantas mais resistentes, (PIMENTEL, 2000).

Existem muito poucos trabalhos na literatura que correlacionem perdas de resistência ao déficit hídrico a reduções nos teores de lipídios polares, à diminuição do índice de insaturação, aumentos nos teores de ácidos graxos livres, níveis de peroxidação dos lipídeos e na permeabilidade das membranas celulares. Entretanto é conhecido que as membranas de tecidos clorofilados são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, principalmente em ácido linolênico (PAIS, 2003). Este ácido graxo se constitui alvo vulnerável, devido às suas ligações carbono-carbono insaturadas, às reações oxidativas induzidas pela deficiência hídrica nas células e tecidos (CAROLINO, 2003)

O objetivo desse trabalho é estudar algumas respostas bioquímicas no âmbito das membranas celulares, do metabolismo de lipídios e da atividade de diferentes enzimas de destoxificação, em dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp, quando submetidas à deficiência hídrica do solo. A existência de possíveis diferenças entre cultivares no que diz respeito a esses mecanismos teria como objetivo a identificação de indicadores com vistas à implementação de programas de melhoramento de cultivares adaptadas à região Nordeste brasileira e, mais especificamente, ao Ceará.

## II - REVISÃO DE LITERATURA

### 1 - Aspectos gerais da *Vigna unguiculata* (L) Walp

A espécie *Vigna unguiculata* (L) Walp é uma dicotiledônea que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae Lindley, sub-família Faboidae (Papilionidae), gênero *Vigna* e espécie *Vigna unguiculata* (LOPES *et al.*, 2003).

De acordo com Oliveira *et al.*, (2003), o gênero *Vigna* é uma das leguminosas mais adaptadas às regiões quentes da África, Ásia e das Américas, especificamente nas regiões tropicais e subtropicais. O número de espécies de *Vigna* não é preciso, podendo variar de 84 a 184 (MARECHAL *et al.*, 1988). A maioria dessas espécies encontra-se na África, onde 66 delas são consideradas endêmicas. Isso sugere que o gênero *Vigna* deve ter tido sua evolução ligada a esse continente.

No continente americano a introdução foi feita por colonizadores, disseminando rapidamente por todas as regiões do Brasil. O caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), chamado de feijão-macassar, feijão-fradinho, ou feijão-de-corda, constitui a principal cultura de subsistência no semi-árido brasileiro. Considerando todas as espécies e gêneros cultivados no mundo, o Brasil é o segundo maior produtor de feijão, perdendo apenas para a Índia (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) representa cerca de 15% do feijão produzido no Brasil, sendo o Nordeste a principal região produtora em escala comercial, tendo participação efetiva como fonte protéica para a subsistência de grande parte da população, refletindo desta forma sua importância local. No

restante do país é empregado, essencialmente, como forrageira (MOTA *et al.*, 2002).

O caupi ocupa 60% das áreas cultivadas com feijão e caupi no Nordeste brasileiro e representa 26,8% da área total plantada com feijão no Brasil. Esta leguminosa representa de 95% a 100% do total das áreas plantadas com feijão nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (SANTOS *et al.*, 2000). Desse modo, o caupi tem seu cultivo concentrado nas regiões nordeste e norte, que possuem climas tropicais, aos quais por sua própria origem, é bem adaptado (LIMA *et al.*, 2002).

No estado do Ceará, o feijão-caupi é cultivado em quase todas as micro-regiões, onde detém 75% das áreas de cultivo com feijão. Assim, exerce efetiva participação na dieta alimentar da população, por constituir-se em excelente fonte de proteínas e carboidratos de baixo custo (VIEIRA *et al.*, 2000). Embora considerada uma cultura tropical, compatível com as condições ecológicas locais, ainda apresenta baixa produtividade, tanto no sistema solteiro como no consorciado. Dentre as principais causas que limitam a produtividade do feijão-caupi no Nordeste, merece destaque o emprego de cultivares tradicionais com baixa capacidade produtiva, razão pela qual, admitem que o aumento de produtividade pode ser alcançado mediante a simples utilização de sementes de qualidade superior. Contudo, mesmo utilizando sementes de boa qualidade, se a cultivar for de baixo potencial genético para a produção, será baixo o rendimento. Um dos problemas associado à baixa produtividade, pode estar relacionado ao fato de que geralmente são utilizadas as mesmas cultivares tanto para produção de grãos verdes, quanto para grãos secos (BASTOS *et al.*, 2002).

O caupi pode ser consumido na forma de vagem verde, grão verde e grão seco, além de outras formas de preparo, como o acarajé, por exemplo. Na forma de vagem verde, a colheita é feita quando as vagens estão bem desenvolvidas, mas com pouca fibra. Para o consumo na forma de grão verde, as vagens são colhidas quando começam a maturar. E para produção de grão seco, as vagens são colhidas secas. Dos 40 cultivares de caupi cru, foram observadas variações para proteínas (20,41% a 26,18%), lipídeos (0,93% a 1,65%), açúcares totais (2,37% a 5,35%), cálcio (51,08 mg Ca/100 g a 141 mg Ca/100), ferro (3,04 mg Fe/100g a 7,83 mg Fe/100 g) e Fósforo (788,9 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g a 1244,4 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g). Verificaram, ainda que, na fração lipídica, cerca de 66% dos ácidos graxos são insaturados, sendo 8% oléico, 34% linoléico e 24% linolênico(SALES, *et al.*, 2001).

VENÂNCIO, *et al.*, 2003, afirma que a temperatura mais adequada para o desenvolvimento do caupi situa-se na faixa de 20 a 35°C, superior à mais adequada para o feijão-comum (ARAÚJO *et al.*, 1984). Portanto, o caupi poderia ser uma cultura mais adaptada que o feijão-comum para o cultivo de primavera-verão (cultivo "das águas") na Zona da Mata de Minas Gerais, principalmente nos municípios de baixa altitude. Em dois experimentos conduzidos na época "das águas" de 1986, no município de Viçosa, o rendimento médio de dois cultivares de caupi (EPACE-6 e CNC 434) foi de 2.522 e 1.681 kg/ha, enquanto os cultivares de feijão-comum (Fortuna e Milionário) produziram 2.126 e 1.488 kg/ha, respectivamente (VIEIRA, 1989). Vale ressaltar que Viçosa está a 640 m de altitude e que a primavera-verão de 1986 teve temperaturas relativamente amenas. É provável que em municípios de baixa altitude e, ou, em anos mais quentes, e com a disponibilidade de

cultivares mais adaptadas à região, a vantagem do caupi seja bem maior em relação ao feijão-comum. O caupi pode vir a ser de interesse econômico na Zona da Mata, visto que essa região encontra-se próxima de um grande mercado consumidor de feijão-fradinho, o Rio de Janeiro.

Além disso, por sua capacidade de se desenvolver satisfatoriamente em solos de baixa fertilidade e por sua rusticidade, o feijão-caupi é considerado uma opção como fonte de matéria orgânica. Nessa forma, é utilizado como adubo verde na recuperação de solos naturalmente pobres em fertilidade, ou esgotados pelo uso intensivo, muito comum no Nordeste. Tradicionalmente cultivado em regime de sequeiro, o caupi surge como opção para cultivo em regime irrigado no Nordeste brasileiro. Nessas áreas, é cultivado em sucessão a outra cultura de maior valor econômico, de forma a aproveitar o efeito residual da adubação e uma menor oferta do produto em algumas épocas do ano (CASTRO *et al.*, 2003).

No mercado brasileiro existem cultivares de boa aceitação comercial. Entretanto, não há um programa nacional que vise à avaliação e recomendação de cultivares em ambientes específicos. Estudos sobre novas opções de cultivares são necessários, pois, geralmente, o produtor tem utilizado, por conta e risco, qualquer semente disponível no mercado fazendo testes empíricos para escolha de cultivares levando a muitas frustrações. A indicação de cultivares apropriadas proporcionaria maior segurança ao produtor, facilitando a obtenção de crédito e aceitação do produto no mercado. (OLIVEIRA, 2002).

Devido à existência de fatores que interferem na produção do feijão-caupi (OLIVEIRA *et al.*, 2001), observaram que o rendimento de grãos secos pode não ser o melhor critério para a seleção de cultivares superiores. Assim sendo, sugeriram que a seleção seja feita também em função de outros componentes de produção, tais como o número de vagens por planta e as produções de vagens e de grãos verdes. Em algumas regiões da Paraíba níveis baixos de produtividade têm sido constatados. Sabe-se que a baixa produtividade está associada ao plantio de cultivares tradicionais ou ao emprego de sementes de baixa qualidade agrônômica, portanto, com pouca capacidade produtiva, ademais da inexistência de programas de pesquisas sobre nutrição mineral e manejo de adubação na cultura (BASTOS *et al.*, 2002).

## **2. Comportamento das plantas em condições de déficit hídrico.**

Considera-se a seca um dos principais agentes que limitam a produtividade agrícola em todo o mundo. Além do mais, nos ecossistemas sujeitos à seca, existem normalmente estreitas relações entre a deficiência hídrica e as temperaturas elevadas. Por outro lado, sabe-se, que aquelas espécies submetidas a regiões onde o estresse hídrico ocorre com uma determinada constância estão sempre desenvolvendo mecanismos que lhes possibilitam uma maior adaptação a esses ambientes.

Segundo Daier (1996), plantas adaptadas apresentam mecanismos que evitam ou toleram a seca, reduzindo a possibilidade da desidratação celular. As mesófilas, onde se inclui a maioria das espécies cultivadas estão usualmente

expostas à condições de déficit hídrico, e predominantemente exibem tolerância à seca. O déficit hídrico afeta diversos aspectos do desenvolvimento da plantas como a anatomia, a morfologia, a fisiologia e a bioquímica (KRAMER, 1969).

Em condições de déficit hídrico, as plantas utilizam geralmente dois mecanismos de adaptação. No primeiro, denominado de mecanismo de adaptação morfológica, as plantas apresentam um maior desenvolvimento do sistema radicular tornando-o mais profundo, e reduzem a área foliar, e conseqüentemente, a perda de água pela transpiração. Já a abertura e o fechamento dos estômatos, estão relacionados a mecanismos de adaptação fisiológica. Esses mecanismos podem ser eficientes na resolução de problemas temporários de déficit hídrico e mesmo assim quando a planta possui reservas nutritivas suficientemente importantes para suportar um determinado período de seca, com uma baixa atividade fotossintética (SWINDALE e BINDINGER, 1981).

Já a resistência protoplasmática, que consiste numa maior tolerância da planta à desidratação de seus tecidos ao déficit hídrico, está relacionada a bases fisiológicas, bioquímicas e moleculares, assim como às propriedades das membranas celulares e às suas atividades enzimáticas. Essa adaptação credencia a planta a suportar determinados níveis de estresse sem sofrer uma desorganização celular.

Turner *et al.* (1986 a e b) caracterizaram a resistência à seca através de três mecanismos adaptativos. O primeiro trata-se da fuga ou escape. Nesse grupo estariam incluídas as plantas que evitam a desidratação dos tecidos, reduzindo o seu ciclo de vida, mesmo alterando o ciclo fenológico, passando

assim ao estágio reprodutivo com mínimo desenvolvimento vegetativo. O segundo mecanismo envolve o adiamento ou retardamento da desidratação, através da manutenção da turgescência dos tecidos, alterando a morfologia ou a fisiologia da planta, como o aumento da densidade e da profundidade do sistema radicular e aumento da condutância das raízes.

Tais mecanismos resultam no aumento da absorção de água. Também podem diminuir a perda de água através da queda das folhas e redução das áreas foliar, aumento da resistência cuticular e estomatal, redução da radiação solar absorvida e ajustamento osmótico. A manutenção do volume celular é também possível, através de modificações da parede celular. O terceiro mecanismo refere-se à tolerância a desidratação, ou seja, a tolerância protoplasmática em que a planta consegue viver com um mínimo de água em seus tecidos. O limite máximo de adaptação das plantas a esse mecanismo situa-se por volta de 70% de água nos tecidos vegetais, segundo a literatura.

Mohr e Schopfer (1995) mencionam a existência de três estratégias de adaptação: tolerância voltada para o fator estresse, defesa contra o fator estresse por mecanismos protetores adequados e reversão dos efeitos do estresse por restauração do dano que tenha ocorrido. Portanto, os mecanismos de adaptação fisiológica ao estresse são essencialmente resultantes da combinação de diferentes fatores, como por exemplo, a regulação da perda hídrica pelo aparato estomático, o ajustamento osmótico e a resistência do protoplasma (PINHO, 1992).

### 3 - Tolerância protoplasmática

O estresse hídrico afeta praticamente todos os aspectos do crescimento da planta, modificando a sua anatomia, morfologia, fisiologia e a bioquímica (KRAMER, 1969).

Dentre os mecanismos de tolerância à seca a baixos níveis de potencial hídrico, destacam-se a manutenção da turgescência e a tolerância à dessecação. No primeiro caso, a planta apesar de apresentar baixos níveis de  $\psi_w$ , mantém a turgescência, através do ajustamento osmótico, ou do aumento da elasticidade da parede celular (TURNER, 1979). Na tolerância protoplasmática à dessecação, as plantas são submetidas a baixos valores de  $\psi_w$ , acompanhados de dessecação e perda de turgescência. A tolerância do protoplasma à dessecação, varia segundo a aptidão das células para resistir aos danos mecânicos, à capacidade das membranas resistir à degradação e à capacidade da membrana celular de resistir a desnaturação (GAFF, 1980). (TURNER, 1979), avaliando as respostas fisiológicas à seca em *Lolium Perenne* L., observou que durante a seca, os seus  $\psi_w$  e  $\psi_s$ , diminuíram, enquanto que  $\psi_p$  e E (elasticidade) aumentaram significativamente.

Entre os metabólitos celulares afetados pela deficiência hídrica, a glicose e a sacarose se encontram entre os principais açúcares solúveis que se acumulam em condições de deficiência hídrica (ACKERSON, 1985).

Nogueira *et al.* (2001), relata que em folhas de feijoeiro cultivado em condições de estresse, ocorre um aumento nos níveis de prolina, e esse, aumento em situação de estresse possui um efeito osmoregulador. O acúmulo da prolina ocorre em função do aumento da hidrólise de proteínas em situações

de estresse ou como resultado da conversão de açúcares na via do glutamato. Resultado que demonstra uma maior adaptação ao estresse.

Mais recentemente, alguns estudos têm evidenciado a síntese de proteínas específicas do estresse hídrico. Essas proteínas foram denominadas de *osmotinas*. Merece menção, o fato de que o ácido abscísico (ABA) além de ser conhecido por induzir o ajustamento osmótico nas células, também induz a síntese de osmotinas. No entanto, a sua acumulação é dependente da dimensão do estresse hídrico e do ajuste da célula para o estresse Nogueira *et al.* (2001).

O estresse hídrico pode provocar modificações nos lipídios e na composição de ácidos graxos nas células de plantas (CHETAL *et al.*, 1982). A manutenção da estrutura das membranas é de primordial importância para assegurar a autonomia e o correto funcionamento de várias organelas celulares (CHETAL *et al.*, 1980).

#### 4 - Resistência das Membranas Celulares

Uma redução no conteúdo hídrico celular pode induzir modificações na permeabilidade e fluidez das membranas celulares devido à desnaturação da bicamada de lipídios, presentes nas membranas. Essa injúria pode ser estimada através de testes de perdas de eletrólitos (PHAM THI *et al.*, 1990). Os autores acrescentam que os danos sofridos, ao nível de membranas, podem ser estimados através de perdas de eletrólitos, onde o aumento do fluxo de

íons ocorre em consequência de uma maior permeabilidade das membranas celulares aos diferentes íons e moléculas.

O teste de tolerância à seca é baseado na medida de condutividade elétrica, de uma solução contendo discos foliares previamente estressados, pela deficiência hídrica do solo, expostos a ação de polietileno glicol (PEG). Igualmente, o teste de tolerância ao calor, baseia-se na ação de discos foliares ao calor (BLUM e EBERCOM, 1981).

Zuily-Fodil *et al.* (1987) afirmam que o déficit hídrico do solo, em *Phaseolus* e *Vigna*, induziu um aumento ao nível celular, da liberação de eletrólitos e Pi, em discos foliares tratados com PEG. Esses autores ainda mencionam que testes baseados na cinética de liberação de eletrólitos e Pi apresentam boa sensibilidade para discriminar cultivares, permitindo classificá-las de acordo com a tolerância ou resistência protoplasmática. Os cultivares mais sensíveis apresentam maior taxa de injúria e conseqüentemente maior perda passiva de eletrólitos.

Zuily-Fodil *et al.* (1987) também baseados em teste de perda de eletrólitos, obtiveram a seguinte seqüência para resistência de membrana celular em espécies vegetais submetidos ao déficit hídrico: *Phaseolus Vulgares* cv. Carioquinha, sensível; *Phaseolus Vulgares* cv. IPA, *Vigna Unguiculata* cv IT-83D, moderadamente tolerante e *Vigna Unguiculata* cv EPACE 1 tolerante.

Monteiro de Paula *et al.* (1990), avaliando a ação do déficit hídrico do solo em cultivares de feijão-de-corda, quantificou a percentagem de danos, em discos foliares de plantas previamente desidratadas, em solução contendo apenas água destilada. O autor observou, que a cultivar IT-83D, classificada como sensível, quando submetida a um  $\psi_w$  de  $-2,0$  MPa, liberou três vezes

mais eletrólitos do que a Epace 1, tida como resistente, isso atesta que o sistema de membrana dessa cultivar é mais resistente, apresentando maior integridade. Por sua vez, Pinho (1992) mediu a fuga de eletrólitos em discos foliares de duas cultivares de sorgo e duas cultivares de milho usando uma solução de PEG 600 ( $\psi_w$  de  $-2,5$  MPa), observou que as cultivares de milho, em resposta ao déficit hídrico do solo, apresentou um ligeiro aumento da tolerância protoplasmática. Esse aumento chegou a até 20% e 30% nos cultivares M27 e M30 respectivamente, comparado aos valores do dia zero de estresse. No entanto, as cultivares de sorgo apresentaram uma integridade membranar três vezes superior as cultivares de milho, segundo o autor.

Segundo Costa Oliveira (2001), plantas de cajueiro-anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.) submetidas a diferentes níveis de deficiência hídrica, podem conduzir a uma perda da integridade das membranas celulares. Observou-se que o efeito do estresse hídrico sobre a permeabilidade celular das folhas de cajueiro aumentou a permeabilidade em resposta a uma maior difusão passiva, aumentada, possivelmente, devido à destruição dos lipídeos estruturais dessas membranas. Os resultados mostraram uma tendência mais acentuada de perda de eletrólitos para plantas do tratamento estressado, ou seja, o estresse hídrico deixou-as mais susceptíveis à perda de integridade das membranas celulares.

Blum e Ebercom (1981) avaliaram a tolerância à seca e à temperatura em trigo (*Triticum aestivum* L.) medindo a estabilidade da membrana celular através de testes e perdas de eletrólitos, em solução contendo PEG 6000. Evidenciaram que quando as plantas foram amostradas durante o período de

estresse hídrico, elas foram mais tolerantes à seca que as plantas bem irrigadas, indicando ajustamento e estabilidade da membrana celular.

## 5 - Ajustamento osmótico

O ajustamento osmótico parece ser um importante mecanismo fisiológico de adaptação à seca, pois permite a manutenção dos processos produtivos sob condições limitadas de água. Esse mecanismo permite o estabelecimento de um gradiente de potencial  $\Psi_w$  necessário para assegurar, um fluxo de água entre o solo e a planta, de maneira a manter o *status* hídrico e a turgescência celular durante o período de estresse hídrico.

O ajustamento osmótico diferencia-se da redução do potencial osmótico ( $\Psi_0$ ) sob o efeito da desidratação celular. Nesse caso, o aumento da concentração de solutos é conseqüência da redução do volume de solvente e conseqüência da redução do volume celular. Contrariamente, o ajustamento osmótico, por manter o gradiente de potencial hídrico, resulta num ganho líquido de solutos osmoticamente ativos, sem diminuir o potencial de turgescência. O ajustamento osmótico é medido através da estimativa do potencial osmótico a um dado potencial hídrico (MARUR, 1999; TAIZ e ZEIGER, 1992)

Em termos genéticos, o ajustamento osmótico pode estar sob o controle de um simples gene, ser altamente herdável e ainda facilmente incorporados em programas de melhoramento (LIMA FILHO, 2001). No entanto, esse

fenômeno é afetado por vários fatores como: velocidade de imposição do estresse; diferença entre espécies e condições ambientais.

Ressalta-se que embora o ajustamento osmótico possa garantir a turgescência foliar, as funções metabólicas podem ser reduzidas com resultado de alterações da composição do teor de íons no interior da célula.

O ajustamento osmótico quando ocorre permite a manutenção do alongamento celular, abertura estomática, fotossíntese, sobrevivência à desidratação e a exploração de um maior volume de solo. Contudo, pode causar limitações como: não manter completamente os processos fisiológicos, reduzir o crescimento, ser transitório e reversível, finito e limitado (LIMA FILHO, 2001; TURNER e JONES, 1980)

Segundo a literatura em algumas ocasiões mesmo ocorrendo ajustamento osmótico, o crescimento pode ser inibido. Atribui-se essa redução ao efeito tóxico dos sais responsáveis pelo abaixamento do potencial osmótico, utilizando carboidratos para o ajustamento e não para o crescimento e redução da permeabilidade da raiz. O ácido abscísico ABA além de participar ativamente do fechamento estomático é conhecido por induzir o ajustamento osmótico (DAIER, 1994).

Turner et al. (1978) relataram sobre a dinâmica natural do ajustamento osmótico em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e girassol (*Helianthus annuus* L.) evidenciaram que no potencial hídrico foliar mínimo a diminuição ocorre na taxa de aproximadamente 0,15 MPa por dia. As folhas ajustaram osmoticamente a uma taxa de 0,1 MPa por dia em ambas as espécies. Com o alívio do estresse o acúmulo de solutos aparentemente desapareceu. Os autores ainda mencionam que nas duas espécies não foram encontradas

evidências de persistência de ajustamento osmótico por longo período. O desenvolvimento lento do déficit hídrico possibilitou o ajustamento osmótico, em dois cultivares de sorgo, acompanhado de um aumento do potencial de pressão (TURNER e JONES, 1978). A turgescência celular tem sido considerada como o maior fator que influencia o crescimento das plantas durante o déficit hídrico (HISAO, 1973).

O ajustamento osmótico foliar tem sido observado em diversas cultivares, incluindo o algodão (ACKESON, 1980), trigo (KUANG *et al.*, 1987), sorgo (JONES e TURNER, 1978), lupim (KUANG *et al.*, 1987), girassol (TURNER *et al.*, 1978), Cevada (MATSUDA e RIAZI, 1981), feijão *Phaseolus*, pimentão, tomate (WULLSCHLEGER e OOSTERHUIS, 1991). Ao nível do sistema radicular esse mecanismo também tem sido observado algodão (OOSTERHUIS e WULLSCHLEGER, 1987), feijão *Phaseolus*, okra, ervilha, tomate (OOSTERHUIS e WULLSCHLEGER, 1991). Esses autores mencionam que o ajustamento osmótico foliar não foi associado com a manutenção do crescimento foliar seguido de estresse hídrico, ainda que o feijão e o pimentão tenham sido capazes de se ajustar osmoticamente, o comportamento foi igual ao do espinafre, o qual não exibiu ajustamento osmótico foliar. As leguminosas cultivadas, de uma forma, geral não possuem o ajustamento osmótico e a manutenção do *status* hídrico se faz principalmente pelo controle da abertura estomática e eficiência de absorção de água pelo sistema radicular. Além do mais, espécies ou cultivares em que a fotossíntese é tão sensível à deficiência hídrica quanto à expansão foliar são pouco prováveis de se ajustar osmoticamente, a não ser que ocorra hidrólise de reservas.

As plantas variam na magnitude de  $\epsilon$  (módulo de elasticidade) em resposta ao déficit hídrico. Células com parede celular rígida  $\Psi$ (alto), perde o turgor rapidamente, com a saída de água, esse mecanismo, pode ser importante para o fechamento estomático ou enrolamento e fechamento foliar (CHAVES FILHO e STACCIARINI, 2001).

## 6 - Alterações nos níveis de lipídeos polares das membranas celulares

Os lipídeos polares são constituintes essenciais das membranas celulares e desempenham um papel fundamental na sua estrutura e metabolismo, (DUMAS *et al.*, 1999). Diferentes formas de estresses entre eles, o hídrico, podem modificar a composição dos lipídios membranares e consequentemente a compartimentação das atividades metabólicas, (DAKHMA *et al.*, 1995).

Os teores em lipídios totais, em classes lipídicas e em ácidos graxos podem ser modificados nas plantas em condições de déficit hídrico (KANIUGA *et al.*, 1999). Vários autores observaram importantes variações nos teores de lipídios polares em plantas submetidas ao déficit hídrico. Alguns autores citam resultados onde os teores em galactolipídeos diminuem em condições de seca, enquanto os teores em alguns fosfolipídeos são aumentados nessas mesmas condições (MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1990)

No que diz respeito à ação da seca sobre os lipídeos foliares, Chetal *et al.* (1980) observaram que sobre as folhas de trigo, e de cevada, ocorria um aumento nos teores de fosfolipídeos, principalmente em fosfatidilcolina e

fosfatidilinositol, nas variedades resistentes. Este fato pode ser interpretado como uma consequência do aumento da síntese de membranas celulares. Nas plantas sensíveis à seca, tanto para o trigo como para a cevada, foi observada uma importante redução nos teores de fosfatidilglicerol, e conseqüentemente uma redução na atividade fotossintética. Somente lipídios extraplastidiais, tais como a fosfatidilcolina e fosfatidilinositol aumentam em condição de deficiência hídrica (STEVANOVIC *et al.*, 1992).

As membranas de folhas verdes se caracterizam por possuírem um alto teor em galactolipídeos, contrariamente às membranas de células animais e células de tecidos vegetais não clorofilados.

Uma importante redução dos teores em galactolipídeos dos cloroplastos em trigo e cevada foi observada por Chetal *et al.* (1981), sendo esta diminuição observada principalmente ao nível de monogalactosil diacilglicerol (MGDG) e digalactosil diacilglicerol (DGDG), e de uma forma mais importante em plantas sensíveis à seca.

Hubac *et al.* (1989), trabalhando com *Lupinus albus* e Wilson *et al.* (1987) trabalhando com *Gossypium hirsutum*, observaram reduções consideráveis nos teores de MGDG em resposta à ação do déficit hídrico. A redução nos teores de MGDG foram também acompanhadas de um aumento nos teores em ácidos graxos livres.

Alterações na composição em lipídios e em ácidos graxos das membranas dos cloroplastos pode afetar suas propriedades físico-químicas, e conseqüentemente a atividade fotossintética em plantas submetidas a deficiência hídrica. Plantas de trigo submetidas ao déficit hídrico, apresentaram um comportamento diferente entre a variedade sensível e a variedade

resistente à seca (PRABHA *et al.*, 1985). Cloroplastos intactos de plantas resistentes tiveram seus teores em fosfatidilcolina e fosfatidil inositol aumentados. Enquanto as plantas sensíveis tiveram seus teores em fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol diminuídos.

Costa Oliveira (2001), relatou que o estresse hídrico induziu modificações ao nível dos lipídeos de membranas em folhas de cajueiro-anão-precoce (*Anacardium occidentale* L.) submetidas a diferentes tratamentos de deficiência hídrica. Os teores de galactolipídeos (MGDG e DGDG) foram reduzidos nos tratamento mais severos de deficiência hídrica, enquanto os teores de fosfolipídeos, como por exemplo, a fosfatidilcolina, não sofreram grandes alterações. Os teores de galactolipídeos diminuídos induzem diretamente alterações no equilíbrio da relação ácido graxos insaturados/saturados, e conseqüentemente alterações na fluidez das membranas celulares.

O conjunto de fenômenos degradativos que ocorrem ao nível de lipídios de membranas colaboram para desestruturar também as membranas dos tilacóides (VIEIRA DA SILVA, 1976; PHAM THI *et al.*,1990) O grau de insaturação é diminuído em função do estresse hídrico aplicado, devido a uma redução nos teores dos ácidos linoléico e linolênico.

Os lipídeos de reserva, que são representados pelos triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG), podem também ser afetados pela deficiência hídrica. O déficit hídrico provoca um aumento da massa e da porcentagem de TAG e de DAG, fenômeno observado por Navari *et al.* (1990) com algodoeiro e por Martin *et al.* (1986) com soja. Estes autores observaram também um aumento nos teores de ácido linolênico em TAG e

DAG. Segundo Wilson *et al.* (1987) o acúmulo de TAG pode ser considerado como um desvio do processo metabólico em direção da síntese de lipídios de reserva.

A intensidade do déficit hídrico e a resistência à seca nas plantas podem desempenhar um papel importante no comportamento dos diferentes lipídeos de membrana. Pham Thi (1984) observou que um nível moderado de seca pode induzir um aumento nos teores de galactolipídeos e de fosfolipídeos das membranas foliares. Porém os teores dessas mesmas categorias lipídicas podem diminuir em função do aumento da intensidade do déficit hídrico aplicado.

## **7 - Alterações das membranas celulares em resposta as modificações nos teores dos Ácidos Graxos**

A partir de estudos com Raio X e de microscopia de polarização, Norberg *et al.* (1990), mostraram que os lipídios provenientes de plantas submetidas à seca, possuem um comportamento de fases polimórficas diferente dos lipídios de plantas bem hidratadas. As plantas de *Brassica napus* cultivadas em excesso de água apresentam os lipídios em fase cúbica, diferente dos lipídios de plantas submetidas a deficiência hídrica possuem uma configuração não-lamelar. A fase não lamelar seria prejudicial para as membranas celulares e na descompartimentação das reações enzimáticas celulares.

Diferentes processos degradativos podem, portanto, ser responsáveis por importantes modificações nos lipídios das membranas celulares. Estas

modificações podem estar associadas a uma diminuição do teor em lipídios totais, a uma redução no teor de insaturação e a modificações na inter-relação das diferentes classes lipídicas como também na relação esteróis/lipídios polares.

Uma diminuição da fluidez das membranas celulares, durante a senescência, pode ser atribuída a um aumento da relação esteróis/fosfolipídeos (DUXBURY *et al.*, 1991). Este fenômeno é acompanhado de modificações na conformação das proteínas nas membranas celulares devido à formação de agregados de proteínas, provocados pelas altas concentrações de esteróis livres nas membranas celulares. Costa Oliveira (2001) encontrou que o índice de insaturação foi severamente reduzido em plantas de caju anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) em condições de seca severa. O autor sugeriu que a diminuição do índice de insaturação teria como consequência perda de fluidez das membranas celulares.

A diminuição dos teores em lipídeos polares é um fenômeno característico da destruição das membranas celulares. Esta diminuição pode ser atribuída tanto a uma redução na velocidade dos processos biossintéticos, como a um aumento nos processos degradativos (MONTEIRO de PAULA *et al.*, 1993)

A degradação preferencial dos galactolipídeos em relação aos fosfolipídios pode ter importante papel na diminuição do grau de insaturação durante processos degradativos. A degradação dos galactolipídeos dos cloroplastos de plantas submetidas à deficiência hídrica ocorre de forma paralela a degradação da clorofila e a destruição dos tilacóides (D'ARCY LAMETA *et al.*, 1996). Os principais fosfolipídios das membranas são também

degradados paralelamente ao aumento da perda de eletrólitos intracelulares (HARWOOD, 1982; DAKMA *et al.*, 1995)

Aumentos nos teores de ácidos graxos saturados e reduções nos teores de ácidos graxos insaturados induzem modificações estruturais nas membranas celulares. Membranas celulares que possuam um índice de insaturação (relação entre ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados) alterado em função de estresses ambientais, como o estresse hídrico, terão como consequência modificações tanto na permeabilidade seletiva como na compartimentação das reações enzimáticas. O índice de insaturação, de acordo com Pham Thi *et al.* (1985) pode ser calculado a partir da porcentagem dos ácidos graxos insaturados em relação ao total de ácidos graxos presentes em um extrato lipofílico, após cromatografia gasosa.

## **8 - Peroxidação dos Lipídeos Membranares e mecanismos de formação de radicais livres**

A formação de radicais peróxidos é um processo complexo que pode ocorrer tanto em células animais como em células vegetais. Este fenômeno consiste na formação e propagação de radicais livres oxigenados e pode culminar com a degradação dos lipídios de membranas e conseqüente desestruturação das membranas celulares. Os radicais livres são produtos resultantes de reações de óxido-redução e podem ser formados de duas maneiras diferentes: através de reações químicas provocadas pelo oxigênio molecular ou por reações enzimáticas catalisadas por lipoxigenases.

Compreendendo as etapas da formação de  $O_2^-$ , podemos verificar que os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução. (FERREIRA, 1997).

De acordo com SCHANAIDER (2003), radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do  $O_2$ , isto é são, "espécies reativas do metabolismo do oxigênio" (ERMO), e são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2$ ), hidroxila ( $OH$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

Espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como  $H_2O_2$  e o ânion superóxido, são metabólitos comuns no metabolismo celular que envolve transferência de elétrons, como ocorre na mitocôndria, nos cloroplastos e nas reações de formação da parede celular. Mckersie (1996) relata que o peróxido de hidrogênio é notável devido a sua permeabilidade entre as membranas, por isso mesmo não consegue ser compartimentalizado pela célula. A conhecida reatividade do peróxido de hidrogênio requer também a presença de um metal redutor para formar um radical hidroxila altamente reativo que é um forte agente oxidante que reage com moléculas orgânicas. Em Fenton (1894, 1899)

e Haber e Weiss (1934) temos resultados pioneiros na descrição do potencial do peróxido de hidrogênio misturados a sais ferrosos.

Segundo Bray *et al.* (2000) radicais superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $O_2H^{\bullet}$  e  $O_2H^{\bullet}$ ) são eliminados pela superóxido dismutase numa reação que produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O peróxido de hidrogênio é convertido em oxigênio e água por ação da catalase ou apenas em água, através da oxidação do ascorbato, pela enzima ascorbato peroxidase. O ascorbato pode ser regenerado por dois diferentes mecanismos, em um deles, a redução enzimática do monodesidroascorbato, ocorre por ação da enzima monodesidroascorbato redutase. Alternativamente, monodesidroascorbato pode ser espontaneamente reconvertido em ascorbato, ou modificado para desidroascorbato, pode reagir com glutathiona reduzida (GSH) para produzir ascorbato e glutathiona oxidada (GSSG), em uma reação catalizada por desidroascorbato redutase. GSSG é reduzida pela glutathiona redutase, em reação que requer consumo de NADPH.

Os danos causados pelo oxigênio *singlet* e íons hidroxila podem ser também diminuídos pela ação de antioxidantes não enzimáticos, tais como vitamina E e carotenóides que são eliminados via glutathiona

.A primeira enzima desse sistema é a superoxidodismutase (SOD) e a última é a glutathiona redutase. Outra importante enzima do sistema de destoxificação é a Ascorbato peroxidase (APX), que utiliza a força redutora do ascorbato para eliminar o  $H_2O_2$ , potencialmente nocivo.

Embora glutathiona peroxidase (GPX) seja considerada como uma das enzimas chaves envolvidas na remoção de oxi-radicais em animais, esta só recentemente foi detectada em plantas. Nos mamíferos, GPX é a principal responsável pela eliminação do  $H_2O_2$ . Nas plantas, este papel é desenvolvido

principalmente pela APX, a qual existe sob várias isoformas, tanto no citossol como em várias organelas, tais como cloroplastos e glioxissomos (ASADA, 1994). Tendo em vista que GPX tem uma atividade muito menor que a APX, ela não competiria pelo  $H_2O_2$ , mas teria outras funções nas células, como por exemplo, regenerar o ascorbato, assim como também os antioxidantes aceptores de radicais livres que não são eliminados pelas vias enzimáticas anteriormente descritas. Aumento no RNAm ou proteína correspondente ao GPX foi observado em condições de estresses ambientais (CRIQUI *et al.*, 1992), levando a crer que existe uma requisição maior desta enzima em caso de estresses.

Segundo Sreenivasulu *et al.* (1999), o aumento da produção de ROS é responsável pela peroxidação de membranas lipídicas e o grau de dano peroxidativo é controlado por um sistema enzimático antioxidativo composto por peroxidases. O aumento na atividade total peroxidásica, em meio de células adaptadas ao estresse, refletiu nas modificações das propriedades mecânicas da parede celular e integridade de membranas em condições de alto teor de NaCl. Os autores ainda relatam sobre a resistência do fumo à doença que assinala a função de uma isoperoxidase na catalase das ligações cruzadas entre extensinas de parede celular.

A atividade das peroxidases é freqüentemente aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das principais funções da enzima (CAKMAK e HORST, 1991).

## 9 - Efeitos dos radicais livres no metabolismo vegetal

O estresse oxidativo é considerado um componente comum do estresse biótico e abiótico nas plantas (WINICOV, 1998). Elétrons originados das cadeias transportadoras de elétrons das mitocôndrias e cloroplastos podem reagir com  $O_2$  durante o metabolismo aeróbico normal produzindo espécies de oxigênio reativas, como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), estas formas ativas de oxigênio são citotóxicas podendo comprometer o metabolismo normal pela oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (FRIDOVICH, 1986). Devido às altas concentrações internas de  $O_2$  durante o processo fotossintético, os cloroplastos são especialmente propensos a gerar espécies de oxigênio ativado. Uma vez produzido o  $O_2^-$  é rapidamente convertido, enzimaticamente, através da superóxido Dismutase (SOD) ou não enzimaticamente, à  $H_2O_2 + O_2$  o que pode causar danos no metabolismo celular já que  $H_2O_2$  é um poderoso inibidor do Ciclo de Calvin, pela oxidação de seus componentes (KAISER, 1976). Em diferentes níveis as plantas possuem vários antioxidantes para a proteção do seu metabolismo contra essas espécies de oxigênio ativas. A catalase e uma variedade de peroxidases catalisam a conversão do  $H_2O_2$  a água. Embora a catalase esteja aparentemente ausente no cloroplasto, esta conversão é feita em uma reação catalisada, freqüentemente, por uma peroxidase ascorbato-específica presente em elevados níveis nesta organela (CHEN e ASADA, 1989).

Várias modificações ao nível de lipídios de membranas podem ser induzidas *in vitro* em sistemas geradores de radicais livres, como a xantina-xantina-oxidase. Senaratna *et al.* (1987) trabalhando com soja, encontraram

que o teor em fosfolipídios diminuiu, seguido de um aumento no teor em ácidos graxos livres, induzidos pela peroxidação. Foi também observado um aumento da viscosidade nas membranas celulares, em resposta a uma diminuição no teor em ácidos graxos poliinsaturados. Este aumento na viscosidade membranar torna as membranas celulares mais rígidas, levando posteriormente a uma descompartimentação celular (ZWIAZEK e BLAKE, 1990).

Mukherjee e Choudhuri (1981) observaram a presença de vários fenômenos bioquímicos quando plantas de *Vigna unguiculata* são submetidas a carência hídrica. Os teores em AIA oxidase, ascorbato-oxidase, glicolato-oxidase e de peroxidase são aumentados durante o déficit hídrico, seguido de um aumento na permeabilidade das membranas celulares. Estes fatos conduzem a uma redução nos teores de clorofila e de proteína, acelerando a ocorrência da senescência nestes tecidos.

As taxas de produção de  $O_2^-$  aumentam com a idade do tecido, e a produção de malondialdeído (MDA), pode mesmo aumentar antes dos sintomas da senescência ficarem evidentes. Um aumento na produção de MDA durante a peroxidação dos lipídios pode refletir um acúmulo de radicais peróxidos na célula. A catalase diminui mais que a SOD durante a senescência, e o desaparecimento dessas duas enzimas poderia levar a formação de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e de  $OH^-$ , que teriam um papel importante na degradação dos lipídios de membranas celulares. Quando os teores de catalase e de SOD diminuem em um tecido, este tecido perde sua capacidade de proteção contra a produção e acúmulo de radicais livres, em outras

palavras, as células não estariam mais habilitadas a eliminarem estas moléculas tóxicas.

Quando plantas são sujeitas a estresses ambientais, o balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade de antioxidantes é modificado, resultando freqüentemente em danos oxidativos (ASADA, 1994; KRAUSE, 1994). Espécies reativas de oxigênio (ROS) são tóxicas para as células das plantas, e mecanismos protetores antioxidantes para prevenir danos celulares podem ser ativados (BOWLER *et al.*, 1992). Um dos grandes paradoxos da realização da vida reside no fato de que a molécula que sustenta a bioquímica dos seres aeróbios, o oxigênio, não apenas é fundamentalmente essencial para o metabolismo energético e a respiração, mas também é causa de muitas doenças e condições degenerativas (MARX, 1985; SCANDALIOS, 1993). Essas formas de oxigênio são responsáveis por disfunções em humanos e também em plantas cultivadas induzidas por estresse (MAXWELL *et al.*, 1999). São recentes os estudos de detecção e monitoramento de moléculas de oxigênio, seja pela grande variedade de formas e intermediários que o oxigênio pode assumir, seja também pela elevada taxa de reatividade química envolvida nas reações. Como consequência freqüentemente adota-se, a título experimental, o acompanhamento de sinalizadores moleculares de reações oxigenadas a fim de determinar a relação causa /efeito nas respostas ao estresse (MCKERSIE, 1996).

A redução do oxigênio à forma de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila é o mecanismo principal de ativação de oxigênio na maioria dos sistemas biológicos. Contudo, em plantas fotossintéticas, a formação de

oxigênio ativo pelos fotossistemas têm importância fundamental. O oxigênio ativado é freqüentemente produzido como um componente de um metabolismo que permite reações químicas complexas, tais como a oxidação dos xenobióticos ou a polimerização da lignina (SCANDALIOS, 1993; PEIXOTO, 1998; DIONÍSIO-SESE e TOBITA, 1998; DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999). No entanto, em outras situações, o oxigênio ativado é produzido por meio de distúrbios enzimáticos ou em sistemas de transportes de elétrons, como resultado de perturbações no metabolismo causado por estresse químico ou ambiental (ZHU, 2001). Diferentes tipos de estresse podem direto ou indiretamente aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio e podem também causar mudanças no conteúdo de antioxidantes celular. Diminuição da proteção ocasiona peroxidação dos lipídios e aumento das ROS. Um aumento na formação desses radicais é altamente nocivo à célula devido à alta reatividade desses compostos com macromoléculas celulares, como proteínas, lipídios e DNA. Mas as células apresentam sistemas de defesas que podem ser enzimáticos e não enzimáticos. O sistema não enzimático corresponde à presença na célula de substância antioxidantes como o ácido ascórbico, tocoferol, glutathiona reduzida e carotenóides. O sistema enzimático, como o próprio nome indica, é constituído por um grupo de enzimas que atuam em cadeia.

### **9.1. Superóxido Dismutase (Dismutases de Superóxidos)**

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima presente em todas as células aeróbicas e desempenham um papel muito importante nos organismos

que vivem em presença de oxigênio. A superóxido dismutase foi isolada em sangue bovino em uma proteína com cobre, a qual possui função conhecida de acumular íons cúpricos. Há muito tempo a enzima tem sido referida como eritrocupreína, oxidases indofenol e oxidase tetrazólio. A enzima é ambígua, exercendo distribuição entre o consumo de  $O_2^-$  no organismo, aerotolerância a anaerobiose, e alguns anaeróbios obrigatórios (FRIDOVIC, 1986).

Todas as superóxido dismutase, independente da origem, são metaloproteínas multiméricas que são muito eficientes na reação do radical superóxido. O Cu/ZnSODs, MnSODs e FeSODs de procariontes, são diméricos, embora o MnSODs mitocondrial e certas bactérias termofílicas são tetraméricas.

A catalise da SODs é uma reação desproporcional de muito pouca difusão. Para realizar essa reação o mecanismo empregado alterna redução e oxidação, associado ao respectivo metal com a enzima. Três diferentes tipos de SODs, baseados no íon metal e seus sítios ativos, tem sido observado em larga escala nos organismos examinados (SCANDALIOS, 1993).

O papel biológico significante das SODs, como proteção enzimática contra a toxidez do  $O_2$  é sugerido em inúmeros estudos com procariontes e eucariontes inferiores e superiores, incluindo plantas superiores (FRIDOVICH, 1986; HASSAN e SCANDALIOS 1990; BOWLER *et al.*, 1992).

Várias isozimas da SOD foram detectadas em tecidos vegetais. Droillard e Paulin (1990) encontraram em peroxisomos e mitocôndrias de *Dianthus caryophyllus* duas isozimas de SOD, uma contendo ferro e outra manganês. A atividades dessas duas enzimas diminuem durante estresses ambientais e na senescência nas mitocôndrias, mas aumenta nos peroxisomos. A presença da

Fe-SOD nas mitocôndrias e peroxisomos é um fato incomum, uma vez que elas estão normalmente presentes nos cloroplastos. Este fato sugere um papel muito especial dos peroxisomos durante a senescência em tecidos vegetais, senescência esta, induzida por estresses ambientais, entre os quais, a deficiência hídrica. WANG (1989) acompanharam a taxa de produção de  $O_2^-$  e o sistema enzimático de destruição dessas moléculas durante a senescência.

A atividade da SOD, catalase (CAT) e das peroxidases (POX) pode também ser aumentada em condições de déficit hídrico, e este aumento pode também ser acompanhado de diminuições na atividade da RuBPCase, PEPcase e do teor em proteínas (BAFIANI, *et al.*, 1990). Estes autores sugeriram que o aumento nas atividades da SOD, catalase e peroxidase podem se constituir em uma defesa a formação de radicais livres causadas pela deficiência hídrica.

## 9.2. Catalase

A catalase é uma enzima contendo um grupamento heme em sua estrutura que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (ZÁMOCKY *et al.*, 2001). A enzima é encontrada em todos os eucariotos aeróbicos e é muito importante na remoção do peróxido de hidrogênio produzido nos peroxissomos e glioxissomos pelas oxidases envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, nas reações do glioxilato (fotorespiração) e no catabolismo das purinas (BREUSEGEM *et al.*, 2001). A catalase foi uma das primeiras enzimas a ser isolada em seu estado altamente purificado. Todas as formas de catalase são tetraméricas com massas

moleculares que podem exceder 220 Kda. Múltiplas formas de catalase têm sido descritas em muitas espécies de plantas (PEIXOTO, 1998). Em milho, foram encontradas três isoformas (CAT-1, CAT-2 e CAT-3) cujos genes estão em cromossomos separados e são expressados distintamente com regulações independentes (BREUSEGEM *et al.*, 2001) e diferentes localizações: CAT-1 e CAT-2 localizadas nos peroxissomos e no citosol, enquanto que CAT-3 na mitocôndria (SCANDALIOS, 1990). Breusegem *et al.* (2001) sugerem, ainda, as catalases como as principais enzimas de remoção de  $H_2O_2$  em plantas. Rout e Shaw (2001) sugerem que as catalases e peroxidases são enzimas antioxidativas presentes em plantas tolerantes à salinidade.

A catalase é particularmente abundante nos glioxissomos de sementes germinando, a qual destrói o  $H_2O_2$  gerado pela oxidação da flavina, e em peroxissomos de folhas verdes e durante o crescimento a destruição do  $H_2O_2$  na oxidação do glicolato fotorespiratório. (HAVIR e McHALE, 1986).

Schoenbein (1863), citado por Figueredo *et al.*, (2001), investigou as catalases e evidenciou a capacidade dos tecidos vivos em decompor o peróxido de hidrogênio produzindo oxigênio molecular. Estudos posteriores desse fenômeno levaram a uma conclusão geral de que outras enzimas também possuem a mesma capacidade em tecidos animais e vegetais. Entretanto, em, 1901, Loewen isolou a partir de folhas de fumo, uma molécula capaz de degradar o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular, sem possuir nenhuma outra propriedade enzimática. Esse composto foi chamado de catalase (MILLER, 1938 citado por MCKERSIE, 1996).

Embora folhas verdes de *Phaseolus vulgaris* e *Lens culinaris* possuam somente um tipo de catalase, formas múltiplas de catalases de folhas são

encontradas em inúmeras plantas (AVILA *et al*, 2001). No complexo padrão eletroforético tem sido observado na *Spinacia oleracea*, que as folhas possuem cinco formas de catalase, e na *Sinaps alba* 12 formas distintas de catalase nos cotilédones e nas folhas. A heterogeneidade da catalase tem sido observada em cotilédones de folhas de *Gossypium hirsutum*, onde no crescimento de sementes no escuro contêm cinco formas de variantes eletroforéticas, todas localizadas no glioxissomos (HAVIR e McHALE, 1986).

Quando os teores de catalase e de SOD diminuem em um tecido, este tecido perde sua capacidade de proteção contra a produção e acúmulo de radicais livres, em outras palavras, as células não estariam mais habilitadas a eliminarem estas moléculas tóxicas (SCHANAIDER, 2003).

### 9.3. Peroxidase de fenóis

Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (Allen e Hamilton, 1983).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (Namiki, 1990; Simic e Javanovic, 1994).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (Shahidi *et al.*, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (Nawar, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (Shahidi *et al.*, 1992).

A peroxidase é uma enzima cuja especificidade é atuar sobre os peróxidos, principalmente os de hidrogênio, decompondo-os e liberando oxigênio (GASPAR *et al.*, 1982). E está envolvida em muitas das reações metabólicas e processos fisiológicos dos tecidos vegetais. Essa enzima participa da síntese de lignina que é de fundamental importância no desenvolvimento das plantas (FLURKEY e JEN, 1978; MUSCCI, 1994).

Embora se reconheça sua importância no metabolismo das frutíferas, pouco se conhece sobre seu papel no crescimento e desenvolvimento das plantas e nas respostas aos diferentes tipos de estresse (LAGRIMINI *et al.*, 1990). Os fenóis participam em grande número de processos metabólicos de plantas, sendo que 60% da produção em biomassa da planta são compostos fenólicos (ERREA, 1991), entre os quais, os fenóis monoméricos (ácido cinâmico) e poliméricos (tanino e lignina) (ALPI *et al.*, 1992).

Os fenóis desenvolvem uma ação de regulação da atividade auxínica. As auxinas são importantes nas primeiras fases da união agindo na rediferenciação vascular. Os compostos fenólicos participam da regulação

catabólica, agindo sobre a AIA<sup>3</sup>/oxidase, enzima que degrada a auxina. Essa enzima, cuja atividade é controlada pelos fenóis, em particular, pelos monofenóis, que aumentam, enquanto os difenóis, como por exemplo, o ácido clorogênico, diminuem, agindo, assim, como protetores (NITSCH e NITSCH, 1962; STENLID, 1976, KEFEI e KUTACEL, 1977; POESSEL, 1983; MUSACCCHI, 1994).

#### 9.4. Peroxidase do ascorbato (APX)

As peroxidases são, provavelmente, mais largamente distribuídas do que outras enzimas, com exceção da catalase, sendo aparentemente, as mais estáveis das enzimas associadas com oxidação, em tecidos de plantas (Miller, 1938 citado por McKersie, 1996). As peroxidases de planta são glicoproteínas que contêm um grupo Heme em sua estrutura e possuem a função básica de catalisar a oxidação do peróxido de hidrogênio a partir de numerosas espécies de substratos orgânicos e inorgânicos, tais como citocromo c, nitrito, ascorbato, indol-aminas e outros (ZAMOCKY, 2001).

Segundo (KOSHIBA, 1993) as peroxidases do ascorbato tal como a superóxido Dismutase, pertencem a classe das oxido-redutases, que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio a água através da oxidação do ascorbato. Na reação; (L-ascorbato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → dehidroascorbato + 2 H<sub>2</sub>O).

Sreenivasulu *et al.*, (1999), o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio são responsáveis pela peroxidação de membranas lipídicas e o grau de dano peroxidativo é controlado por um sistema enzimático antioxidativo composto por peroxidases. A atividade das peroxidases é freqüentemente

aumentada em resposta aos estresses, sendo a proteção celular contra reações oxidativas uma das principais funções da enzima (CAKMAK e HORST, 1991).

## Hipótese

Os ácidos poliinsaturados das membranas celulares, podem ser degradados em resposta à ação do estresse oxidativo induzido pela deficiência hídrica

## Estratégias

Comparação de dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, com diferentes graus de tolerância ou sensibilidade à deficiência hídrica

Identificação e quantificação das diferentes categorias lipídicas em condições normais de hidratação e em deficiência hídrica

Estudo da composição em ácidos graxos totais e em ácidos das diferentes categorias lipídicas

Avaliação da resistência das membranas celulares através da perda de eletrólitos intracelulares

Estudo dos teores de lipídeos peroxidados afim de se verificar a eficiência do sistema de proteção contra radicais livres pela planta

Ensaio de atividades das enzimas Superóxido Dismutase, Catalase, Peroxidase do Ascorbato e Lipoxigenase visando avaliar a eficiência do

sistema de destoxificação das células e o nível de danos nos ácidos graxos dos lipídios membranares e conseqüente efeito na descompartimentação das reações enzimáticas

Este trabalho de pesquisa compreende dois experimentos, denominados de Experimento I e Experimento II, que foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-DBBM, Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici.

## EXPERIMENTO I

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Material vegetal

Foram utilizados quatro cultivares de feijão-de-corda (EPACE 1, EPACE 10, EPACE 11 e BR 10 PIAUÍ ). Esses cultivares apresentam características contrastantes no que diz respeito aos seus caracteres morfológicos e fisiológicos. No entanto, elas apresentam ciclos fenológicos semelhantes (Tabela 1). As sementes foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFC.

Tabela 1- Características botânicas e agronômicas das quatro cultivares avaliadas.

| Discriminação          | EPACE 1    | EPACE 10     | EPACE 11   | BR 10 -PIAUI |
|------------------------|------------|--------------|------------|--------------|
| Porte                  | Semi-ereto | Seme-ramador | Seme-ereto | Semi-ramador |
| Ciclo                  | 60-70      | 65-75        | 70-80      | 65-70        |
| Corda semente          | bege       | marrom       | Mar. claro | Mar. escuro  |
| Peso de 100 semente(g) | 15,0       | 20,0         | 19,0       | 19,0         |
| Número de grãos/vargem | 14         | 15           | 17         | 14           |
| Produtividade (Kg/ha)  |            |              |            |              |
| Sequeiro               | 847        | 1000         | 756        | 607          |
| Condições favorecidas  | 1405       | 1631         | 1953       | -            |

Fonte: Freire filho *et al.* (1997) citado por Gonçalves (1999).

## 2 - Métodos

### 2.1 - Condições de Cultivo

As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 6 litros de capacidade, com substrato composto de areia de superfície e esterco bovino curtido na proporção de 3/2. Os plantios foram efetuados em vasos com solo, com condição de umidade ao nível da capacidade de campo, indicada pela percolação da água de rega. Duas plantas foram cultivadas por vaso.

Até o início da imposição do estresse, as plantas foram irrigadas na frequência adequada, com a mesma quantidade de água por vaso, e num volume variável de acordo com a demanda evapotranspiratória. O estresse hídrico foi iniciado em torno de 31 dias após a germinação (DAG), suspendendo a irrigação de um grupo de plantas (tratamentos estressados). Uma primeira coleta de material foliar foi efetuada quando as plantas atingirem  $\psi_w$ , foliar de  $-1,5$  MPa (estresse moderado), caracterizado por sintomas visuais de deficiência hídrica. A partir deste patamar de  $\psi_w$ , foram realizadas duas reidratações, de 24 e 48 horas, com coletas de material. Uma segunda coleta de material foi efetuada quando as plantas do tratamento estressado apresentaram um nível mais severo de potencial hídrico (estresse severo). Após esta segunda coleta as plantas foram também reirrigadas e coletas de material efetuados após 24 e 48 horas.

## 2.2 - Avaliação do *status* hídrico das plantas

O Potencial Hídrico  $\psi_w$  foi determinado pelo método da bomba de pressão de Scholander, tipo P/N da Veriflo Corp. Em Richmond, Calif. (Scholander *et al.*, 1965).

Para leitura do  $\psi_w$ , foi utilizado o folíolo central, de cada folha. É medido da seguinte forma: a folha é cortada e introduzida imediatamente na câmara de pressão (para evitar as perdas de água), com a extremidade do pecíolo voltada para fora da câmara. A pressão é aumentada gradativamente, com o fornecimento de nitrogênio, até o aparecimento da primeira gota da seiva proveniente do xilema. O valor encontrado no manômetro corresponde a pressão necessária para liberar a água de dentro da folha, correspondendo assim ao potencial hídrico foliar. Os valores são expressos em MPa.

## 2.3 - Avaliação do *status* da membranas

A resistência membranas foi determinada de acordo com Ismail e Hall (1999). De cada amostra, foram obtidos 20 discos foliares de 10 mm de diâmetro que foram lavados três vezes, de 15 em 15 minutos, com água destilada, e incubadas no escuro em 20 ml de água destilada. Durante 24 horas, a intervalos de duas horas, foram efetuadas medidas da condutividade elétrica da solução (CL), em condutivímetro. A solução contendo discos foliares foi colocada em

banho-maria, a 90 °C por 1 hora para determinação máxima da liberação de eletrólitos (CT). A partir dos valores de condutividade obtidos os seguintes cálculos foram efetuados:

$$PIA = [ 1 - ( CL / CT ) ] . 100$$

$$PIR = PIA_{ESTRESSADO} / PIA_{IRRIGADO}$$

$$PD = 100 - PIR$$

Obs;

*Porcentagem de Integridade Absoluta (PIA):*

$$PIA = ( 1 - CL/CT ) \times 100$$

*Porcentagem de Integridade Relativa (PIR):*

$$PIR = ( PIA \text{ Estresse} / PIA \text{ Controle} ) \times 100$$

*Porcentagem de Danos Relativos (PDR):*

$$PDR = 100 - PIR$$

## 2.4 - Extração de lipídeos

Os lipídeos presentes nas folhas foram extraídos seguindo o método de Bligh e Dyer (1959), a partir 4 g de tecido foliar, excluindo-se as nervuras. O tecido foliar foi fixado em 20 mL de água destilada fervente por 2 minutos, para desativar as enzimas lipofílicas. O tecido foliar fixado foi triturado um gral com 40 mL de metanol/clorofórmio e a água utilizada na fixação, mantendo a proporção (2:2:1) v/v/v. Em seguida o material foi centrifugado a 3000 x g por 15 min, para separação das fases lipídica e aquosa. Uma segunda extração da fase aquosa foi efetuada com 20 mL de clorofórmio, seguido de centrifugação, como descrito anteriormente. Todo o solvente orgânico, das duas extrações, foi evaporado com nitrogênio e os lipídeos ressuspensos em 2 mL de clorofórmio, acondicionados em frascos de 4ml e armazenados a  $-30^{\circ}\text{C}$ . O teor total de lipídeos, foi determinado retirando-se uma alíquota, de 0,2 mL, colocando-se em tubo de ensaio de peso conhecido, mantendo-se em dessecador. Após 12 horas, foram realizadas diversas pesagens, até obtenção de um peso constante, por diferença do peso do tubo e o peso final, obteve-se o CTL.

## 2.5 - Carboidratos solúveis

Para a determinação carboidratos solúveis foi utilizado o método de Dubois *et al.* (1956)- que consiste em retirar uma alíquota do extrato de lipídeos totais (cerca de 0,5 mL ) e colocar em um tubo de ensaio (tubos de Lewis-Benedict de

25 ml). Todo o solvente do extrato lipofílico foi evaporado com Nitrogênio goso. Ao extrato de lipídios livre do solvente foi adicionado 2,0 mL de água seguido de agitação. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de fenol 5%, com agitação. Finalmente, foram adicionados 5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, com agitação e aquecimento em banho-maria, a  $90^\circ C$ , por 5 minutos. A mistura foi agitada e resfriada por cerca de 30 minutos. A absorbância, da coloração laranja desenvolvida, foi determinada à 490 nm. Quando a absorbância foi maior que 0,9, a mistura foi diluída com  $H_2SO_4 - H_2O$  (5:3) e a leitura refeita no mesmo comprimento de onda. A concentração dos carboidratos solúveis foi determinada através de uma curva padrão efetuada com glucose.

## IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO EXPERIMENTO I

### 1 - Avaliação do *status* hídrico das plantas

As plantas mantidas irrigadas apresentaram um comportamento semelhante, durante o período estudado (Figura 1). No entanto, o contraste das médias de  $\psi_w$  (Tabela 2) mostraram diferenças significativas para quase todas as cultivares, à exceção da cultivar Epace 1 que não apresentou diferenças estatísticas entre as medias. Os valores de  $\psi_w$  permaneceram numa faixa de - 0,20 MPa e - 0,40Mpa, sendo que o cultivar Epace 11 apresentou os valores mais negativos de  $\psi_w$  (-0,36 Mpa), observado aos 17 dias.

O estresse hídrico do solo induziu uma redução de  $\psi_w$  em todos os quatro cultivares estudados (Figura 2). No entanto, verifica-se, que após a suspensão da rega, uma menor intensidade de queda até os 14 dias, registrando valores e  $\psi_w$  em torno de - 0,6 MPa à -1,0 MPa, essa intensidade aumentou aos 18 dias, onde foram obtidos valores mais negativos de  $\psi_w$ , -1,1 MPa à -1,5 MPa. As cultivares Epace 1 e 11, atingiram os menores valore de  $\psi_w$ . Esses relutados estão de acordo McCrei & Richadson (1987), que encontraram, também para o feijão-de-corda,  $\psi_w$  foliar máximo de - 1,2 MPa, até 17 dias após a ultima rega. Contrariamente, Gonsalves (1999), também trabalhando com feijão-de-corda, conseguiu  $\psi_w$  foliar em torno de -1,5 MPa, após oito dias de suspensão da rega.

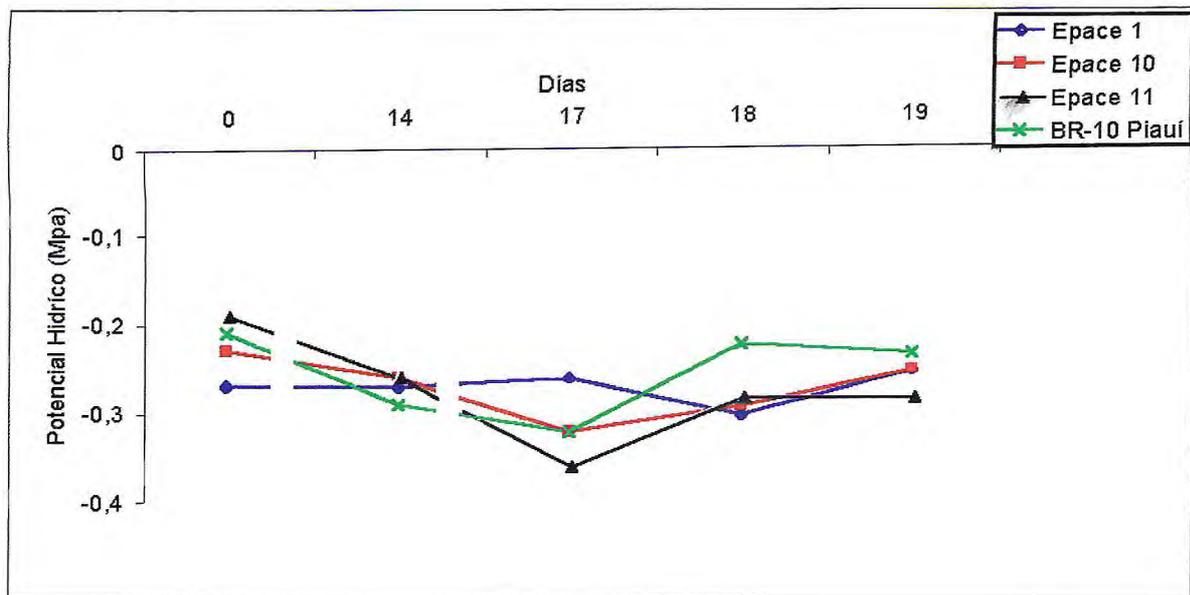


Figura 1 - Evolução do Potencial Hídrico em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) mantidas irrigadas.

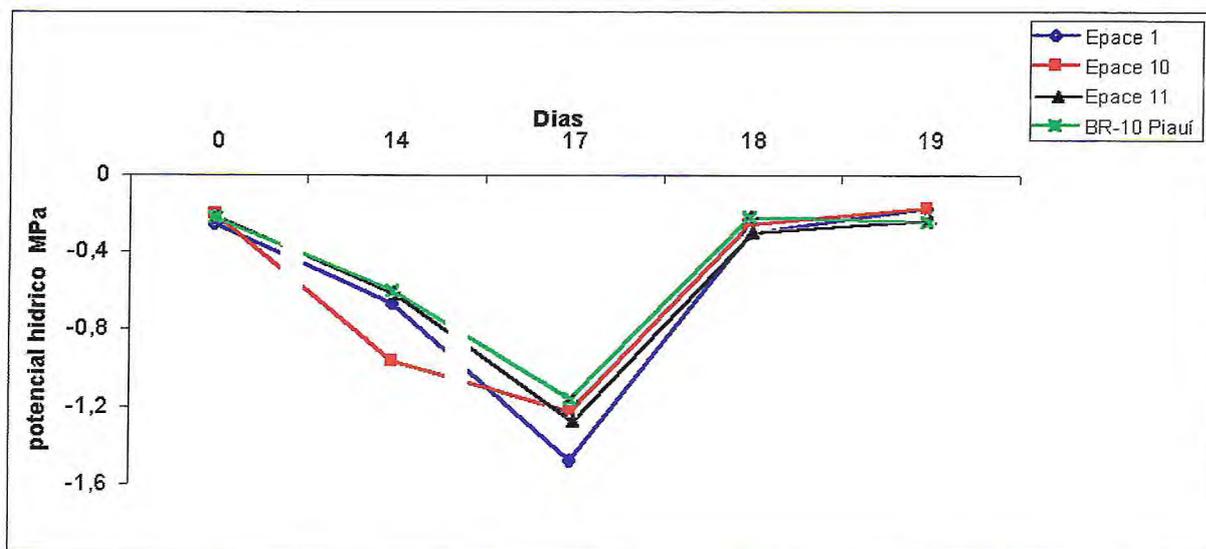


Figura 2 - Evolução do potencial hídrico em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) submetida a deficiência hídrica do solo

Tabela 2 – Potencial Hídrico em MPa de quatro cultivares de feijão-de-corda submetida a ciclos de deficiência hídrica seguido de reidratação durante o ciclo fenológico.

| Cultivares          | 0 dia    | 14 dias  | 17 dias | 18 dias  | 19 dias  |
|---------------------|----------|----------|---------|----------|----------|
| TESTEMUNHAS         |          |          |         |          |          |
| Epace 1             | -0,27Aa  | -0,27Aa  | -0,26Ba | -0,30Aa  | -0,25Ba  |
| Epace 10            | -0,23Bc  | -0,26Abc | -0,32Aa | -0,29Aab | -0,25Bbc |
| Epace 11            | -0,19Cc  | -0,26Ab  | -0,36Aa | -0,28Ab  | -0,28Ab  |
| BR-10 Piauí         | -0,21Bb  | -0,29Aa  | -0,32Aa | -0,22Bb  | -0,23Bb  |
| PLANTAS ESTRESSADAS |          |          |         |          |          |
| Epace 1             | -0,26Ac  | -0,68Bb  | -1,48Aa | -0,31Ac  | -0,18Bd  |
| Epace 10            | -0,21Bcd | -0,97Ab  | -1,23Ba | -0,26BCc | -0,18Bd  |
| Epace 11            | -0,22Bd  | -0,62BCb | -1,27Ba | -0,30ABc | -0,24Ad  |
| BR-10 Piauí         | -0,23ABc | -0,61Cb  | -1,16Ba | -0,22Cc  | -0,25Ad  |

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, no mesmo regime hídrico e minúscula, em mesma cultivar, não difere significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Talvez o prolongamento, encontrado neste trabalho tenha sido ocasionado pelas irregularidades climáticas, pois nesta ocasião, ocorreram algumas chuvas, que poderiam ter alterado a umidade relativa do ar, e por conseguinte, manter estáveis os valores de  $\psi_w$ , ou mesmo pela ação de respingos, sobre as folhas. De acordo com Slatyer (1967) existem evidências da absorção de água por órgãos aéreos, a partir do vapor d'água saturado ou próximo a saturação ou mesmo pela água no estado líquido.

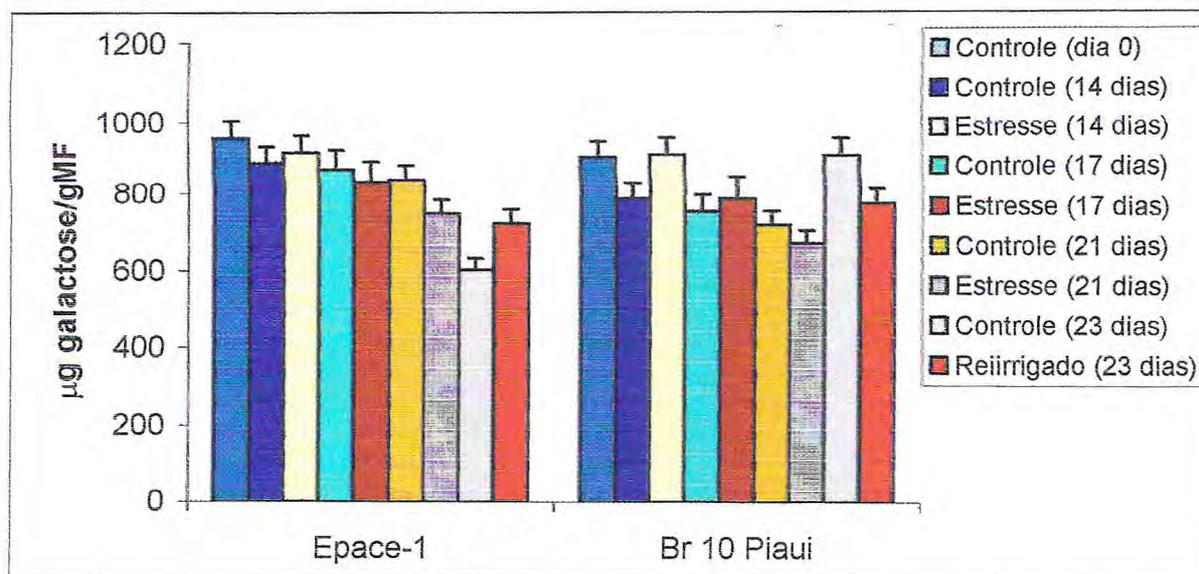
Vinte quatro horas após a primeira reidratação os valores de  $\Psi_w$  chegaram próximos aos observado nas plantas do tratamento controle. Resultados semelhantes foram obtidos com feijão-de-corda por Gonsalves (1999); sorgo e milho Pinho (1992) e Arroz Gomes *et al* 1997. Quarenta e oito horas após a reidratação esta tendência de recuperação foi mantida.

A análise estatística das plantas mantidas irrigadas, revelou que as cultivares mantidas em regime de rega, apresentaram um comportamento semelhante, durante o período estudado Figura 1. No entanto, o contraste das médias de  $\psi_w$ , apresentados na Tabela 2, mostraram diferenças significativas, para quase todas as cultivares, evidencia-se também aos 14 dias, o valor mais negativo de  $\Psi_w$ , nas plantas hidratadas. A exceção da cultivar Epace 1, em que não ocorreram diferenças estatísticas entre as medias, a cultivar Epace 11 apresentou valores mais negativos de  $\psi_w$  (-0,36 MPa). No entanto os valores de  $\psi_w$  para plantas hidratadas permaneceram numa faixa de - 0,20MPa e 0,40MPa.

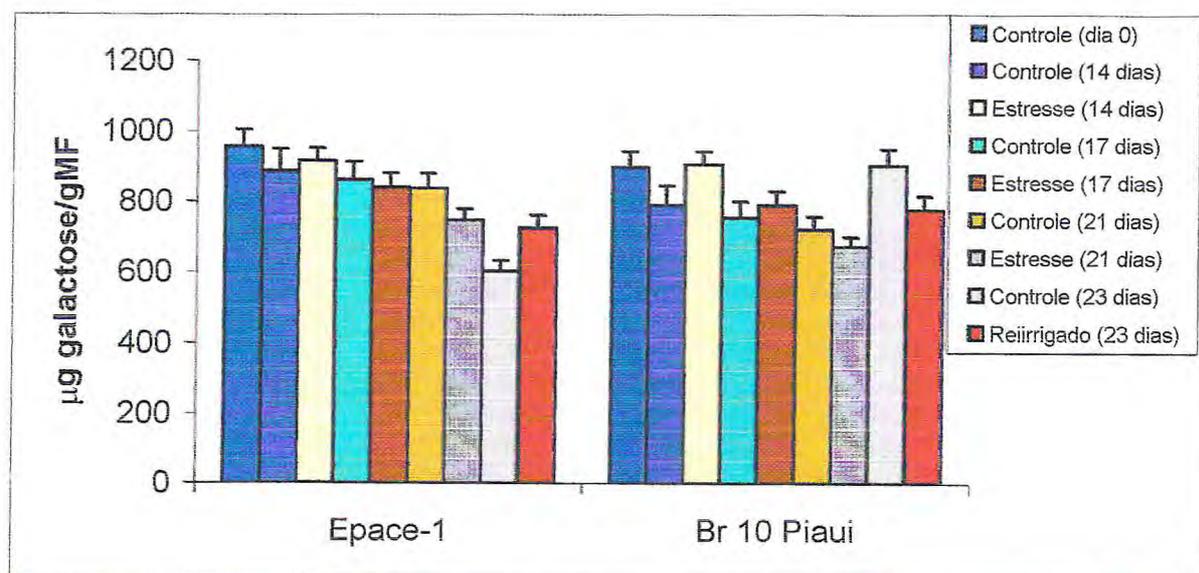
O estresse hídrico do solo reduziu o  $\psi_w$  de todas as cultivares estudadas (Figura 2). O contraste das médias de  $\psi_w$ , apresentados na Tabela 2, mostraram diferenças significativas, para quase todos os cultivares, com exceção do cultivar Epace 1, em que não ocorreram diferenças estatísticas entre as medias, de forma semelhante a observada para as plantas mantidas irrigadas. No entanto, verifica-se, que após a suspensão da rega, uma menor intensidade de queda até os 14 dias, registrando valores e  $\psi_w$  em torno de  $-0,6$  MPa à  $-1,0$  MPa, essa intensidade aumentou aos 18 dias, onde foram obtidos valores mais negativos de  $\psi_w$ ,  $-1,1$  MPa à  $-1,5$  MPa. As cultivares Epace 1 e 11, atingiram os menores valores de  $\psi_w$ . Esses resultados, estão de acordo McCrei & Richardson (1987), que encontraram, também para o feijão-de-corda,  $\psi_w$  foliar máximo de  $-1,2$  MPa, até 17 dias após a última rega. Contrariamente, Gonsalves (1999), também trabalhando com feijão-de-corda, conseguiu  $\psi_w$  foliar em torno de  $-1,5$  MPa, após oito dias de suspensão da rega.

## 2 - Teor de Galactose presente nos Galactolipídeos

O teor de galactose presente nos galactolipídeos (MGDG e DGDG) foi medido a partir do extrato de lipídeos totais para todos os cultivares (Figuras 3a e b). As plantas do cultivar Epace-10 não apresentaram variações no teor de galactose em função dos tratamentos de deficiência hídrica aplicados, se mostrando, portanto, resistente quanto a este parâmetro analisado. Aos 14 dias de estresse hídrico, as plantas deste cultivar apresentaram uma redução de



A



B

Figura 3 – Teor de galactose do extrato de lipídeos totais em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, para os cultivares Epace 10 e Epace 11 (A), Epace 1 e BR Piaui (B).

12,8% e aos 21 dias , a redução foi de 14,1 %. Após o reinício da rega, a mesma tendência foi obedecida, com as plantas do tratamento estressado apresentando uma redução de 15,6 % (Figura 3a).

As plantas do cultivar Epace-11, apresentaram alterações mais evidentes no teor de galactose do que as apresentadas nos outros cultivares analisados (Figura 3a). Aos 14 dias de deficiência hídrica as plantas deste cultivar apresentaram uma redução de 19,6 %, porém, esta redução foi bem mais acentuada aos 21 dias de suspensão da rega, sendo de 47,5 % em relação as plantas do tratamento controle. Vinte e quatro horas após o reinício da rega, as plantas do cultivar Epace-11 recuperaram parcialmente o teor de galactose, porém persistindo uma redução de 22,1 % em relação ao tratamento controle de 23 dias.

As plantas dos cultivares Epace-1 e Br 10 Piauí, não apresentaram variações importantes em resposta aos tratamentos de deficiência hídrica (Figura 3 b). A variação mais importante observada para Epace-1, foi uma redução de 8,9 % aos 21 dias de deficiência hídrica, em relação ao tratamento controle. Vinte e um dias de deficiência hídrica também afetaram de forma mais importante as plantas do cultivar Br 10 Piauí, as quais apresentaram uma redução de 6,8 %.

Quando se estabelece uma comparação entre os quatro cultivares analisados, o cultivar Epace-11 se mostra mais sensível às reduções dos teores de galactose, principalmente no nível mais severo de deficiência hídrica, aos 21 dias de suspensão da rega.

Chetal *et al.*, (1982), Pham Thi (1990) e Monteiro de Paula *et al.*, (1990), observaram reduções dos teores de galactolipídeos sob efeito do déficit hídrico. Alterações nos teores de galactolipídeos podem ter influência direta na fluidez nas membranas celulares, e conseqüentemente na integridade dessas membranas, uma vez que a galactose foi medida a partir do extrato lipofílico, refletindo diretamente o conteúdo de galactolipídeos presentes nestes extratos.

### **3 - Avaliação da resistência membranar e da percentagem de danos através de teste de perdas de eletrólitos**

O comportamento das plantas em resposta a deficiência hídrica do solo, foi efetuado através de testes de perdas de eletrólitos. Estes testes permitem quantificar os danos sofridos nas membranas celulares, onde o aumento do fluxo de íons ocorre em conseqüência de uma maior permeabilidade das membranas aos diferentes íons e moléculas.

A variação da percentagem de danos (PD) em plantas de feijão-de-corda submetida à deficiência hídrica do solo, mostrada na tabela 3 e figura 4 evidencia um comportamento diferenciado entre os quatro cultivares estudados, permitindo a formação de dois grupos. Os cultivares Epace 1 e 11, quando submetidos a um déficit hídrico de - 0,6 MPa, apresentaram uma maior PD, em torno de 70% e 40% respectivamente. Estes valores elevados de PD indicam que as membranas celulares podem ter tido sua integridade afetada em resposta ao estresse hídrico do solo. Quando submetidas a um  $\psi_w$  de -1,5 MPa,

Tabela 3 – Percentagem de Danos (PD) em plantas de feijão-de-corda, submetida à deficiência hídrica do solo, considerando a percentagem de integridade absoluta de plantas hidratada (PIA - 0,3 MPa), estressadas de (PIA - 0,6 MPa), (PIA -1,5 MPa) e reidratadas.

| Cultivares  | - 0,3 MPa | - 0,6 MPa |       | -1,5 MPa |       | Reidratadas |       |
|-------------|-----------|-----------|-------|----------|-------|-------------|-------|
|             | PIA%      | PIA%      | PD%   | PIA%     | PD%   | PIA%        | PD%   |
| Epace 1     | 10,37     | 3,34      | 67,80 | 3,48     | 66,45 | 2,65        | 74,45 |
| Epace 10    | 10,06     | 8,53      | 15,21 | 5,33     | 47,02 | 3,59        | 64,32 |
| Epace 11    | 14,27     | 8,63      | 39,53 | 5,79     | 59,43 | 10,40       | 27,12 |
| BR-10 Piauí | 10,67     | 8,04      | 24,65 | 5,24     | 50,90 | 9,41        | 11,81 |

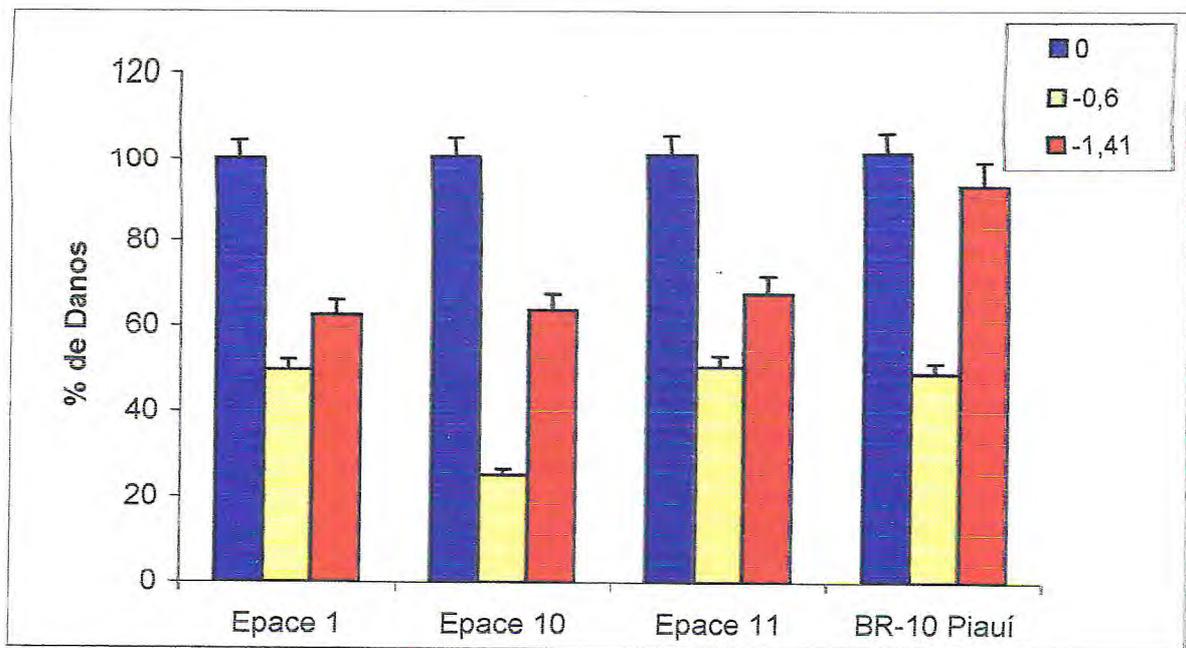


Figura 4 - Percentagem de danos %PD em cultivares de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) submetidas à deficiência hídrica do solo, medida em MPa.

a exceção da Epace 1, as demais cultivares, apresentaram PD mais elevada. No entanto, nessa ocasião, em que as plantas apresentavam fortes sinais de deficiência hídrica do solo, a Epace 10 e BR-10 Piauí, apresentaram a menor PD (Figura 4).

Os cultivares Epace 11 e BR-10 Piauí, 48 horas após a irrigação, recuperaram a integridade das membranas celulares. Pode-se supor, para os demais cultivares, que o prazo de 48 horas após o reinício da rega tenha sido insuficiente para que eles expressarem um nível maior de recuperação para a integridade de suas membranas (Figura 4).

Na Tabela 4 são mostrados, os valores de PD para cada cultivar considerando o dia zero ( $D_0$ ) e o último dia ( $D_f$ ) das plantas irrigadas. A maior percentagem de danos foi apresentada pelo cultivar Epace 1, seguido dos cultivares BR-10 Piauí, Epace 11 e Epace 10. Estes resultados tornam evidente que o envelhecimento natural das plantas dos cultivares estudados também é responsável pela perda de integridade das membranas celulares.

Na cultivar BR-10 Piauí, assim como na Epace 10, algumas evidências podem colaborar para a hipótese que estes cultivares sejam mais tolerantes à deficiência hídrica. As plantas desses cultivares apresentavam uma maior suculência nas folhas, que perdurou mesmo em condições de deficiência hídrica do solo. Contrariamente, os cultivares Epace 1 e Epace 11, após a suspensão da rega, rapidamente apresentavam sinais de desidratação em suas folhas, as quais começam a cair com alguns dias após a suspensão da rega. Em algumas plantas perenes, a perda das folhas pode ser considerada como uma estratégia,

Tabela 4 – Percentagem de Danos (PD) em plantas de feijão-de-corda irrigadas, considerando a percentagem de integridade absoluta do dia zero de cultivo (PIA  $D_0$  e o ultimo dia de estresse PIA  $D_f$ , durante o ciclo fenológico).

| Cultivares  | PIA $D_0$ % | PIA $D_f$ % | PD%   |
|-------------|-------------|-------------|-------|
| Epace 1     | 10,37       | 6,28        | 39,45 |
| Epace 10    | 10,06       | 8,09        | 19,59 |
| Epace 11    | 10,21       | 7,78        | 23,81 |
| BR-10 Piauí | 10,67       | 6,58        | 38,34 |

ou seja, uma redução da área foliar pode levar a uma diminuição da transpiração, conseqüentemente também reduções na perda de água. Tal mecanismo reduz, entretanto, a área fotossintética e conseqüentemente a produtividade vegetal. No caso do feijão-de-corda, poderiam estar associados outros mecanismos, anatômicos, morfológicos e mesmo bioquímicos como fechamento dos estômatos, e modificações estruturais ao nível das membranas celulares, na tolerância de plantas a diferentes formas de estresses ambientais.

#### **4 - Teor de Lipídeos Totais**

As Figuras 5 e 6 apresentam variações nos teores de lipídeos totais, tornando evidente que tanto a idade da planta como o estresse hídrico do solo, provocaram alterações na composição total de lipídeos. Nas plantas hidratadas (Figura 5), verifica-se uma redução gradativa até o 14<sup>o</sup> dia para os cultivares Epace 1, Epace 11 e BR 10 Piauí. Estes mesmos cultivares apresentaram uma pequena tendência de aumento nos teores de lipídeos totais entre o 14<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dia. O cultivar Epace 10 apresentou um comportamento diferenciado em relação aos outros cultivares estudados, ou seja, uma redução de maior amplitude até o 14<sup>o</sup> dia seguido de aumento nos teores de lipídeos totais até o 21<sup>o</sup> dia, com uma pequena redução desses teores entre o 14<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dia. As reduções nos teores de lipídeos observadas no tratamento irrigado pode ser conseqüência natural do envelhecimento das folhas destes cultivares.

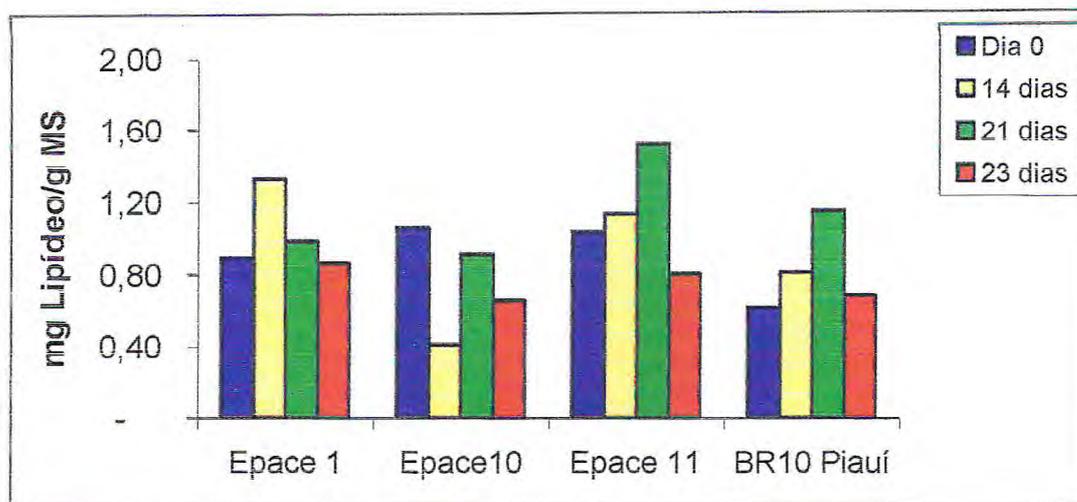


Figura 5 – Teor de Lipídeos totais (mg/gMF) em folhas de plantas irrigadas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp).

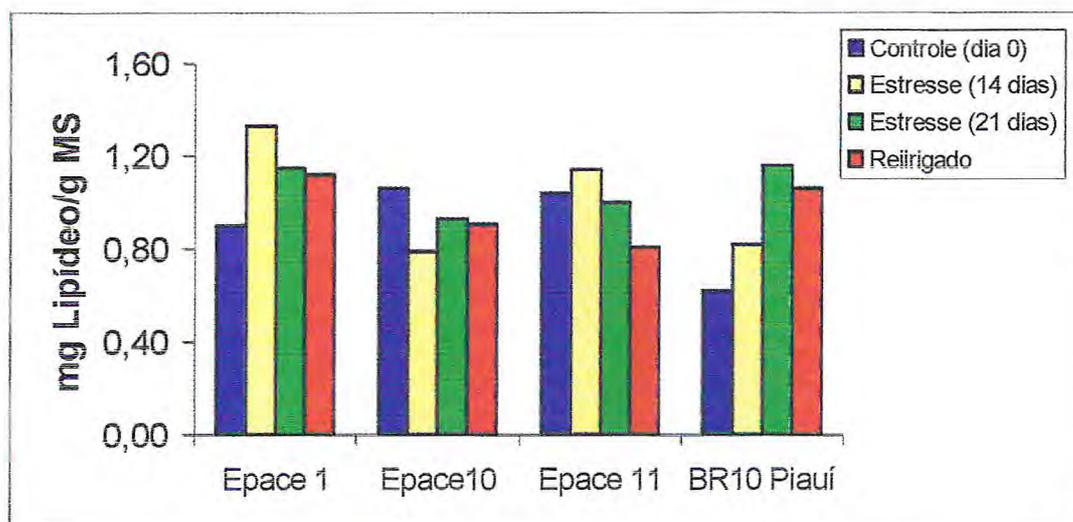


Figura 5 – Teor de Lipídeos totais (mg/gMF) em folhas de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) submetidas à deficiência hídrica.

As plantas dos quatro cultivares estudados, submetidas ao tratamento de deficiência hídrica, apresentaram comportamento diferenciado com relação aos teores de lipídeos totais. O cultivar BR-10 Piauí teve um aumento gradativo nos teores de lipídeos totais até o 14<sup>o</sup> dia ( $\psi_w$  -1,28 MPa), não sendo portanto afetado pela deficiência hídrica em seus teores de lipídeos totais.

Após a reidratação, as plantas deste cultivar mantiveram estáveis os teores de lipídeos totais. Os teores de lipídeos para o cultivar Epace 10, decresceram até o 14<sup>o</sup> dia ( $\psi_w$  - 0,72 MPa), apresentando em seguida um pequeno aumento até o final do período experimental. Após a reirrigação, esta tendência de aumento foi mantida para as plantas do cultivar Epace 10. As plantas do cultivar Epace 1 apresentaram um grande aumento (xxxx % em relação as plantas irrigadas) no 14<sup>o</sup> dia ( $\psi_w$  - 0,72 MPa) de estresse hídrico, seguido de redução gradativa até o 14<sup>o</sup> dia ( $\psi_w$  -1,28 MPa). 48 horas após a reidratação, as plantas do cultivar Epace 1 mantiveram os teores de lipídeos totais sem alterações. Os teores de lipídeos totais para as plantas do cultivar Epace 11 sofreram um pequeno aumento até o 14<sup>o</sup> dia ( $\psi_w$  - 0,72 MPa), seguido de redução até o 14<sup>o</sup> dia ( $\psi_w$  -1,28 MPa). Mesmo 48 horas após a reidratação, as plantas do cultivar Epace 11 não recuperaram os teores de lipídeos totais observados nas plantas irrigadas.

Monteiro de Paula *et al.* (1990) trabalhando com feijão-de-corda, avaliou a composição específica de lipídios em condições de deficiência hídrica do solo, e observou que as plantas tidas como sensíveis apresentaram maior quantidade de lipídeos membranares que as plantas do cultivar resistente. Estes autores

também observaram reduções gradativas no teor de lipídeos, de uma forma mais intensa, no cultivar sensível à seca, em resposta a deficiência hídrica.

## **EXPERIMENTO II**

### **1. Material vegetal**

Para o Experimento II foram utilizados dois cultivares de feijão-de-corda, EPACE 10 e EPACE 11. Os cultivares Epacé 1 e BR 10 Piauí foram descartados desta etapa do trabalho, em virtude do fato de não terem apresentado diferenças importantes nos parâmetros analisados no experimento I. As sementes foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFC.

### **2. Condições de Cultivo**

As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 6 litros de capacidade, com substrato composto de areia de superfície e esterco bovino curtido na proporção de 3/2. Os plantios foram efetuados em vasos com solo, com condição de umidade ao nível da capacidade de campo, indicada pela percolação da água de rega. Duas plantas foram cultivadas por vaso.

Até o início da imposição do estresse, as plantas foram irrigadas na frequência adequada, com a mesma quantidade de água por vaso, e num volume variável de acordo com a demanda evapotranspiratória. O estresse hídrico foi iniciado em torno de 31 dias após a germinação-DAG, suspendendo a irrigação de

um grupo de plantas (tratamentos estressados). Uma primeira coleta de material foliar foi efetuada aos 14 dias, quando as plantas atingiram  $\psi_w$  foliar de  $-1,5$  MPa (estresse moderado), caracterizado por sintomas visuais de deficiência hídrica. A partir deste patamar de  $\psi_w$ , foram realizadas duas reidratações, de 24 e 48 horas, com coletas de material. Uma segunda coleta de material foi efetuada aos 21 dias, quando as plantas do tratamento estressado apresentaram um nível mais severo de potencial hídrico (estresse severo). Após esta segunda coleta as plantas foram também reirrigadas e coletas de material efetuados após 48 horas.

### 3. Extração de lipídeos

Os lipídios presentes nas folhas foram extraídos seguindo o método de Bligh & Dyer (1959) foi retirado 4 g de tecido foliar, excluindo-se as nervuras e utilizado para a extração. O tecido foliar foi fixado em 20 ml de água destilada fervente por 20 minutos, para desativar as enzimas lipofílicas. O tecido foliar fixado foi triturado um gral com 40ml de metanol/clorofórmio e a água utilizada na fixação, mantendo a proporção (2:2:1) v/v/v. Em seguida o material foi filtrado a vácuo e a separação das fases lipídicas e aquosas, obtidas em funil de separação. Uma Segunda extração da fase aquosa foi efetuada com 20 ml. de clorofórmio. O filtrado evaporado com nitrogênio foi recuperado em 2 ml de clorofórmio, acondicionados em frascos de 4ml e armazenados a  $-30^{\circ}\text{C}$ . O conteúdo total de lipídios, foi identificado retirando-se uma alíquota, de 0,2 ml, colocando-se em

tubo de ensaio de peso conhecido, mantido-se em dissecador. Após 12 horas, realizara-se a primeira pesagem, e prosseguiu-se até obtenção de um peso constante, por diferença do peso do tubo e o peso final, obtiveram-se o CTL.

#### 4. Teor de Lipídeos Peroxidados

Para determinação do teor de lipídeos peroxidados foi usado o método de Cakmak e Horst (1991) que consiste na dosagem dessas moléculas a partir de uma alíquota de cerca de 1,0 mL do Extrato de Lipídios Totais colocada em um tubo de ensaio (tubos de ensaio de cerca de 10 a 12 mL). Em seguida, foram adicionados 3,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) 20 % (p/v). Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 90° C por 2 horas, sob agitação constante e a reação foi interrompida em banho de gelo-água. O material foi centrifugado a 9.000 x g por 10 minutos e a absorbância do sobrenadante determinada a 532 e 660 nm. A quantidade do complexo malonaldeído MBA-TBA formada foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. As leituras foram efetuadas contra um branco.

## **5. Teor de ácidos graxos totais**

O teor de Ácidos Graxos Totais foi determinado a partir de uma alíquota de 50 µl do extrato de lipídeos totais. O método de Metcalfe (1966) foi utilizado para preparação dos ésteres metílicos. A saponificação foi efetuada com NaOH-metanólico em banho-maria a 65° C por 15 minutos. O processo de metilação foi realizado com trifluoreto de boro-metanólico em banho-maria a 65° C durante 15 minutos. A seguir as amostras saponificadas e metiladas foram resfriadas em banho de água-gelo. Os ésteres metílicos assim obtidos são separados e identificados por cromatografia em fase gasosa de coluna capilar, em método gradiente de temperatura de coluna (80° C a 200° C) e o tempo médio de separação dos ésteres metílicos (em coluna capilar de 30 m) de cada amostra, foi de aproximadamente 40 minutos.

## **6. Análise das Diferentes Categorias Lipídicas**

A Cromatografia de Camada Fina (CCF) foi realizada pela deposição de uma alíquota de 400µl do extrato de Lipídios Totais sobre uma placa de sílica gel 60(MERCK) 20x20 cm com espessura de 0.25 mm, em seguida a cromatografia foi desenvolvida em uma mistura de solventes com 50 mL de clorofórmio, 20 mL de acetona, 10 mL de metanol, 10 mL de ácido acético e 5 mL de água, segundo

Lepage, 1967. A mistura de solventes foi sempre preparada com 24h de antecedência e colocada em uma cuba de vidro hermeticamente fechada para saturação da atmosfera. Após a migração total da amostra a placa foi retirada da cuba de migração e após secagem, vaporizada com primulina 10 %, em acetona, para revelação dos lipídeos. Em seguida a placa foi levada a uma câmara de luz ultravioleta, de 366 nm, onde as diferentes categorias lipídicas foram visualizadas. As classes lipídicas foram identificadas através do fator referencial específico, e também pela deposição na placa, de padrões comerciais das principais categorias lipídicas presentes nos extratos lipofílicos. As diferentes categorias lipídicas foram saponificadas, metiladas e posteriormente identificadas por cromatografia gás líquido de coluna capilar, conforme descrito no item número 5. Para a quantificação dos diferentes ácidos graxos das categorias lipídicas, foram adicionados no momento da metilação 100µl de ácido heptadecanóico (C17) como padrão interno.

## **7. Ensaio Enzimáticos**

Para a obtenção do extrato enzimático foi utilizado o método de extração que consiste na utilização de 200 mg de tecido vegetal fresco homogeneizado em 10 mL de meio de extração contendo EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8. O homogeneizado foi filtrado em 4 camadas de gaze e centrifugado a 12.000 g por 20 minutos. Todas as etapas de obtenção do extrato

foram efetuadas a 4<sup>o</sup> C. O sobrenadante obtido após centrifugação foi utilizado para os diferentes ensaios enzimáticos

### **7.1 - Ensaios de atividades da Superóxido Dismutase (Dismutase de Superóxido)**

A atividade da Dismutase de Superóxido foi determinada usando 50 µl do extrato enzimático bruto adicionado a seguinte mistura: metionina 13 mM; azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM; EDTA .100 nM e riboflavina 2 µM em tampão fosfato de sódio 50 mM. pH 7,8 ( Del Longo et al 1993). A reação foi processada em uma câmara com uma lâmpada fluorescente de 15 W mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio, a 25<sup>o</sup> C. A reação foi iniciada com a ligação da Lâmpada durante 5 minutos, seguido do desligamento da mesma (Giannopolis e Ries, 1977). A coloração azul produzida pela fotoxidação do NBT, foi medida pelo aumento na absorbância a 560 nm. O branco, contendo todos os elementos da mistura de reação, foi mantido no escuro. Uma unidade de SOD será definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50 % do fotorredução do NBT.

## 7.2 - Ensaio de atividades da Catalase

A atividade da catalase foi determinada após a adição de 100  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{l}$ ) do extrato enzimático bruto a 2,9 mL (2,95) de meio de reação constituído de  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM (20mM) em tampão de potássio 50 mM pH 7,0 segundo metodologia de Havir e McHale 1987. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm utilizando-se, para cálculos o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson *et al*, 1995).

## 7.3 - Ensaio de atividades da Peroxidase de fenóis

A atividade da peroxidase de fenóis foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  do extrato enzimático bruto que foram adicionados a 4,9 mL de uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogaloil 20mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM. Após incubação da solução por 1min a  $25^\circ\text{C}$ , a reação foi interrompida pela adição de 0,5mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (v/v) e a absorbância da solução, então lida a 420nm contra um branco em que a enzima foi previamente inativada pela adição de 0,5ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (v/v). A atividade das POXs foi determinada pela medição da quantidade de purpurogalina formada utilizando-se, para os cálculos o coeficiente de extinção molar de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (CHARCE E MAEHLEY, 1995).

#### 7.4 - Ensaio de atividades da Ascorbato Peroxidase

A atividade das peroxidases do ascorbato foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981) modificada por Koshiha (1993). Para obtenção do extrato enzimático das peroxidases do ascorbato foi adicionado à uma solução padrão de extração ascorbato para atingir a concentração final de 1 mM. A atividade das APXs foi determinada adicionando-se 100µl do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de uma mistura de reação constituída de ascorbato 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, a 25°C. O experimento, iniciado pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à mistura de reação medindo-se o decréscimo na absorbância 290 nm registrado no intervalo de 60 segundos após a sua incorporação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO II

### 1. Teor de Lipídeos Peroxidados

A análise do teor de lipídeos peroxidados para os cultivares Epace-10 e Epace-11, revelou que estes dois cultivares tiveram um comportamento diferenciado em resposta a ação dos tratamentos de deficiência hídrica aplicados. As plantas do cultivar Epace-10 sofreram menos a ação do estresse hídrico que o cultivar Epace-11 (Figura 6), nos dois níveis de deficiência hídrica.

Os dois tratamentos de deficiência hídrica utilizados, praticamente não foram capazes de induzirem aumentos nos teores de lipídeos peroxidados nas plantas do cultivar Epace-10. Aos 21 dias de estresse hídrico, estas plantas apresentaram um aumento de cerca de 15 % no teor de lipídeos peroxidados, em relação ao tratamento controle. Entretanto, 48 horas após o reinício da rega, ou seja, aos 23 dias de tratamento estas plantas conseguiram reduzir o teor de lipídeos peroxidados para níveis inferiores aos observados nas plantas do tratamento controle de mesma idade (Figura 6).

As plântulas do cultivar Epace-11 apresentaram níveis de peroxidação de lipídeos bem maiores do que os apresentados nas plântulas do cultivar Epace 10 (Figura 6). Aos 14 dias de deficiência hídrica, as plantas deste cultivar já apresentaram um aumento de 18,4 % no teor de lipídeos peroxidados e esta tendência foi ainda mais acentuada aos 21 dias de deficiência hídrica, com um

aumento de 64,7 %. Vinte e quatro horas após o reinício da rega, as plantas do cultivar Epace-11 diminuíram parcialmente o teor de lipídeos peroxidados nas

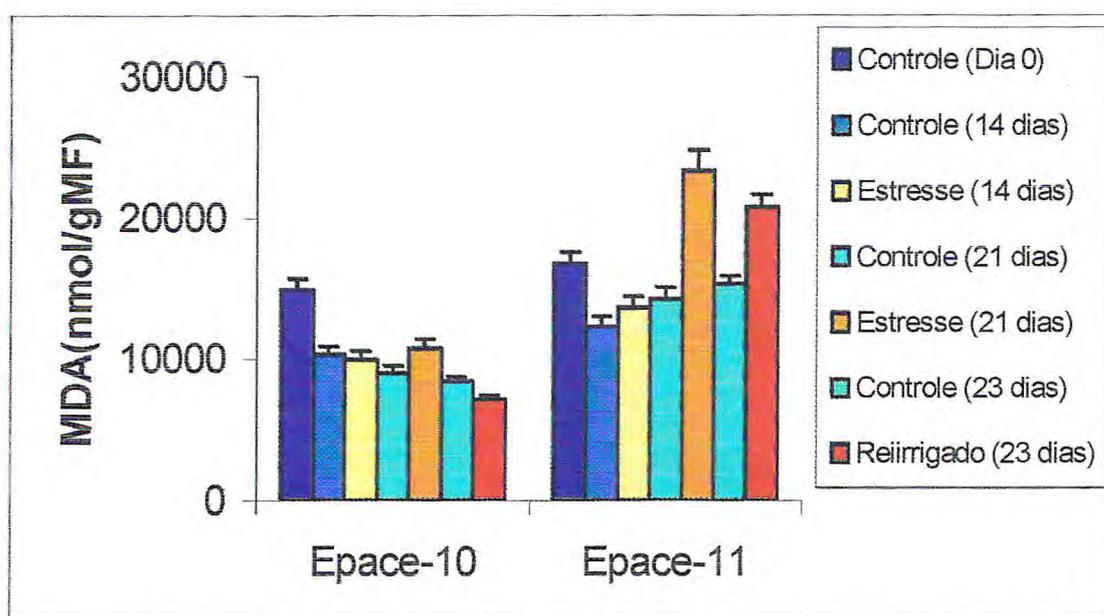


Figura 6 – Teor de lipídeos peroxidados, medidos pela formação do complexo MDA-TBA, em folhas de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 11B)

plantas estressadas, porem persistindo um aumento de 36,1 % em relação as plantas do tratamento controle.

Os níveis de lipídeos peroxidados, apresentados para as plantas do cultivar Epace-11, mesmo para as plantas do tratamento controle foram mais elevados, já no controle do dia zero, do que para as plantas do cultivar Epace-10. Este fato já comprova uma maior fragilidade de Epace-11 em relação a Epace-10 quanto aos mecanismos de proteção contra a ação de radicais livres. Esta maior fragilidade do cultivar Epace-11 em relação a Epace-10 se acentua quando estas plantas são submetidas aos tratamentos de deficiência hídrica. Enquanto que aos 14 dias de suspensão da rega não houve aumento no teor de lipídeos peroxidados para Epace-10, o cultivar Epace-11 já apresentava 18,4 % de aumento. Aos 21 dias de suspensão da rega, as plantas do cultivar Epace-11 mostraram um aumento de cerca de 2,5 vezes em relação ao cultivar Epace-10.

Uma correlação pode ser estabelecida entre a degradação de lipídeos polares, especialmente de MGDG e DGDG, a diminuição do teor em ácidos graxos poliinsaturados e também a redução do índice de insaturação nas plantas do cultivar Epace-11 submetidas a deficiência hídrica, e o teor de lipídeos peroxidados.

Alem do mais, os dados de peroxidação de lipídeos (Figura 6) associados as modificações da estrutura dos ácidos graxos presentes nas membranas celulares, podem ser correlacionados aos de integridade de membranas, mensuradas através do vazamento de eletrólitos (Figura 4). Os dados obtidos neste trabalho tornam evidente, que possivelmente as plantas do cultivar Epace-

11 possuem um mecanismo menos eficiente de controle da formação dos radicais livres induzidos pela deficiência hídrica, quando comparadas com as plantas do cultivar Epace-10.

## 2. Teor de ácidos graxos totais

A análise do teor de ácidos graxos totais das membranas foliares de *Vigna unguiculata*, revelou uma composição típica dos tecidos clorofilados de vegetais superiores, ou seja, um alto teor em ácidos graxos insaturados, principalmente de ácido linolênico (18:3) (FERRARI-ILIOU *et al.*, 1984; HUBAC *et al.*, 1989; MONTEIRO de PAULA *et al.*, 1990; NAVARI-IZZO *et al.*, 1990). O ácido linolênico se constitui no principal componente graxo dos galactolipídeos (MGDG e DGDG) das membranas dos tilacóides, sendo responsável pela grande fluidez dessas membranas (NORBERG *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1987; HUBAC *et al.*, 1989). A cromatografia gasosa de coluna capilar evidenciou a presença dos seguintes ácidos graxos: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), e ácido linoléico (18:2).

Os tratamentos de estresse hídrico induziram comportamentos diferenciados nas plantas estressadas quando comparadas com as plantas do tratamento irrigado, nos dois cultivares (Figuras 7 e 8). A deficiência hídrica foi capaz de induzir modificações nos teores de ácidos graxos nos dois cultivares,

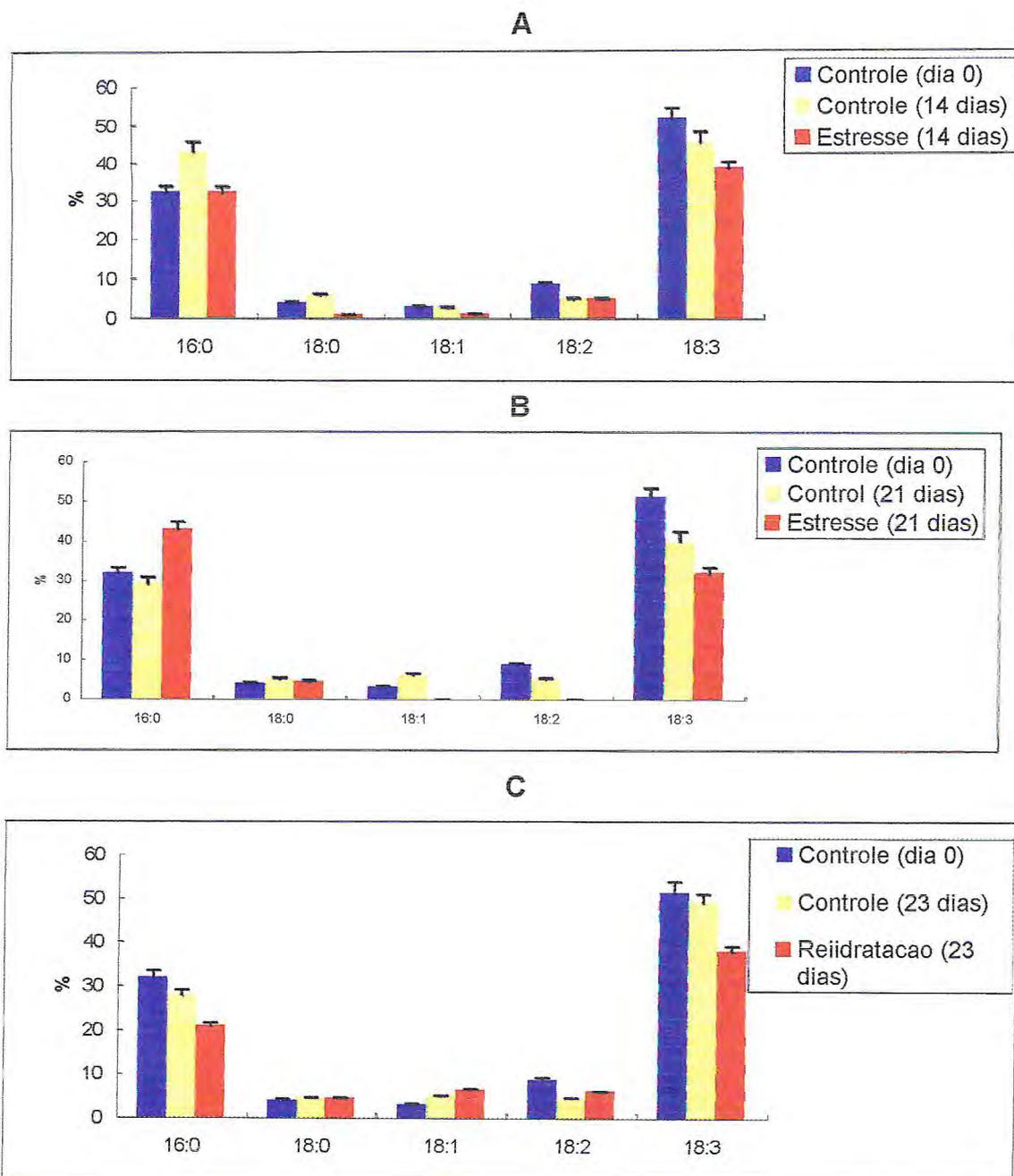


Figure 7 – Teor de Ácidos graxos (%) em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cv. Epace-10 sob condições de déficit hídrico, aos 14 dias de estresse (A), aos 21 dias de estresse (B) e 48 horas após a reidratação, aos 23 dias (C).

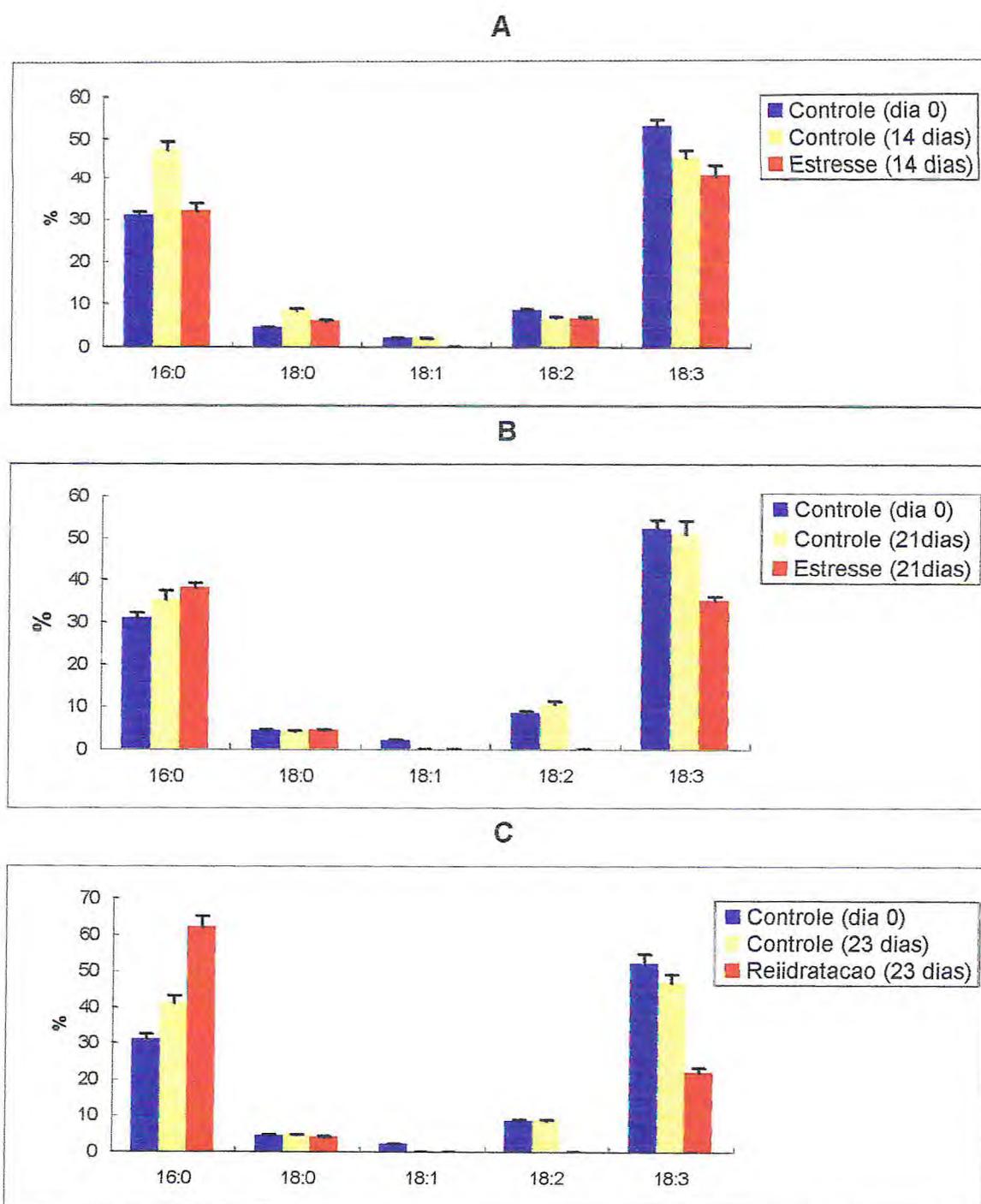


Figure 8 – Teor de Ácidos graxos (%) em folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cv. Epace-11 sob condições de déficit hídrico, aos 14 dias de estresse (A), aos 21 dias de estresse (B) e 48 horas após a reidratação, aos 23 dias (C).

porém as plantas do cultivar Epace – 11 tiveram estes teores afetados de forma mais severa do que as plantas do cultivar Epace – 10. Aos 14 dias de estresse hídrico, as plantas do cultivar Epace –10 apresentaram reduções nos teores de seus ácidos graxos majoritários, ou seja, reduções de 25% e 18% nos teores de ácido palmítico e de ácido linolênico, respectivamente (figura 7a). A mesma tendência foi observada aos 21 dias de estresse para o ácido linolênico, ou seja, uma redução de 30% em relação às plantas controle do início do tratamento (Figura 7b). O teor de ácido palmítico foi aumentado em torno de 15% em relação ao controle do início do período experimental. Resultados semelhantes foram observados por diferentes autores para *Vigna unguiculata* (MONTEIRO de PAULA *et al.*, 1990; FERRARI-LIOU. *et al.*, 1994). Aumento no teor de ácido palmítico e redução no teor de ácido linolênico induzem um desequilíbrio na relação dos ácidos graxos saturados/insaturados, com conseqüências danosas para a estrutura das membranas celulares (PHAM THI *et al.*, 1990). Após a reidratação estas plantas recuperaram satisfatoriamente os níveis iniciais de ácido palmítico e de ácido linolênico (Figura 7c). Os níveis de estresse hídrico aplicado sobre as plantas deste cultivar não foram suficientemente fortes para afetar de forma irreversível o metabolismo dos lipídeos.

As plantas do cultivar Epace-11 apresentaram a mesma tendência observada para Epace – 10, porém o estresse hídrico afetou de forma mais severa as plantas dessa cultivar (Figura 8). O primeiro nível de deficiência hídrica ( $\Psi_H = -0,6$  MPa) obtido aos 14 dias de estresse induziu reduções de 20% e 10% para os ácidos palmítico e linolênico, respectivamente (figura 2-A). O segundo

nível de deficiência hídrica ( $\Psi_H = -1,5$  MPa) obtido aos 21 dias de estresse, provocou mudanças mais acentuadas do que o nível moderado (15 dias) no teor de lipídeos membranares, ou seja, um aumento de 10% de ácido palmítico e uma redução de 25% de ácido linolênico (figura 8b). Esta alteração da relação ácidos graxos saturados/insaturados pode ter induzido mudanças mais danosas das plantas do cultivar Epace – 11 quando comparados com o cultivar Epace – 10. Mesmo 48 horas após a reidratação as plantas do cultivar Epace –11 mantiveram a tendência de desequilíbrio entre ácidos graxos saturados/insaturados (Figura 8c). O teor de ácido palmítico apresentou um aumento de 110%, enquanto o teor de ácido linolênico foi severamente reduzido em torno de 120%. Resultados semelhantes foram encontrados por Stevanovic *et al.* (1987). Estes resultados tornam evidente o efeito do estresse hídrico, de forma irreversível sobre o metabolismo de lipídeos membranares. As plantas do cultivar Epace – 11 tiveram possivelmente, modificações estruturais em suas membranas celulares devido à degradação acentuada de lipídeos polares.

Reduções no teor de ácido linolênico e aumento nos teores de ácido palmítico sugerem que a fluidez das membranas celulares pode ter sido afetada. O ácido linolênico se constitui no principal componente graxo dos galactolipídeos monogalactosil-diacilglicerol (MGDG) e digalactosil-diacilglicerol (DGDG) das membranas dos tilacóides, sendo responsável pela grande fluidez dessas membranas (NORBERG *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1987; HUBAC *et al.*, 1989).

O crescente aumento dos teores de ácido palmítico acompanhado de reduções dos teores de ácido linolênico induziram consequentemente

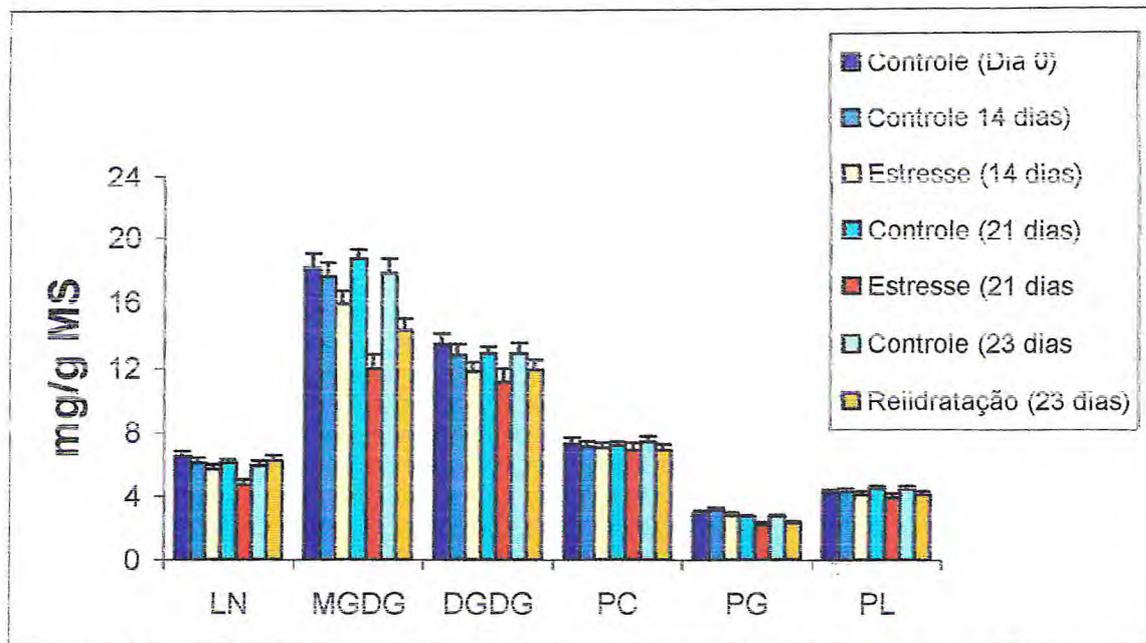
modificações a nível estrutural das membranas celulares. Costa Oliveira (2001) observou uma desorganização estrutural, induzida pelo estresse hídrico, em plantas de caju anão-precoce, devido a uma alteração da relação ácidos graxos saturados/ácidos graxos insaturados. A ação do estresse hídrico sobre a composição dos lipídeos de membranas é bem conhecida estudada. Vários autores encontraram modificações na composição em ácidos graxos em resposta ao estresse hídrico, (Monteiro de Paula *et al.*, 1990) em planta de feijão-de-corda, (HUBAC *et al.*, 1989; WILSON *et al.*, 1987) em algodão e (CHETAL *et al.*, 1981) em trigo e aveia.

Uma diminuição do teor de ácidos graxos poliinsaturados induz alterações metabólicas ao nível das membranas celulares. Esta redução, acompanhada de aumento no teor de ácidos graxos saturados condiciona uma maior rigidez nas membranas celulares (CHETAL *et al.* 1982 e PHAM THI *et al.* 1990). Portanto, alterações na composição e teor dos ácidos graxos das membranas celulares de plantas submetidas estresse hídrico, supostamente tornariam estas membranas menos eficientes na compartimentação das reações enzimáticas. O metabolismo celular seria, portanto afetado em resposta ao estresse hídrico, devido ao fato dos lipídeos estruturais das membranas efetuarem de forma menos eficiente a permeabilidade seletiva. Isto induz processos de senescência precoce e conseqüente perda de produtividade do vegetal (Sylvester & Paulin, 1987; Duxbury *et al.*, 1991; Ferrari-Iliou *et al.*, 1994).

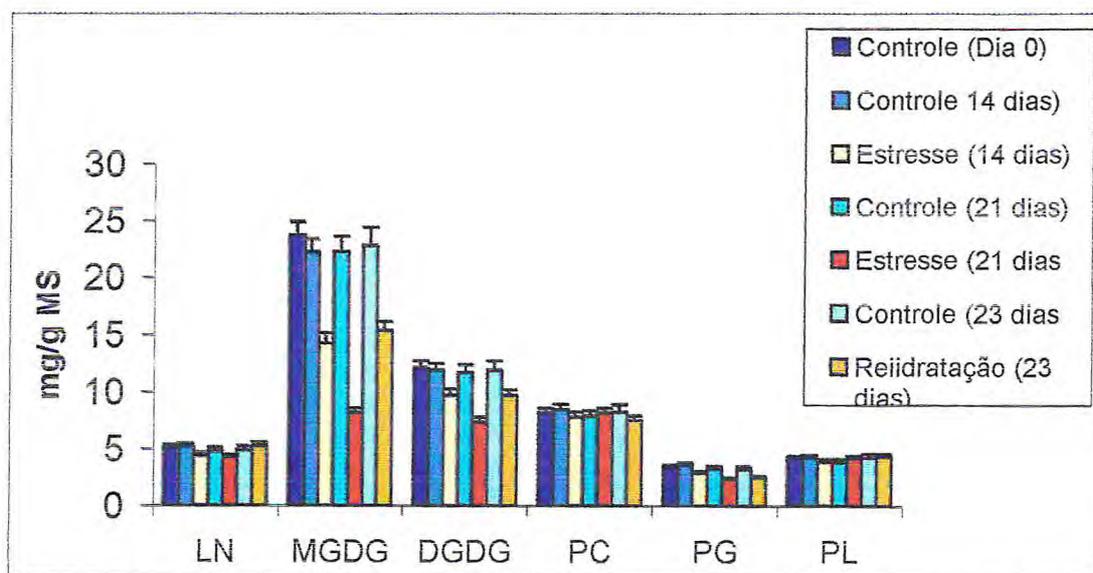
### 3 - Análise das Diferentes Categorias Lipídicas

A análise das diferentes categorias lipídicas separadas por cromatografia de camada fina, revelou um comportamento bastante diferenciado entre os dois cultivares estudados (Figura 9).

As plantas do cultivar Epace-10 apresentaram variações mais importantes ao nível dos galactolipídeos MGDG e DGDG e do fosfolipídeo PG. As outras categorias lipídicas estudadas, ou seja, LN e PL (PE, PI, PA e PS) não apresentaram variações importantes em resposta aos tratamentos de deficiência hídrica (Figura 9a). Para o MGDG, foi observada uma redução de 30,5 % aos 21 dias, para as plantas estressadas em relação aos controles de mesma idade. Após o reinício da rega, as plantas deste cultivar, praticamente mantiveram a mesma tendência de redução para o MGDG, com um decréscimo de 19,7 % em relação ao controle, observando-se, portanto, uma leve recuperação. O teor de DGDG foi menos afetado pela deficiência hídrica, com uma redução de apenas 13,2 % aos 21 dias, em relação ao controle de mesma idade. Após a reidratação, o teor de DGDG foi recuperado de forma mais satisfatória que a observada para o MGDG, ou seja, apresentando uma redução de apenas 7,8 %, em relação ao controle de 23 dias.



A



B

Figura 9 - Diferentes categorias lipídicas presentes nos extratos de lipídeos totais, após separação por CCM, em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para os cultivares Epace-10 (A) e Epace-11 (B).

O único fosfolípido afetado pela deficiência hídrica, em Epace-10, foi o PG, que teve uma redução de 18,5 % aos 21 dias de estresse hídrico, em relação ao tratamento controle. Esta tendência de redução não foi revertida, mesmo após a reidratação, ou seja, uma redução de 14,8 % foi observada nas plantas reidratadas, em relação ao controle. Os níveis de PC permaneceram praticamente constantes durante todo o período experimental. Os outros fosfolípidos (PL) representados pelo PA, PE, PI e PS não sofreram alterações em seus teores, induzidas pela deficiência hídrica.

De forma semelhante à observada para o cultivar Epace-10, as categorias lipídicas mais afetadas pela deficiência hídrica, para o cultivar Epace-11, foram o MGDG e DGDG, para os galactolípidos e PG para os fosfolípidos (Figura 9b).

A degradação dos galactolípidos no cultivar Epace-11, foi mais intensa quando comparada com o cultivar Epace-10. O MGDG teve uma redução de 31,8 % já no primeiro nível de deficiência hídrica, ou seja, aos 14 dias. Esta tendência de redução do teor em MGDG foi mantida para o nível mais severo de deficiência hídrica, atingindo 63,2 % de redução aos 21 dias de estresse, quando comparado ao tratamento controle. Vinte e quatro horas após o reinício da rega, o teor em MGDG foi parcialmente recuperado, porém ainda permanecendo com uma redução de 32,5 % em relação ao controle de mesma idade.

A deficiência hídrica também afetou de forma mais importante o DGDG, para o cultivar Epace-11 que para o cultivar Epace-10. O primeiro nível de deficiência hídrica, atingido aos 14 dias, induziu uma redução de 19,1 % em

relação ao controle, e aos 21 dias de estresse, esta redução foi de 36,8 %, também em relação ao controle. Após o reinício da rega, a redução no teor de DGDG ainda permaneceu elevada, ou seja, 18,5 % em relação ao controle.

O teor em PG também foi afetado pela deficiência hídrica de forma mais importante para o cultivar Epace-11 que para o cultivar Epace-10. As plantas submetidas a deficiência hídrica, apresentaram reduções no teor de PG de 19,4 % aos 14 dias, e 27,3 % aos 21 dias de deficiência hídrica, em relação as plantas do tratamento controle.

A fosfatidilcolina teve um pequeno aumento em massa aos 21 dias de estresse, o que pode ser explicado pelo alto *turnover* dessa categoria lipídica. Possivelmente, parte dos galactolipídeos degradados por ação do estresse hídrico foi convertida em PC, que se constitui na principal categoria de lipídeos envolvida no processo de renovação das membranas celulares.

A degradação de galactolipídeos induzida pela deficiência hídrica, principalmente para o MGDG foi relatada por diferentes autores. Monteiro de Paula *et al.* (1990 e 1993) e Pham Thi *et al.* (1990) em feijão-de-corda encontraram reduções acentuadas desta categoria lipídica em cultivares menos tolerantes a deficiência hídrica. Lauriano *et al.* (2000) também confirmam estes resultados, concluindo que os galactolipídeos, e principalmente o MGDG foi a categoria lipídica mais afetada pela seca em diferentes cultivares de amendoim.

Os resultados obtidos neste trabalho levam a conclusão que as categorias de lipídeos plastídias (MGDG, DGDG e PG) sofreu de forma mais intensa a ação do estresse hídrico, que os lipídeos extraplastidiais. Uma vez que as membranas

dos cloroplastos são ricas em galactolipídeos e também em PG, pode-se concluir também que elas sejam diretamente afetadas em função da degradação destas categorias lipídicas (CHETALI *et al.* 1982, FERRARI-LIOU *et al.*, 1984, MONTEIRO DE PAULA *et al.* 1990 e 1993 e PHAM THI *et al.* 1990). Estas membranas se tornariam, portanto menos fluidas e mais rígidas, ocasionando danos em suas estruturas e conseqüente descompartimentação das reações enzimáticas.

Chetal *et al.*, (1980) estudaram as mudanças nos fosfolipídeos em folhas de trigo e cevada em condição de estresse hídrico do solo, observaram que o conteúdo total de fosfolipídios aumentou nos cultivares tidos como tolerantes a seca. No entanto, o conteúdo total de glicolipídeos, aumentou com a idade e diminuíram em condição de estresse hídrico do solo CHETAL *et al.* (1982).

A análise da repartição dos diferentes ácidos graxos nas classes lipídicas, confirmam a tendência observada para a análise da massa dessas moléculas (Tabelas 5, 6, 7 e 8) para os cultivares Epace-10 e Epace-11.

A tabela 5 mostra que para o cultivar Epace-10 as variações nas porcentagens em ácidos graxos foram mais evidentes para os galactolipídeos MGDG e DGDG e para o fosfolipídeo PG. Para o MGDG, foi observada uma redução de 14,4 % no teor de ácido linolênico e um aumento de cerca de 19 % para o ácido palmítico, aos 21 dias de deficiência hídrica. Os demais ácidos graxos não sofreram variações importantes. Para o DGDG as alterações observadas tanto para o ácido linolênico, como para o ácido palmítico, foram pequenas, não ultrapassando 5 % nos dois ácidos graxos.

Para o PG (Tabela 5), a variação mais importante observada no cultivar Epace-10 foi para o ácido transhexadecenóico (16:1), o qual sofreu uma redução de 12,5 % nas plantas submetidas a deficiência hídrica. As demais categorias lipídicas (LN, PC e PL) não apresentaram variações consideráveis em suas porcentagens de ácidos graxos, nos tratamentos de deficiência hídrica, quando comparadas com as plantas do tratamento controle (Tabela 6).

De forma semelhante à observada para o cultivar Epace-10, as plantas do cultivar Epace-11 também apresentaram variações nas porcentagens de ácidos graxos, principalmente ao nível dos galactolipídeos MGDG e DGDG e do fosfolípido PG (Tabela 7). Porém estas variações, induzidas pelo estresse hídrico foram bem mais intensas no cultivar Epace-11 quando comparadas com o cultivar Epace-10.

Para o MGDG (Tabela 7), o ácido graxo mais afetado pela deficiência hídrica foi o ácido linolênico, que apresentou aos 21 dias de deficiência hídrica, uma redução de 21,2 % em relação as plantas controle da cultivar Epace-11. Mesmo após o reinício da rega, esta tendência de redução para o ácido linolênico não foi alterada, sendo mantida uma redução de 15,2 % em relação ao controle. Para o DGDG, a redução observada aos 21 dias de estresse hídrico, foi bem menor que a observada para o MGDG, ou seja, uma redução de 9 % em relação ao controle. Esta tendência de redução, também foi mantida, de forma semelhante à observada para o MGDG, mesmo 24 horas após o reinício da rega.

Mesmo após o reinício da rega, esta tendência de redução do ácido transhexadecenóico não foi alterada, pois ainda foi mantida uma redução de cerca de 20% em relação às plantas controle. Também para o ácido palmítico o aumento em porcentagem, nas plantas submetidas à deficiência hídrica, persistiu, mesmo após o reinício da rega.

A deficiência hídrica afetou de forma mais importante os teores de alguns ácidos graxos do PG em Epace-11 que em Epace-10. Aos 21 de deficiência hídrica foi observada uma redução 21,3 % no ácido transhexadecenóico (16:1t) em relação as plantas do tratamento controle. Esta tendência de redução do ácido transhexadecenóico foi mantida mesmo 24 horas após a reidratação, ou seja, as plantas reidratadas apresentaram uma redução de 23,1 % em relação ao controle de 23 dias. Um pequeno aumento nos teores dos ácidos palmítico e esteárico também foi observados nas plantas do tratamento de 21 dias de deficiência hídrica.

As outras categorias lipídicas analisadas, ou seja, LN e PL (PA, PE, PI, e PS), não apresentaram variações importantes em resposta aos tratamentos de deficiência hídrica aplicados (Tabela 8). Resultados semelhantes também foram observados para a cultivar Epace-10 (Tabela 6).

A análise da distribuição dos ácidos graxos (em %) para as plantas do cultivar Epace-11, revelou variações mais importantes quando comparada com os resultados obtidos para o cultivar Epace 10.

Tabela 5 – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para MGDG, DGDG, em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para o cultivar EPACE-10.

|                    |                    | 16:0             | 16:1         | 18:0         | 18:1 | 18:2 | 18:3         |
|--------------------|--------------------|------------------|--------------|--------------|------|------|--------------|
| MGDG               | Controle (Dia 0)   | 3,8              | 0            | 0,5          | 0,6  | 2,8  | 92,3<br>±4,1 |
|                    | Controle (14 dias) | 3,5              | 0            | 0,3          | 0,7  | 2,1  | 93,4<br>±3,3 |
|                    | Estresse (14 dias) | 3,1              | 0            | 0,4          | 0,6  | 3,1  | 92,8<br>±4,9 |
|                    | Controle (21 dias) | 3,1              | 0            | 0,6          | 0,6  | 4,5  | 91,2<br>±6,1 |
|                    | Estresse (21 dias) | 7,8              | 0            | 2,7          | 2,6  | 7,8  | 78,1<br>±5,2 |
|                    | Controle (23 dias) | 2,9              | 0            | 0,7          | 0,7  | 3,2  | 92,5<br>±3,8 |
|                    | Reirrigado         | 2,7              | 0            | 0,6          | 0,9  | 3,9  | 91,9<br>±3,9 |
|                    | DGDG               | Controle (Dia 0) | 11,8         | 0            | 3,1  | 1,2  | 6,6          |
| Controle (14 dias) |                    | 11,5             | 0            | 2,9          | 0,9  | 4,9  | 79,8<br>±4,8 |
| Estresse (14 dias) |                    | 12,3             | 0            | 2,8          | 0,8  | 3,4  | 80,7<br>±4,2 |
| Controle (21 dias) |                    | 11,8             | 0            | 3,3          | 1,1  | 4,4  | 79,4<br>±3,9 |
| Estresse (21 dias) |                    | 12,7             | 0            | 3,6          | 1,8  | 4,6  | 77,3<br>±3,7 |
| Controle (23 dias) |                    | 10,8             | 0            | 2,9          | 0,9  | 4,7  | 80,7<br>±3,5 |
| Reirrigado         |                    | 10,5             | 0            | 3,6          | 0,8  | 5,5  | 79,6<br>±3,2 |
| PG                 |                    | Controle (Dia 0) | 44,4<br>±2,1 | 29,7<br>±1,5 | 5,8  | 8,8  | 3,2          |
|                    | Controle (14 dias) | 42,7<br>±2,0     | 30,3<br>±1,7 | 6,3          | 9,6  | 3,5  | 7,6          |
|                    | Estresse (14 dias) | 41,2<br>±1,7     | 32,4<br>±1,6 | 6,1          | 9,8  | 3,1  | 7,4          |
|                    | Controle (21 dias) | 41,9<br>±1,6     | 31,3<br>±1,7 | 6,6          | 7,3  | 3,8  | 9,1          |
|                    | Estresse (21 dias) | 44,2<br>±2,1     | 27,4<br>±1,4 | 7,2          | 9,2  | 3,4  | 8,6          |
|                    | Controle (23 dias) | 41,3<br>±2,2     | 29,9<br>±1,3 | 7,7          | 8,7  | 3,6  | 8,8          |
|                    | Reirrigado         | 42,1<br>±1,9     | 28,3<br>±1,2 | 7,5          | 9,6  | 3,1  | 9,4          |

Tabela 6 – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para LN, PC e PL, em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para o cultivar EPACE-10.

| Classes Lipídicas |                    | 16:0             | 16:1         | 18:0 | 18:1 | 18:2         | 18:3         |
|-------------------|--------------------|------------------|--------------|------|------|--------------|--------------|
| LN                | Controle (Dia 0)   | 19,4<br>±0,5     | 27,2<br>±1,1 | 6,8  | 9,3  | 7,8          | 29,5<br>±0,9 |
|                   | Controle (14 dias) | 19,9<br>±0,4     | 28,1<br>±1,2 | 6,5  | 8,4  | 8,3          | 28,8<br>±1,2 |
|                   | Estresse (14 dias) | 18,5<br>±0,5     | 28,6<br>±1,3 | 7,9  | 9,7  | 7,2          | 28,1<br>±1,3 |
|                   | Controle (21 dias) | 18,4<br>±0,6     | 29,5<br>±1,2 | 6,7  | 7,9  | 7,7          | 29,8<br>±1,1 |
|                   | Estresse (21 dias) | 21,3<br>±0,9     | 39,4<br>±2,1 | 7,2  | 6,9  | 7,1          | 28,1<br>±1,2 |
|                   | Controle (23 dias) | 21,9<br>±0,8     | 28,1<br>±2,2 | 6,7  | 6,7  | 7,9          | 29,7<br>±0,9 |
|                   | Reirrigado         | 21,3<br>±0,7     | 29,3<br>±1,8 | 7,3  | 6,8  | 7,1          | 28,2<br>±0,8 |
|                   | PC                 | Controle (Dia 0) | 31,7<br>±2,1 | 0    | 6,8  | 7,9          | 13,8         |
|                   | Controle (14 dias) | 32,6<br>±1,9     | 0            | 6,4  | 8,8  | 13,7         | 38,5<br>±1,5 |
|                   | Estresse (14 dias) | 32,4<br>±1,8     | 0            | 6,4  | 10,9 | 12,1         | 38,2<br>±1,4 |
|                   | Controle (21 dias) | 32,3<br>±1,8     | 0            | 5,9  | 10,2 | 12,5         | 39,1<br>±1,3 |
|                   | Estresse (21 dias) | 35,6<br>±1,7     | 0            | 6,2  | 8,3  | 11,1         | 38,8<br>±1,8 |
|                   | Controle (23 dias) | 34,5<br>±1,6     | 0            | 6,9  | 9,6  | 11,8         | 37,2<br>±1,8 |
|                   | Reirrigado         | 34,8<br>±1,4     | 0            | 6,7  | 10,4 | 10,2         | 37,9<br>±1,7 |
| PL                | Controle (Dia 0)   | 32,7<br>±1,6     | 0            | 7,9  | 3,8  | 16,9<br>±0,5 | 38,7<br>±1,7 |
|                   | Controle (14 dias) | 32,8<br>±1,5     | 0            | 8,0  | 3,7  | 18,1<br>±0,4 | 37,4<br>±1,8 |
|                   | Estresse (14 dias) | 31,3<br>±1,2     | 0            | 9,7  | 3,1  | 18,7<br>±0,7 | 37,5<br>±1,5 |
|                   | Controle (21 dias) | 33,4<br>±1,3     | 0            | 6,5  | 2,9  | 18,9<br>±0,7 | 38,3<br>±1,9 |
|                   | Estresse (21 dias) | 32,7<br>±1,2     | 0            | 9,4  | 2,7  | 17,3<br>±0,6 | 37,9<br>±1,8 |
|                   | Controle (23 dias) | 34,2<br>±1,4     | 0            | 6,7  | 2,8  | 18,7<br>±0,9 | 37,6<br>±1,6 |
|                   | Reirrigado         | 35,4<br>±1,3     | 0            | 8,7  | 2,5  | 17,5<br>±0,6 | 35,9<br>±1,7 |

Tabela 7 – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para MGDG, DGDG, em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para o cultivar EPACE-11.

| Classes Lipídicas  |                    | 16:0             | 16:1         | 18:0         | 18:1 | 18:2 | 18:3         |
|--------------------|--------------------|------------------|--------------|--------------|------|------|--------------|
| MGDG               | Controle (Dia 0)   | 2,9              | 0            | 0,3          | 0,9  | 4,7  | 91,2<br>±5,8 |
|                    | Controle (14 dias) | 2,7              | 0            | 0,4          | 0,7  | 3,4  | 92,8<br>±5,7 |
|                    | Estresse (14 dias) | 3,3              | 0            | 0,8          | 0,8  | 4,5  | 90,1<br>±4,8 |
|                    | Controle (21 dias) | 2,8              | 0            | 0,7          | 0,5  | 4,2  | 91,8<br>±5,1 |
|                    | Estresse (21 dias) | 8,3              | 0            | 3,8          | 2,8  | 8,8  | 72,3<br>±4,9 |
|                    | Controle (23 dias) | 2,8              | 0            | 1,0          | 1,0  | 3,9  | 93,3<br>±5,2 |
|                    | Reirrigado         | 3,9              | 0            | 0,8          | 0,6  | 5,6  | 79,1<br>±5,0 |
|                    | DGDG               | Controle (Dia 0) | 11,7         | 0            | 3,3  | 0,9  | 7,5          |
| Controle (14 dias) |                    | 11,5             | 0            | 3,2          | 0,8  | 6,6  | 77,9<br>±4,1 |
| Estresse (14 dias) |                    | 11,8             | 0            | 4,6          | 0,6  | 7,8  | 75,2<br>±3,8 |
| Controle (21 dias) |                    | 11,1             | 0            | 3,4          | 1,3  | 5,9  | 78,3<br>±4,2 |
| Estresse (21 dias) |                    | 14,9             | 0            | 4,5          | 1,4  | 7,0  | 72,2<br>±4,1 |
| Controle (23 dias) |                    | 12,2             | 0            | 2,7          | 0,7  | 6,9  | 77,5<br>±4,3 |
| Reirrigado         |                    | 13,3             | 0            | 2,6          | 0,8  | 8,8  | 74,5<br>±4,0 |
| PG                 |                    | Controle (Dia 0) | 42,5<br>±1,9 | 29,6<br>±1,1 | 6,1  | 9,1  | 3,5          |
|                    | Controle (14 dias) | 41,1<br>±1,8     | 28,4<br>±1,2 | 6,8          | 11,1 | 3,7  | 8,9          |
|                    | Estresse (14 dias) | 45,8<br>±2,1     | 27,5<br>±1,5 | 6,5          | 10,2 | 2,9  | 7,1          |
|                    | Controle (21 dias) | 42,9<br>±2,2     | 28,8<br>±1,6 | 6,6          | 9,3  | 3,8  | 8,6          |
|                    | Estresse (21 dias) | 47,5<br>±1,8     | 21,5<br>±1,4 | 8,5          | 11,2 | 3,8  | 7,5          |
|                    | Controle (23 dias) | 42,4<br>±1,7     | 28,8<br>±1,3 | 6,6          | 10,9 | 3,4  | 7,9          |
|                    | Reirrigado         | 45,1<br>±1,9     | 22,1<br>±1,7 | 9,5          | 13,1 | 3,9  | 6,3          |

Tabela 8 – Teores em Ácidos Graxos (em %), obtidos por cromatografia gasosa, para LN, PC e PL, em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para o cultivar EPACE-11.

| Classes Lipídicas  |                    | 16:0             | 16:1         | 18:0 | 18:1 | 18:2         | 18:3         |
|--------------------|--------------------|------------------|--------------|------|------|--------------|--------------|
| LN                 | Controle (Dia 0)   | 18,5<br>±0,5     | 31,3<br>±1,5 | 8,1  | 12,9 | 3,9          | 25,3<br>±1,2 |
|                    | Controle (14 dias) | 19,3<br>±0,7     | 32,2<br>±1,7 | 5,5  | 11,9 | 5,8          | 25,3<br>±0,9 |
|                    | Estresse (14 dias) | 20,1<br>±0,4     | 31,3<br>±1,6 | 5,6  | 12,7 | 6,2          | 24,1<br>±1,1 |
|                    | Controle (21 dias) | 20,7<br>±0,8     | 31,8<br>±1,9 | 5,9  | 12,9 | 5,8          | 22,9<br>±1,0 |
|                    | Estresse (21 dias) | 21,7<br>±0,9     | 30,8<br>±1,5 | 8,3  | 13,9 | 6,2          | 19,1<br>±0,9 |
|                    | Controle (23 dias) | 20,3<br>±0,7     | 31,3<br>±1,3 | 8,1  | 13,5 | 6,1          | 20,7<br>±0,9 |
|                    | Reirrigado         | 22,8<br>±0,6     | 29,1<br>±1,6 | 7,7  | 14,5 | 6,8          | 19,1<br>±1,1 |
|                    | PC                 | Controle (Dia 0) | 30,6<br>±1,7 | 0    | 5,6  | 10,6         | 11,6         |
| Controle (14 dias) |                    | 31,1<br>±1,6     | 0            | 5,9  | 11,8 | 11,7         | 39,5<br>±1,9 |
| Estresse (14 dias) |                    | 32,8<br>±1,5     | 0            | 5,8  | 13,1 | 11,2         | 37,1<br>±1,7 |
| Controle (21 dias) |                    | 31,9<br>±1,4     | 0            | 5,7  | 11,4 | 11,8         | 39,2<br>±1,9 |
| Estresse (21 dias) |                    | 36,5<br>±1,9     | 0            | 5,4  | 9,9  | 11,7         | 38,5<br>±1,8 |
| Controle (23 dias) |                    | 35,9<br>±1,2     | 0            | 6,1  | 9,3  | 11,2         | 37,5<br>±2,1 |
| Reirrigado         |                    | 33,9<br>±1,1     | 0            | 6,9  | 10,5 | 10,8         | 37,9<br>±1,9 |
| PL                 |                    | Controle (Dia 0) | 31,8<br>±1,6 | 0    | 7,1  | 4,1          | 18,8<br>±0,9 |
|                    | Controle (14 dias) | 30,1<br>±1,4     | 0            | 8,5  | 3,1  | 19,2<br>±1,2 | 38,6<br>±1,5 |
|                    | Estresse (14 dias) | 29,8<br>±1,3     | 0            | 10,1 | 3,5  | 18,7<br>±1,1 | 37,9<br>±1,6 |
|                    | Controle (21 dias) | 30,3<br>±1,1     | 0            | 11,6 | 2,9  | 18,9<br>±0,8 | 36,3<br>±1,2 |
|                    | Estresse (21 dias) | 31,2<br>±1,3     | 0            | 7,7  | 3,7  | 18,2<br>±1,3 | 39,2<br>±1,9 |
|                    | Controle (23 dias) | 20,1<br>±0,6     | 0            | 9,1  | 3,9  | 18,1<br>±1,2 | 38,7<br>±2,1 |
|                    | Reirrigado         | 32,4<br>±1,4     | 0            | 9,8  | 2,4  | 16,8<br>±1,1 | 38,6<br>±1,9 |

De forma semelhante à encontrada para o cultivar Epace-10, as variações mais importantes foram observadas para os galactolipídeos MGDG e DGDG e para o fosfolipídeo PG, nas plantas submetidas à deficiência hídrica. Embora haja esta semelhança de comportamento, as variações observadas em Epace-11 foram muito mais importantes que para Epace-10.

As alterações observadas, principalmente nas plantas do cultivar Epace-11 submetidas à deficiência hídrica, quando comparadas ao cultivar Epace-10, confirmam a maior tendência de fragilidade dessas plantas em resposta ao estresse hídrico. Quando se estabelece uma comparação entre o teor em massa das categorias lipídicas e as porcentagens em ácidos graxos, pode-se encontrar uma correlação positiva entre a degradação de MGDG e a diminuição em ácido linolênico, principalmente para as plantas do cultivar Epace-11 submetidas à deficiência hídrica. Esta correlação fica mais evidente se forem comparadas às figuras 9b e a tabela 7.

Uma diminuição na porcentagem em ácido linolênico e aumento na porcentagem de ácido palmítico, observada ao nível do MGDG para o cultivar Epace-11, em condições de deficiência hídrica, pode conduzir a uma desestruturação das membranas celulares. Esta desorganização membranar deve ocorrer principalmente ao nível das membranas dos cloroplastos, uma vez que o MGDG assim como o DGDG são os principais lipídeos presentes nessas membranas. Além do mais, o PG, um outro lipídeo plastidial, também teve seus teores alterados em condições de salinidade em Epace-11, ao nível do ácido transhexadecenóico (redução de 21,5 %). O PG, juntamente com o ácido

transhexadecenóico, possui um papel importante na absorção de energia luminosa ao nível do fotossistema II do aparelho fotossintético, dessa forma, a desorganização membranar induzida pela deficiência hídrica nestas plantas pode afetar a fotossíntese e conseqüentemente a produtividade vegetal (LALAGUNA e AGUTO, 1990).

Monteiro de Paula *et al.* (1990 e 1993) e Pham Thi *et al.* (1990) encontraram resultados semelhantes trabalhando com feijão-de-corda, onde as plantas menos tolerante a deficiência hídrica sofreram modificações no balanço ácidos graxos saturados/ácidos graxos insaturados. O desequilíbrio neste balanço leva a alterações nos índices de insaturações dos lipídeos das membranas celulares.

#### **4. Índice de Insaturação dos Ácidos Graxos Totais e das Principais Classes Lipídicas**

O Índice de Insaturação para os Ácidos Graxos Totais confirmou a mesma tendência observada na análise dos teores desses ácidos, para as duas cultivares analisados, ou seja, uma redução acentuada para os ácidos graxos poliinsaturados, em função da evolução da deficiência hídrica, para o cultivar Epace-11 e pouca variação para o cultivar Epace-10 (Figura 10).

Para as plantas do cultivar Epace-10, pode-se observar uma pequena redução no Índice de Insaturação entre o controle do dia zero, controle aos 15

dias. Esta redução pode ser explicada pelo próprio comportamento das membranas celulares face ao estresse hídrico imposto (Figura 10). Uma redução de 14,28 % foi observada nas plantas aos 15 dias de estresse hídrico, em relação ao controle. Aos 21 dias de estresse, foi observada uma redução menor no Índice de Insaturação, ou seja, 8,7 % de redução, em relação às plantas controle de mesma idade. Vinte e quatro horas após o reinício da rega, as plantas desta cultivar recuperaram o Índice de Insaturação de seus Ácidos Graxos Totais, pois as plantas do tratamento estressado tiveram praticamente o mesmo índice de Insaturação das plantas do tratamento controle.

As plantas da cultivar Epace-11, apresentaram um comportamento diferenciado, em relação ao Índice de Insaturação, quando comparado com as plantas da cultivar Epace-10 (Figura 10). Estas plantas apresentaram um aumento de 15,8% no Índice de Insaturação, para o tratamento estressado de 15 dias de suspensão da rega, em relação às plantas controle de mesma idade. Este aumento, possivelmente, pode ser explicado, como uma defesa da planta para manter suas membranas fluidas e metabolicamente ativas. Porém, aos 21 dias de suspensão da rega, o decréscimo observado foi 35 % para as plantas submetidas ao regime de carência hídrica, em relação às plantas do tratamento controle. Esta tendência de redução do Índice de Insaturação dos Ácidos Graxos Totais foi mantida para as plantas da cultivar Epace-11, mesmo 24 horas após o reinício da rega.

Estes resultados tornam evidente um maior efeito do estresse hídrico severo (alcançado aos 21 dias de suspensão da rega) sobre o índice de

insaturação, para a cultivar Epace-11, quando comparado com a cultivar Epace-10. Este fato está diretamente relacionado à redução observada no teor de ácido linolênico e conseqüente aumento do teor em ácido palmítico (Figura 9b).

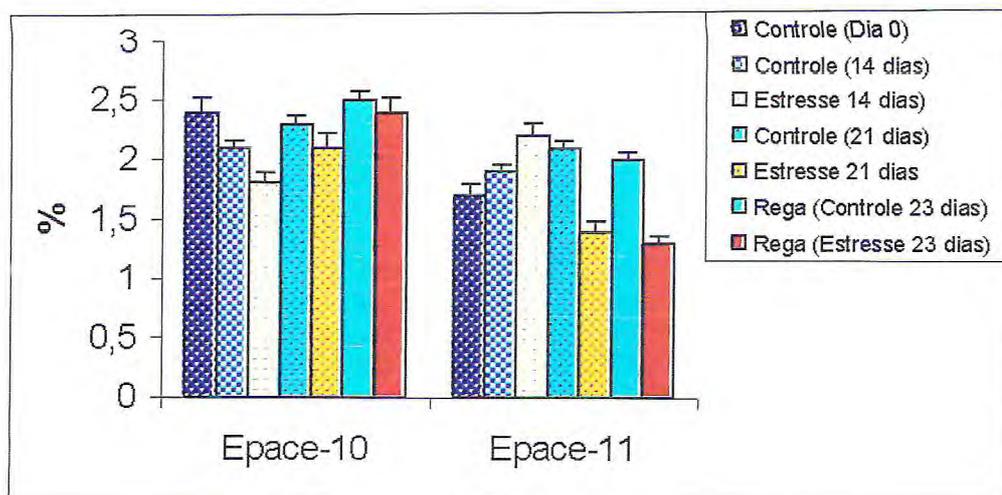


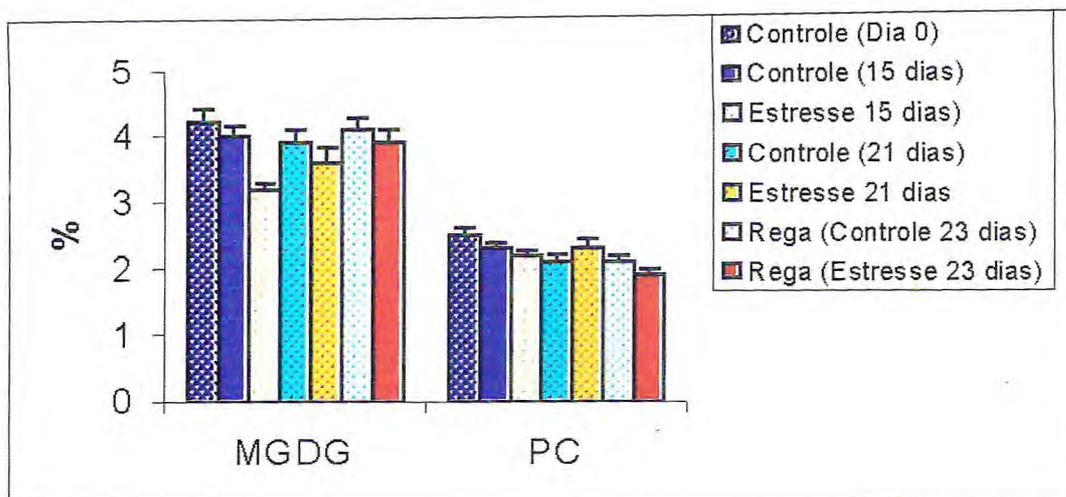
Figura 10 - Índice de Insaturação dos Ácidos Graxos Totais para as cultivares Epace-10 e Epace-11 em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp).

Reduções nos teores de ácidos graxos poliinsaturados podem induzir alterações metabólicas ao nível das membranas celulares, principalmente, quando acompanhada de aumento no teor de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico, por exemplo, condiciona uma maior rigidez nas membranas celulares. Estas membranas se tornariam, conseqüentemente, menos eficientes na compartimentação das reações enzimáticas, devido a esta alteração da composição inicial em ácidos graxos. O metabolismo celular seria, portanto afetado em resposta ao estresse hídrico, devido ao fato dos lipídeos estruturais das membranas efetuarem de forma menos eficiente a permeabilidade seletiva. Isto induz processos de senescência precoce e conseqüente perda de produtividade do vegetal (SYLVESTER e PAULIN, 1987; DUXBURY *et al.*, 1991; MONTEIRO DE PAULA *et al.*, 1990; FERRARI-ILIOU *et al.*, 1994).

O Índice de Insaturação para as classes lipídicas foi analisado apenas para o MGDG e para o PC, uma vez que estas categorias lipídicas são as representantes majoritárias para os galactolipídeos e fosfolipídeos, respectivamente (Figura 11). Estes resultados confirmam a tendência observada para o Índice de Insaturação analisado para os Ácidos Graxos Totais (Figura 10).

As plantas do cultivar Epace-10 apresentaram menor variação do Índice de Insaturação, para o MGDG e também para o PC, tanto para as plantas mantidas irrigadas como para as plantas submetidas a deficiência hídrica.

A



B

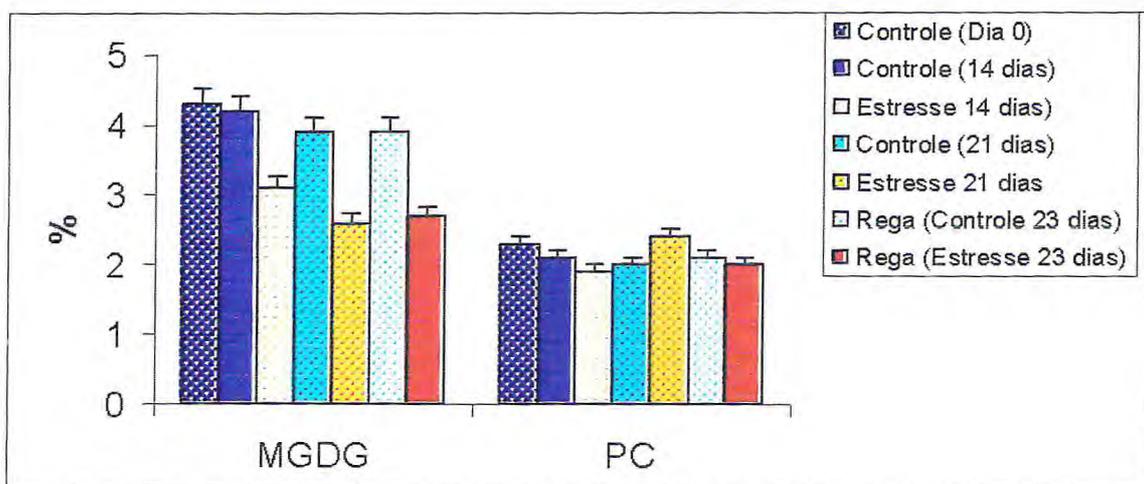


Figura 11 - Índice de Insaturação, em porcentagem, em MGDG e PC, a partir de extratos lipofílicos de folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) para os cultivares Epace-10 (A) e Epace-11 (B).

As plantas do tratamento irrigado, mantiveram sempre seus Índices de Insaturação por volta de 4 %, para o MGDG, enquanto que para o PC, o Índice de Insaturação ficou situado por volta dos 2,5 %, também para as plantas irrigadas. As plantas submetidas à deficiência hídrica apresentaram a menor redução no 14º dia de suspensão da rega, ou seja, uma redução de 9,5 % em relação as plantas controle de mesma idade (Figura 11a). Tanto para o MGDG como para o PC, 21 dias de suspensão de rega não foram suficientes para afetar os Índices de Insaturação dessas categorias lipídicas. Estes resultados confirmam a tendência observada para o Índice de Insaturação dos Ácidos Graxos Totais, onde este mesmo nível de estresse reduziu em apenas 8,7 % o Índice de Insaturação neste cultivar (Figura 10). Após o reinício da rega as plantas submetidas à deficiência hídrica apresentaram valores de Índice de Insaturação muito próximos aos observados para as plantas do tratamento controle.

A análise do Índice de Insaturação para as plantas da cultivar Epace-11, de forma semelhante à observada para o cultivar Epace-10, revela pouca alteração para as plantas mantidas irrigadas, tanto para o MGDG como para o PC (Figura 11b). As plantas submetidas à deficiência hídrica, porém, apresentaram um comportamento bem diferente do observado para o cultivar Epace-10, tanto para o MGDG como para o PC. Para o MGDG o Índice de Insaturação já foi reduzido, de forma importante, aos 15 dias de suspensão da rega, ou seja, 26,2 % de redução em relação as plantas irrigadas. Aos 21 dias de estresse hídrico, estas plantas apresentaram uma redução de 33,3 % em

relação ao tratamento controle. Mesmo após o reinício da rega, esta tendência não foi alterada. Para o PC, o Índice de Insaturação diminuiu somente aos 15 dias de estresse hídrico, com uma redução de 9,5 % em relação ao controle. Aos 21 dias de suspensão da rega, o Índice de Insaturação do PC teve um aumento de 20 % em relação ao controle, e mesmo após o reinício da rega, esta tendência foi mantida.

Monteiro de Paula *et al.* 1990) encontraram resultados semelhantes também trabalhando com dois cultivares de *Vigna unguiculata*, onde os Índices de Insaturação para o MGDG decresciam de forma expressiva no cultivar menos tolerante ao déficit hídrico enquanto que para o PC, ocorria um aumento em função da intensidade da deficiência hídrica.

O *turnover* do PC é muito intenso nas plantas, pois estas precisam renovar constantemente seus lipídeos membranares. Possivelmente, neste trabalho, a degradação de MGDG, observada pela diminuição do Índice de Insaturação, é revertida para síntese de PC, em uma tentativa das plantas desta cultivar de recuperarem seus lipídeos de membranas e conseqüentemente seus níveis iniciais de insaturação. Pham Thi *et al.* (1990) e Monteiro de Paula *et al.* (1993) confirmaram o alto *turnover* do PC, em detrimento da degradação do MGDG em cultivar de *Vigna unguiculata* menos tolerante a seca.

Os resultados obtidos através da análise do Índice de Insaturação para os Ácidos Graxos totais e para as categorias lipídicas, confirmam a menor tolerância da cultivar Epace-11 ao déficit hídrico, em relação a cultivar Epace-10.

## 5. Análise de atividade das diferentes enzimas antioxidativas

A análise de atividade das enzimas do sistema de destoxificação celular mostrou comportamentos diferenciados para os dois cultivares estudados, tanto em função do tempo quanto em função dos tratamentos de deficiência hídrica aplicados.

A atividade da enzima SOD para o cultivar Epace 10 apresentou aumentos crescentes tanto em função do tempo, para as plantas dos tratamentos controle, como em função dos tratamentos de deficiência hídricos aplicados (Figura 12). Mesmo 24 horas após o reinício da rega, as plantas deste cultivar não alteraram a tendência de aumento de atividade da SOD. As plantas do tratamento estressado, após a reirrigação, apresentaram os mais altos níveis de atividade da SOD, com um aumento de 175 % em relação às plantas controle aos 14 dias (Figura 12).

As plantas do cultivar Epace 11, apresentaram comportamento semelhante para a atividade da SOD, em relação ao cultivar Epace 10, ou seja, aumentos na atividade tanto para as plantas controle como para as plantas submetidas à deficiência hídrica (Figura 12). Porém o nível mais elevado de atividade para a SOD não foi obtido após a reirrigação, e sim para as plantas do tratamento estressado de 21 dias, ou seja, 212 % de aumento em relação ao controle de 14 dias (Figura 12).

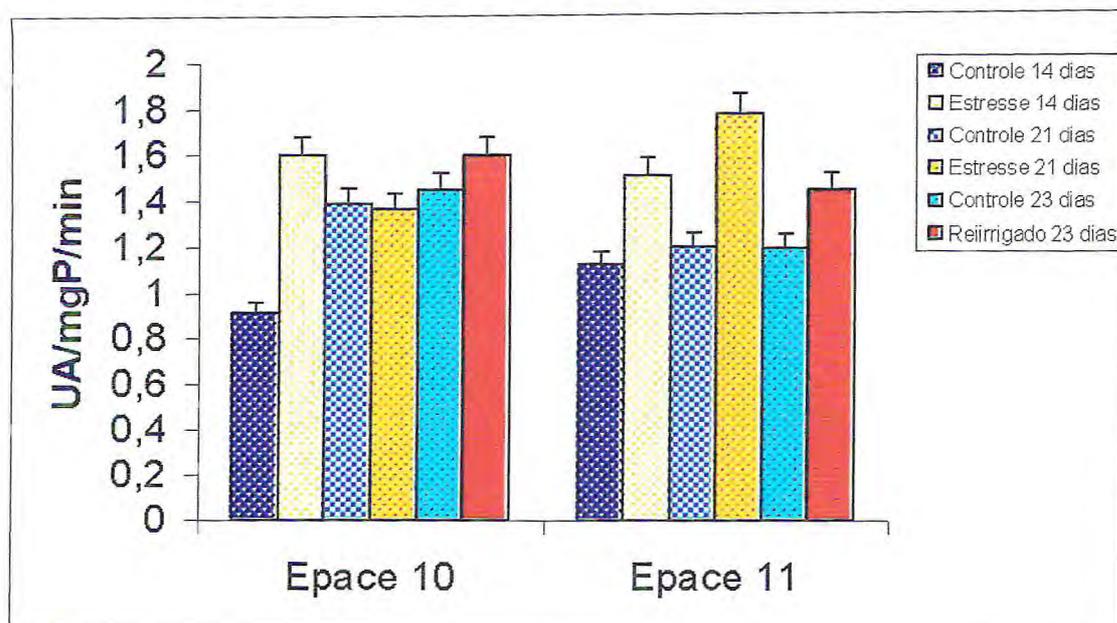


Figura 12 – Atividade específica da enzima SOD em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 11.

O aumento de atividade da SOD, para as plantas não submetidas aos tratamentos de deficiência hídrica, não era esperado. Este aumento de atividade enzimática pode ter sido ocasionado pelo próprio envelhecimento natural das plantas, com a conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio.

A atividade da SOD em plantas submetidas à deficiência hídrica, não é muito estudada. Balakumar *et al.*(1993) encontraram aumento na atividade específica da SOD em plantas submetidas à deficiência hídrica e também a tratamentos de UV-B. Estes autores sugerem que o aumento de atividade da SOD estaria relacionado a participação dessa enzima na eliminação das espécies reativas de oxigênio, formadas em resposta aos estresses impostos.

A atividade da CAT para as plantas do cultivar Epace 10, foi sempre superior nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos de deficiência hídrica, em relação aos controles de mesma idade. O maior aumento de atividade específica da CAT foi observado para as plantas estressadas de 14 dias de suspensão da rega, ou seja, um aumento de 80 % em relação as plantas controle de mesma idade. A partir do 14<sup>o</sup> dia de suspensão da rega, pode-se observar decréscimos gradativos na atividade da CAT para o 21<sup>o</sup> de deficiência hídrica e também para as plantas reirrigadas. No entanto, deve-se salientar, que embora tenha havido este decréscimo de atividade da CAT nas plantas submetidas à deficiência hídrica, os valores de atividades específicas foram sempre superiores aos observados para as plantas controle.

Hernandes *et al.* (1993) encontraram reduções de atividade específica da CAT tanto em *Phaseolus vulgaris* como em *Vigna unguiculata* quando

submetidas à deficiência hídrica. Bafiani, *et al.* (1990) encontraram aumentos de atividade tanto da SOD como da CAT e da POX em plantas submetidas à deficiência hídrica, sugerindo que estas enzimas, podem se constituir em uma defesa contra a formação de radicais livres causadas pela deficiência hídrica.

A atividade da catalase nas plantas do cultivar Epace 10 apresentou decréscimo gradativo tanto para as plantas controle, como para as plantas submetidas aos diferentes níveis de deficiência hídrica. O decréscimo de atividade específica para a CAT, nas plantas controle, pode ser devido à própria senescência natural destas plantas (Figura 13). O decréscimo em atividade para a CAT, nas plantas controle de 23 dias, foi de 73% em relação ao controle de 14 dias. A atividade específica da CAT para as plantas submetidas à deficiência hídrica, embora tendo um decréscimo gradativo em função do tempo e dos tratamentos de deficiência hídrica aplicados, sempre foi superior a atividade observada nas plantas dos tratamentos controle. Este comportamento foi semelhante ao observado para a enzima SOD, neste mesmo cultivar.

As plantas da cultivar Epace 11 tiveram um comportamento semelhante ao observado para as plantas da cultivar Epace 10, em relação a atividade da CAT (Figura 13), isto é, decréscimos gradativos de atividade específica, em função do tempo e da deficiência hídrica. O decréscimo na atividade específica para a CAT foi mais evidente para a cultivar Epace 11 que para Epace 10, em resposta à deficiência hídrica. O menor valor de atividade para CAT foi observado aos 23 dias de plantio, isto é, 24 horas após o reinício das rega, com

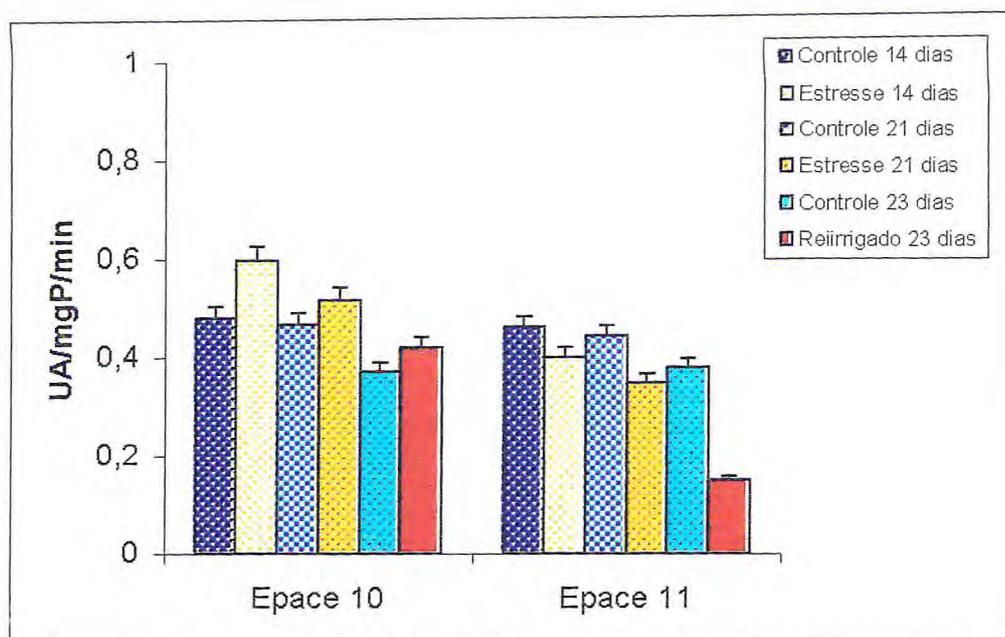


Figura 13 – Atividade específica da enzima CAT em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 11.

uma redução de 73% em relação ao controle do início do período experimental. Este fato comprova uma menor eficiência das plantas do cultivar Epace 11 em relação a Epace 10, na utilização da enzima CAT para remoção do peróxido de hidrogênio formado em resposta ao estresse hídrico.

Segundo Schanaider (2003), quando os teores de catalase e de SOD diminuem em um tecido, este tecido perde sua capacidade de proteção contra a produção e acúmulo de radicais livres, em outras palavras, as células não estariam mais habilitadas a eliminarem estas moléculas de elevada toxicidade. Grande redução na atividade da CAT pode ter como consequência uma superprodução de superóxidos e peróxido de hidrogênio, induzidas pela senescência, que por sua vez pode ter sido provocada tanto pelo estresse salino como pelo estresse hídrico Del Rio *et al.* (1998). Segundo estes autores, este excesso de produção de ROS, pode ser aliviado em certas plantas, pela mobilização das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, presentes geralmente nos peroxissomos.

A enzima APX apresentou atividade específica variando de forma semelhante à observada para SOD e CAT para as plantas do cultivar Epace 10, ou seja, decréscimos gradativos de atividade tanto para as plantas controle quanto para as plantas submetidas à deficiência hídrica (Figura 14). Ainda de forma semelhante aos resultados encontrados para SOD e CAT, a atividade específica da APX, para as plantas estressadas foi sempre superior à observada para as plantas controle.

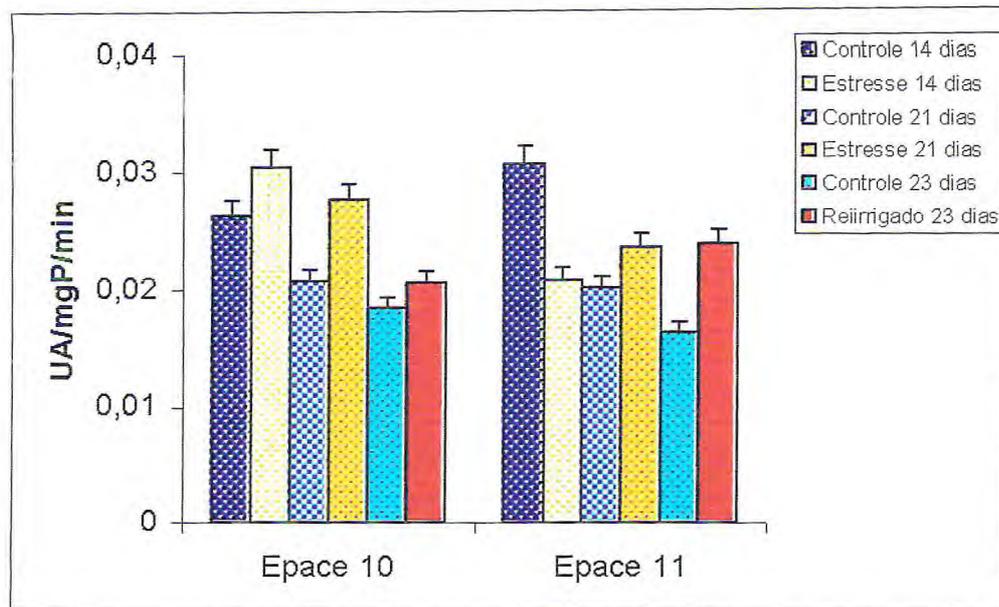


Figura 14 – Atividade específica da enzima APX em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 11.

Para as plantas do cultivar Epace 11, foi observado um decréscimo gradativo de atividade para APX nas plantas controle, em resultados semelhantes aos observados para Epace 10 (Figura 14). Entretanto, para as plantas submetidas aos tratamentos de deficiência hídrica, estas plantas se diferenciaram da cultivar Epace 10. Um decréscimo de 63% para o tratamento de estresse aos 14 dias após a suspensão da rega, em relação ao controle de mesma idade. Aos vinte um dias, um aumento de cerca de 15 já foi observado em relação ao estresse de 14 dias. Esta tendência de aumento de atividade da APX não foi revertida, mesmo 24 horas após o reinício da rega, com as plantas reirrigadas (23 dias) apresentando um aumento de atividade de 68% em relação ao controle de mesma idade (Figura 14).

Jiménez *et al.* (1997) também afirmaram que a função do ciclo SOD-CAT, não é verdadeiramente ativo em todas as plantas, para eliminação das espécies reativas de oxigênio. As plantas podem lançar mão de outros ciclos de destoxificação, como, por exemplo, SOD-APX-Glutationa e também utilizar os sistemas não enzimáticos, como Vitamina E e carotenóides na eliminação dos radicais livres (BRAY *et al.*, 2000).

A análise da atividade específica para a enzima peroxidase dos fenóis (POX) evidenciou um comportamento semelhante ao observado para SOD, CAT e APX, nas plantas controle do cultivar Epace 10, um decréscimo gradativo na atividade desta enzima em função do tempo e da senescência natural destas plantas (Figura 15). As plantas submetidas à deficiência hídrica também apresentaram decréscimos de atividade específica da POX. Para o cultivar

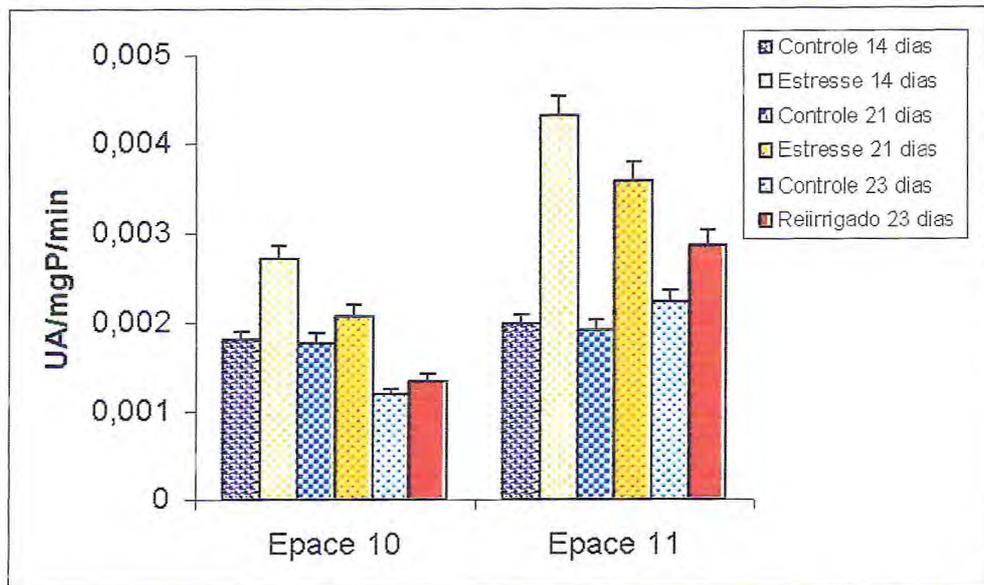


Figura 15 – Atividade específica da enzima peroxidase dos fenóis em folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), para os cultivares Epace 10 e Epace 11.

Epace 11, pode-se observar um comportamento diferenciado em relação a Epace 10, tanto para o tratamento controle, como para as plantas submetidas à deficiência hídrica. As plantas do tratamento controle praticamente não apresentaram variações na atividade da POX em função do tempo (Figura 15). Entretanto as plantas deste cultivar submetidas aos tratamentos de deficiência hídrica apresentaram um grande aumento de atividade aos 14 dias de estresse (cerca de 120% em relação ao controle). Aos 21 dias de estresse hídrico, o aumento de atividade específica para a POX foi de cerca de 85%. Mesmo após o reinício da rega, foi observado um aumento de atividade de cerca de 25% em relação ao controle de mesma idade (23 dias).

As plantas do cultivar Epace 11 demonstraram uma maior atividade específica quando submetidas aos tratamentos de deficiência hídrica, se comparadas ao cultivar Epace 10. Segundo Cakmak e Horst (1991) a atividade das peroxidases é quase sempre aumentada em resposta a alguma forma de estresse, se constituindo, portanto, uma proteção contra processos oxidativos celulares. De acordo com Sreenivasulu *et al.* (1999) o aumento na produção das espécies reativas de oxigênio pode ser o grande responsável pelo processo de peroxidação dos lipídeos das membranas celulares e o nível desses danos, pode ser evitado por um sistema enzimático constituído por diferentes enzimas de destoxificação, como por exemplo, SOD, CAT, APX, POX, entre outras.

O mecanismo de destoxificação para o cultivar Epace-10 é possivelmente mais eficiente que o observado para o cultivar Epace-11. Para Epace-10, foram constatados dois mecanismos ativos antioxidantes em condições de deficiência

hídrica, ou seja, foram observados aumentos das atividades específicas tanto do sistema SOD-CAT como do sistema SOD-APX, conferindo dessa forma, uma maior proteção as plantas deste cultivar à ação dos radicais livres. Entretanto para as plantas do cultivar Epace-11, não foi encontrada atividade específica aumentada para o sistema SOD-CAT, em resposta ao estresse hídrico. As plantas deste cultivar, apresentaram somente como proteção à ação dos radicais livres, o sistema SOD-APX, mostrando assim, uma menor eficiência no mecanismo de destoxificação celular. Conseqüentemente, as plantas deste cultivar se tornam mais susceptíveis aos danos causados pelo excesso de radicais livres. Epace 11 apresentou uma atividade maior para a enzima POX, em relação a Epace 10, em resposta ao estresse hídrico, porém este sistema enzimático não é comprovadamente muito eficiente no processo de destoxificação, quanto aos sistemas SOD-CAT e SOD-APX.

Segundo o mecanismo de ação das enzimas de destoxificação proposto por Bray *et al.* (2000), as plantas do cultivar Epace 10 utilizariam tanto a via superóxido dismutase-catalase como a via ascorbato peroxidase-glutationa redutase, e em menor escala, o sistema POX, no processo de eliminação dos radicais livres produzidos em resposta ao estresse hídrico. Ainda segundo os mecanismos propostos pelos autores anteriormente citados, as plantas do cultivar Epace 11 utilizariam como via efetiva de destoxificação, o sistema SOD-APX, em condições de estresse salino, e também em menor escala, o sistema POX. Este fato pode ser observado nas figuras 12, 13, 14 e 15.

## DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho foi realizado em duas etapas, denominadas de Experimento I e Experimento II. No experimento I as plantas dos cultivares Epace 10, Epace 11, Epace1 e BR 10 Piauí foram analisadas em parâmetros mais fisiológicos, como *status* hídrico, resistência de membranas e lipídeos totais. Enquanto que no Experimento II, os cultivares Epace 10 e Epace 1, tiveram analisados o teor de lipídeos peroxidados, ácidos graxos totais, as diferentes categorias lipídicas, índice de insaturação e análise das diferentes enzimas antioxidantes.

No estudo do *status* hídrico foi observadas uma menor tolerância do cultivar Epace 11 e uma maior tolerância do Epace 10. Os cultivares Epace 1 e BR 10 Piauí. Não tiveram um comportamento bem definido em relação ao estresse hídrico.

As membranas celulares dos cultivares estudados foram afetadas pelo estresse hídrico, fato comprovado pelo aumento da perda de integridade destas membranas. A perda de integridade pode estar correlacionada com o aumento da degradação de lipídeos típicos de compartimentos plastídias, aumentando a passagem passiva a diferentes íons e moléculas. Os danos provocados nas membranas celulares foram mais evidentes para os cultivares Epace 11 e BR 10 Piauí, nos diferentes níveis de deficiência hídrica, em relação aos outros cultivares.

O teor de lipídeos totais reflete diretamente o nível estrutural das membranas celulares. O cultivar Epace 11 apresentou elevados danos em suas membranas e teve também seus teores de lipídeos totais reduzidos de forma

importante, mesmo após a reirrigação, este cultivar apresentou um grande decréscimo em relação ao controle.

Em função dos resultados obtidos nas diferentes análises do experimento I, foram escolhidos os cultivares Epace 10 e Epace 11 para a segunda parte deste trabalho, denominado de Experimento II. O cultivar Epace 11 se apresentou como menos tolerante à deficiência hídrica, enquanto que o cultivar Epace 10 foi tido como o mais tollerante nas diferentes análises realizadas.

Os danos ao nível das membranas celulares, também puderam ser confirmados pelos resultados obtidos na análise de lipídeos peroxidados. As membranas celulares possivelmente tiveram sua permeabilidade passiva aumentada em função da degradação de seus elementos estruturais, como por exemplo, os lipídeos. Epace 11 apresentou danos elevados nas membranas celulares, degradação acentuada dos lipídeos polares e também níveis aumentados no teor de lipídeos peroxidados, em relação ao cultivar Epace 10. Os aumentos nos teores de lipídeos peroxidados para Epace 11 foram cerca de duas vezes maiores que os observados para Epace 10.

Os teores de ácidos graxos totais também confirmaram a tendência anteriormente observada para EPACE 11, ou seja, danos elevados nas membranas celulares, degradação nos lipídeos totais. A degradação acentuada dos ácidos graxos poliinsaturados, presentes principalmente nos plastídeos, pode ter conseqüências severas para as plantas deste cultivar, como por exemplo, redução na atividade fotossintética e alteração no metabolismo das células em geral.

As plantas do cultivar Epace 11 apresentaram não somente uma redução acentuada no teor de ácido linolênico, como também aumento no teor de ácido palmítico. Esta modificação do balanço pré-existente entre os ácidos graxos das membranas celulares provoca um desequilíbrio nestas estruturas, tornando estas membranas menos fluidas, isto é, mais rígidas induzindo a um metabolismo desacelerado nas células. A análise das diferentes categorias lipídicas evidenciou uma degradação mais acentuada para os galactolípídeos, principalmente para MGDG e, sobretudo para o cultivar Epace 11. Tanto a diminuição no teor de ácidos graxos poliinsaturados totais, como a diminuição destes ácidos pertencentes aos galactolípídeos, acompanhada de aumentos no teor de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o ácido palmítico, induziram reduções no índice de insaturação dos lipídeos membranares. Esta alteração no índice de insaturação pode por sua vez, modificar todo o metabolismo das membranas, tornando-as menos fluidas. Assim sendo, pode-se facilmente estabelecer uma correlação positiva entre o índice de insaturação, o teor de ácidos graxos poliinsaturados e a qualidade das membranas celulares.

Diferentes fatores podem estar envolvidos nas alterações observadas nos teores e qualidade dos ácidos graxos, e conseqüentemente dos lipídeos membranares, em resposta à ação do estresse hídrico nas plantas. Uma redução da velocidade de biossíntese e/ou aumento nos processos degradativos podem ser responsáveis pela alteração na relação ácidos graxos saturados/ácidos graxos insaturados (Monteiro de Paula *et al.*, 1993). Os processos degradativos dos lipídeos membranares podem ser de diferentes origens, como pela ação de

enzimas lipofílicas, como as lípases em geral (El-Hafid *et al.*, 1989) ou por ação de processos peroxidativos (Ferrari-Iliou *et al.*, 1994).

Neste trabalho, um possível papel protetor das enzimas SOD, CAT, APX e POX foi observado em folhas de feijão-de-corda, no processo de destoxificação, ou seja, na remoção de diferentes formas de radicais livres produzidos em resposta ao estresse oxidativo, induzido pelo estresse hídrico. O aumento na atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX não foi capaz de evitar o acúmulo de radicais livres nos tecidos foliares, pois tanto as plântulas do cultivar Epace 10, e Epace 11. O cultivar Epace 10 mesmo tendo um importante aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX ainda teve teores elevados de lipídeos peroxidados, embora estes teores sejam inferiores aos observados em Epace-11. Em Epace 11, foi observado um aumento pronunciado de SOD em resposta aos diferentes níveis de deficiência hídrica, enquanto a atividade específica da CAT, decresceu gradativamente, em relação ao tratamento controle. As plantas submetidas à deficiência hídrica, dos dois cultivares estudados, apresentaram atividade da enzima APX superior aos tratamentos controle. Mesmo após o reinício da rega, esta tendência não foi alterada, isto significando que a produção e/ou remoção dos radicais livres formados em resposta ao estresse hídrico foi mantida nos dois cultivares.

A atividade da enzima peroxidase dos fenóis (POX) mostrou ser mais elevada para o cultivar Epace 11 quando comparada com Epace 10. Este fato reforça a maior fragilidade do cultivar Epace 11 no combate e/ou formação de espécies reativas de oxigênio, uma vez que a POX sendo mais ativa, estaria eliminando fenóis que atuariam como antioxidantes naturais nos vegetais. A

presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por estes apresentarem uma importante atividade antioxidante e também por inibirem a oxidação lipídica (Nagem *et al.*, 1992; Gamache *et al.*, 1993; Ivanova *et al.*, 1997; Aziz *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 1998; Hollman e Katan, 1998).

Os teores elevados observados na peroxidação de lipídeos em Epace 11 seriam, portanto o resultado de uma eliminação não muito eficiente das espécies reativas de oxigênio, tornando, portanto este cultivar mais susceptível a ação do estresse oxidativo. As plantas do cultivar Epace 11, teriam apenas como mecanismo de destoxificação, o sistema SOD-APX, enquanto que o cultivar Epace 10 possui tanto o sistema SOD-CAT como SOD-APX, sendo, portanto, mais efetivo no processo de eliminação das espécies reativas de oxigênios produzidas em resposta à ação do estresse hídrico. A susceptibilidade do cultivar Epace 11 em relação à deficiência hídrica se torna ainda mais grave, pela atividade crescente da enzima POX, fragilizando, dessa forma, ainda mais, o sistema antioxidante destas plantas.

Os resultados obtidos neste trabalho tanto na análise dos lipídeos, ácidos graxos e índice de insaturação, como na atividade das diferentes enzimas do sistema de destoxificação nos dois cultivares estudados, evidenciaram uma menor tolerância do cultivar Epace 11, em relação a Epace 10, à ação do déficit hídrico. A degradação acentuada dos ácidos graxos poliinsaturados, a redução do índice de insaturação, a menor atividade das enzimas de destoxificação e a maior atividade da enzima peroxidase dos fenóis, em Epace 11. Portanto, uma correlação negativa pode ser estabelecida entre os diferentes parâmetros

o analisados para Epace 11 e a integridade membranar e conseqüentemente o próprio metabolismo celular.

**BIBLIOGRAFIA**

ACKERSON, R.C. Osmoregulation in cotton in response to water stress. *Plant Physiol.* 77:309-312. 1985

.ALLEN, J.C., HAMILTON, R.J. Rancidity in foods. London : Applied Science, 1983. 199p.

ALPI, A.; PUPILLO, P.; RIGANÒ, C. Fisiologia delle piante. Seconda edizione. EdiSES. Napoli, p.1-610, 1992.

ANDERSON, J.M.; SILATRO, S.R.; KLAUER, S.F.; FRANCESCHI, V.R. Jasmonic acid-dependent increases in the level of vegetative storage proteins in soybean. *Plant Science*, 62:45-52, 1995.

ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E. O caupi no Brasil. IITA/EMBRAPA. Brasília, DF. 722p. 1984.

ASADA, K. Production of active oxygen species in photosynthetic tissue. *In: Cause of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants.* Ch Foyer, PM Mullineaux, eds, CRC, Boca Raton, FL, pp 77-104. 1994.

AVILA V.; BERTELOTTI S.G.; CRIADO S.; PAPPANO N. & GARCIA N.A – Antioxydant properties of natural flavonoids quenching generation of singlet molecular oxygen. *International Journal of Food Science and Tecnology.* 36(1): 25-33, 2001.

AZIZ A. e LARHER F. (1998). Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica napus* L. *Journal of Plant Physiology*. 153: 754-762.

BAFIANI M., DE BIASI M.G., COLOGNOLD M. & ARTEMI F. Catalase, Peroxydase, and Superoxyde Dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit. *Agronomica (Pisa)*, 34(1-2):90-102, 1990.

BASTOS, E. A., FOLEGATTI, M. V., FARIA, R. T., Simulation of growth and development of irrigated cowpea in Piauí State by CROPGRO model. *Pesq. agropec. bras.*, Oct. 2002, vol.37, no.10, p.1381-1387. ISSN 0100-204X.

BLIGHT, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911-917, 1959.

BLUM, A. EBERON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in Wheat. *Crop Sci.* 21:43-47. 1981.

BLUM, A. EBERON, A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in Wheat. *Crop Sci.* 21:43-47. 1981.

BOWLER, C. VAN MONTAGUE, M. INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. v.43:83-113. 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72:248-254. 1976.

BRAY, E.A. Update on water deficit. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, Bethesda, v.103, p.1035-1040, 2000.

BREUSEGEM, F.V., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÈ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. V.161: 405-414. 2001.

CAKMAK, I. HORST, J.H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*. V.83:463-468. 1991.

CAROLINO, S. M.I B., VAEZ, J. R., IRSIGLER, A. S. T. *et al.* Plant BiP gene family: differential expression, stress induction and protective role against physiological stresses. *Braz. J. Plant Physiol.*, May/Aug. 2003, vol.15, no.2, p.59-66. ISSN 1677-0420.

CASTRO, N. R., MENEZES, G. C. ,COELHO, R. S. B. Inheritance of cowpea resistance to *Cercospora* leaf spot. *Fitopatol. bras.*, Sept./Oct. 2003, vol.28, no.5, p.552-554. ISSN 0100-4158.

COSTA OLIVEIRA, M. S. Estudo da composição lipídica e efeito do estresse hídrico em membranas foliares de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale L.*)Dissertação. Universidade Federal do Ceará. P 58.2001.

CHAVES FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Change in osmotic potential and soluble carbohydrates levels in *Solanum lycocarpum* St.-Hil. in response to water stress. *Rev. bras. Bot.*, June 2001, vol.24, no.2, p.199-204. ISSN 0100-8404.

CHEN, G e ASADA, K. Ascorbate peroxidase in tea leaves occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol*. 3030:987-998.1989.

CHETAL, S.; WAGLE, S. D e NAINAWATEE, h. S. (1980). Phospholipid changes in wheat and barley leaves under water stress. *Phytochemistry*, 21: 51-53.

CHETAL, S.; WAGLE, S. D e NAINAWATEE, h. S. (1981). Phospholipid changes in wheat and barley leaves under water stress. *Phytochemistry*, 21: 51-53.

CHETAL, S.; WAGLE, S. D e NAINAWATEE, H.S. Alterations in glicolipids of wheat and barley leaves under water stress. *Phytochemistry*, 21: 51-53. 1982.

D'ARCY-LAMETA A ; FERRARI-ILIOU R.; PHAM THI A T. e ZUILY-FODIL Y. – Involvement of photosynthetic pigments in total leaf lipids extracts sensitivity to photoperoxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 34(6): 817-825, 1996.

DAIER, J. Mechanism of drought induced alterations in assimilate partitioning and transport in crops. *Critical Reviews in Plant Science*, v . 7. N. 2, p. 117-137, 1994.

DAKMA W.S.; ZARROUK M. E CHERIF A. – Effects of drought-stress lipids in rape leaves. *Phytochemistry*, 40(5): 1383-1386, 1995.

DIONISIO-SESE, M.L., TOBITA, S. Antioxidant responses os rice seedlings to salinity stress. *Plant Physiology*. V.135:1-9. 1998.

DROILLARD M.J. & PAULIN A. Isozymes of SuperOxydeDismutase in mitochondria and peoxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *PlantPhysiol.*, 94(3):1187-1192, 1990.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.

DUXBURY., LEGGE R.L., POLYATH G., BARBER F. e THOMPSON J.E. Alterations in membrane protein conformation in response to senescence related changes. *Phytochem.*, 30(1):63-68, 1991.

ENYEDI, A.J., YALPANI, N., SILVERMAN, P., RASKIN, I. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco mosaic virus. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 2480 – 2484. 1992.

ERREA, M. P. Compatibilidade de injertos en Albaricoquero- *P. armeniaca* L. □ Anatomia y bioquímica de uniones compatibles e incompatibles. Tesis (Doctoral) - Universidad de Navarra. 1991.

FENTON, H.J.H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *Journal of Chemical Society.* V.65:899. 1894.

FERNANDEZ, M.A., SAENZ, M.T., GARCIA, M.D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London, v.50, n.10, p.1183-1186, 1998.

FERRARI-ILIOU R.; PHAM THI A T.; D'ARCY-LAMETA A; ZUILY-FODIL Y. e MAZILIAK, P. (1994). Water stress increased susceptibility to peroxidation of leaf total lipophilic extracts. *Plant Science Today*, les Colloques no. 59, ed. INRA Paris.

FERREIRA, A.L.A. and MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, Jan./Mar. 1997, vol.43, no.1, p.61-68. ISSN 0104-4230.

FIGUEIREDO, M. V. B., BEZERRA-NETO, E.; BURITY, H. A. water stress response on the enzymatic activity in cowpea nodules. *Braz. J. Microbiol.*, Aug./Oct. 2001, vol.32, no.3, p.195-200. ISSN 1517-8382.

FLURKEY, W.H.; JEN, J.J. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, Chicago, v.43, n.6, p.1826-1831, 1978.

FREIRE-FILHO, F.R., ARAÚJO A.G. & CARDOSO, J. C. *Vigna unguiculata* (L.) Walp., nomenclatura científica e nomes vulgares. Resumo da I Reunião Nacional de Pesquisa do Caupi. Goiânia: EMBRAPA, 1:43-44, 1982.

FRIDOVICH, I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. V245:4053-4057 .1986.

GAFF, D. F. Protoplasmatic tolerance of extreme water stress. *In* : Adaptation of plants to water and higt temperature stress: Ed. by Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in highter plants. *Plant Physiology*, 59:309314, 1980.

GAMACHE, P., RYAN, E., ACWORTH, I.N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v.635, n.1, p.143-150, 1993.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève, Centre de Botanique, Genève, 1982. 313p.

GOMES, A. A., ARAUJO, A. P., ROSSIELLO, R. O. P. *et al.* Accumulation of biomass, physiological characteristics and grain yield of bean cultivars under irrigated and dry regimes. *Pesq. agropec. bras.*, Oct. 2000, vol.35, no.10, p.1927-1937. ISSN 0100-204X.

]

GONZÁLEZ, E.M.; APARÍCIO-TEJO, P.M.; GORDON, A.J.; MINCHIN, F.R.; ROYNELE, M.; ARRESE-IGOR, C. Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J. Exp. Bot.*, 49(327):1705-1714, 1999.

HARWOOD J.L., JONES A.V.H.M. & THOMAS H. Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Fetuca pratensis* III. Total acyl lipids of leaf tissue during senescence. *Planta*, 156:152-157, 1982.

HARWOOD J.L., JONES A.V.H.M. & THOMAS H. Leaf senescence in a non-yellowing mutant of *Fetuca pratensis* III. Total acyl lipids of leaf tissue during senescence. *Planta*, 156:152-157, 1982.

HASSAN & ESCANDALIOS. Update on abiotic Stress. *Plant Physiol.* 101: 7-12. 1990.

HAVIR, E.A. & MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84:450-455, 1986.

HERNANDEZ, J. A., CORPAS, F.J., GOMEZ, M., DEL RIO, L.A., SEVILLA, F. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol. Plant.* 89, 103-110. 1993.

HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. *Archives of Toxicology Supplement*, Berlin, v.20, p.237-248,

1998.

HUBAC C., GUERRIER D., FERRAN J. & TREMOLIÈRES A. Change of leaf lipid composition during water stress in two genotypes of *Lupinus albus* resistant or susceptible to drought. *Plant Physiol. Biochem.* 27(5):737-744, 1989.

IVANOVA, A., MILKOVA, T., GALABOV, A.S., NIKOLAEVA, L., VOYNOVA, E. Transformation of cholanic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous Wittig reaction. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, Tuebingen, v.52, n.7-8, p.516-521, 1997.

JIMÉNEZ, A. HÉRNANDEZ, J. A., DEL RIO, L. e A., SEVILLA, F. Evidence of the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*. V. 114:275-284. 1997.

KAISER, W. The effect of hydrogen peroxide on CO<sub>2</sub> fixation of isolated intact chloroplast. *Biochem. Biophys. Acta.* 440:475-482. 1976.

KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51:376-382, 1974.

KAR, M. & MIHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319, 1976.

KEFELI, V.I., KUTACEK, M. Phenolic substances and their possible role in plant growth regulation. In: PILET; P.E. (Hrsg): Plant growth regulator abstracts. Farnham: Editora, 1977. p.181-188.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase, in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Physiology*, 57:315-319, 1993.

KRAMER, P. J. Plant and soil water relationships : A modern synthesis. New York: McGraw-Hill, 482p, 1969.

KRAUSE G.H. (1994) Photoinhibition Induced by Low Temperatures. In: Baker NR, Bowyer JR (eds), Photoinhibition of Photosynthesis - from Molecular Mechanisms to the Field, pp.331-363. Bios Scientific Publishers, Oxford.

LAGRIMINI, L.M.; BRADFORD, S.; ROTHSTEIN, S. Peroxidase-Induced Wilting in transgenic Tobacco Plants. *The Plant Cell*, Rockville, v.2, p.7-18, 1990.

Lamport DTA (1986) Roles for peroxidase in cell wall genesis. In: Greppin H, Penel

LEPAGE, M. Identification and composition of turnip roots lipids. *Lipids*. 2:244-250, 1967.

LIMA FILHO, J. M. P.. internal water relations of the umbu tree under semi-arid conditions. *Rev. Bras. Frutic.*, Dec. 2001, vol.23, no.3, p.518-521. ISSN 0100-2945.

LIMA, M. P. L., OLIVEIRA, J.; B . R. EGINALDO *et al.* Stability of the resistance of cowpea genotypes to *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) in successive generations.

*Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, Apr./June 2002, vol.59, no.2, p.275-280. ISSN 0103-9016.

LOPES, F. C. C., GOMES, R. L. F. , FREIRE FILHO, F. R.. Genetic control of cowpea seed sizes. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, Abr./June 2003, vol.60, no.2, p.315-318. ISSN 0103-9016.

MARECHAL, R., MARCHERPA, J.M. e STAINER, F. *Boissiera*, vol. 28: 1-273, 1988.

MARTIN B.A., SCHOPER J.B. & RINNE R.W. Changes in soybean (*Glycine max* L. Merr.) glycerolipids in response to water stress. *Plant Physiol.*, 81:798-801, 1986.

MARUR, CELSO JAMIL. Pressure-volume curves and leaf expansion in cotton cultivars under water deficit. *Sci. agric.*, July 1999, vol.56, no.3, p.563-569. ISSN

McKERSIE, B.D. *Plant Environment Interactions and Stress Physiology: module 2*. In: PennState College of Agricultural Sciences of Guelph. 1996.

MAXWELL, D.P., WANG, Y. e MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of science of the USA*. V.96:8271-8276.1999.

METCALFE, I. D.; SCHEMITZ, A. A. e PELKA, J. R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38: 514-515.

MILLER, E.C. *Plant Physiology*. Ed. McGraw-hill Book Company, 1938. 1201p.

MOHR, H., SCHOPFER. P. *Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 629p.

MONTEIRO DE PAULA, F., PHAM THI, A. T., ZUILY-FODIL, Y., FERRARRILIOU R., VIEIRA DA SILVA, J., MAZLIAK, P. Effects of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol. Biochem.* 31(5)707-715, 1993.

MONTEIRO DE PAULA, F. Role de especies moleculares des lipides membranes das la resistance a la seheresse chez le niebe (*Vigna unguiculata* L.). Paris:Université Paris VII, 1992. 190p.

MONTEIRO DE PAULA, F., PHAM THI, A. T., ZUILY-FODIL, Y., FERRARRILIOU R., VIEIRA DA SILVA, J. e MAZLIAK, P. Effects of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves in *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol. Biochem.* 31(5)707-715, 1993.

MONTEIRO DE PAULA, F., PHAM THI, A. T., VIEIRA DA SILVA, J., JUSTIN, A. M., DEMANDRE, C. & MAZLIAK, P. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant sci.*, 66, 185-193, 1990.

MOTA, ANTÔNIO CHAGAS, FERNANDES, KÁTIA VALEVSKI SALES, SALES, MAURÍCIO PEREIRA *ET AL.* Cowpea Vicilins: Fractionation of Urea Denatured Sub-Units and Effects on *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) Development. *Braz. arch. biol. technol.*, Mar. 2002, vol.45, no.1, p.1-5. ISSN 1516-8913.

MUKHERJEE S.P. & CHOUDHURI M.A. Effects of water stress on some oxidative enzymes and senescence in *Vigna* seedlings. *Physiol.Plant.*, 52:37-42, 1981.

MUSACCHI, S. Aspetti biochimici della disaffinità d'innesto. Dipartimento di Colture Arboree - Università di Bologna. *Rivista di Frutticoltura*, n.3, p.73-79, 1994.

NAGEN, T.J., ALBUQUERQUE, T.T.O., MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.35, n.1, p.129-138, 1992.

NAGEN, T.J., ALBUQUERQUE, T.T.O., MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.35, n.1, p.129-138, 1992.

NAKANO, Y. & ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant Cell Physiol.* Kyoto, 22(5): 867-880, 1991.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Journal of Nutrition*, Boca Raton, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NAVARI-HZZOF., VANGIONI N. e QUATARCCI M.F. Lipids of soybean and sunflowers seedlings grown under drought conditions. *Phytochemistry*, 29(7):2119-2123, 1990.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). *Food Chemistry*. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1985. p.139-244.

NITSCH, J.P., NITSCH, J.P. Composés phenoliques et croissance végétale. *Annales Physiologie Végétale*, Paris, v.4, p.211-225, 1962.

NORBERG I., LARSSON K., LILJENBERG C. A study of membrane lipids from dehydration-acclimated *Brassica napus* root cell: formation of a cubic phase under physiological conditions. *Biochem.Cell.Biol.*, 68:102-105, 1990.

OLIVEIRA, ADEMAR P. DE, SILVA, VIRNA R. F., ARRUDA, FRANCINEUMA P. DE ET AL. Yield of cowpea-beans as a result of levels of doses and ways of application of nitrogen. *Hortic. Bras.*, Jan./Mar. 2003, vol.21, no.1, p.77-80. ISSN 0102-0536.

OLIVEIRA, A. P. SOBRINHO, J. T., NASCIMENTO, J. T. et al. Evaluation of breeding lines and cultivars of cowpea-beans in Areia, Paraíba, Brazil. *Hortic. Bras.*, June 2002, vol.20, no.2, p.180-182. ISSN 0102-0536.

OLIVEIRA, J.P. ,CARVALHO, A.M. A cultura do caupi nas condições de clima e de solo dos trópicos úmidos e semi-árido do Brasil. *In: O caupi no Brasil*. Brasília: IITA/EMBRAPA. P. 63-69. 2001.

PAIS, M. P., VARANDA, E. M... Variation in plant defenses of *Didymopanax vinosum* (Cham. & Schltld.) Seem. (Apiaceae) across a vegetation gradient in a Brazilian cerrado. *Acta Bot. Bras.*, July/Sept. 2003, vol.17, no.3, p.395-403. ISSN 0102-3306.

PEIXOTO, P.H.P. Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com tolerância diferencial ao alumínio. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. MG. Brasil.95p. 1998.

PHAM THI A.T. Action de la sécheresse sur les lipides polaires des feuilles de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.). *Bull.Soc.Bot.Fr.*, 131:89-97, 1984.

Pham Thi, A. T., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A. M., and Mazliak, P. Effects of water stress of lipid metabolism in cotton leaves. *Phytochemistry*. 24, 723-727, 1985.

PHAM THI, A. T.; VEEIRA DA SILVA, J.; & MAZLIAK, P. The role of membrane lipids in drought resistance of plants. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.*, (1): 99-114, 1990.

PIMENTEL, C. *Metabolismo de carbono na agricultura tropical*. Seropédica : EDUR, 2000. 159p.

PINHO, N. L. J. Étude comparée des mécanismes physiologiques de la résistance à la sécheresse de cultivars de mil (*Pennisetum americanum* L.) et Sorgho [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] sensibles ou résistant. Université Paris VII. 158p. (Thèse de Doctorat), 1992.

PINHO, N. L. J. Étude comparée des mécanismes physiologiques de la R.C. Salinity tolerance in plants. New York, Willey, 1984, p.93-123.

POËSSEL, J.L. Composés phénoliques et peroxidases de l'abricotier: Etude comparative de deux variétés (Luizet et Canino) en relation avec l'incompatibilité, au greffage. Académie de Montpellier: Université, des Sciences et Technique du Languedoc, 1983.

PRABHA C., AROSO Y.K. & WAGLE D.S. Phospholipids of wheat chloroplasts and its membranes under water stress. *Plant Sci.*, 38(1):13-16, 1986.

ROUT, N.P., SHAW, B.P Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Science*. V.160:415-423. 2001.

SALES, M.P., PIMENTA, P.P., PAES, N.S. *et al.* Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Braz J Med Biol Res*, Jan. 2001, vol.34, no.1, p.27-34. ISSN 0100-879X.

SANTOS, C. A. , ARAUJO, F. P.. Grain yield and plant morphology of cowpea genotypes with different planting densities under irrigated and rainfed conditions. *Pesq. agropec. bras.*, Oct. 2000, vol.35, no.10, p.1977-1984. ISSN 0100-204X.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101:17-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Response of lant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics*. V.28:1-41. 1990.

SCHANAIDER, A., C., LEONALDSON DOS SANTOS , MADI, KALIL. Effects of alpha-tocopherol on bacterial translocation and lipid peroxidation in rats with intestinal obstruction. *Acta Cir. Bras.*, July/Aug. 2003, vol.18, no.4, p.283-288. ISSN 0102-8650.

SCHOENBEIN, C.F. Ueber die Katalytische Wirksamkeit organischer Materien und deren Verbreitung in der pflanzen und thierwelt. *J. Prakt. Chem.*, v.89., p:323-344. 1863.

SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; HEMMINGSEN, E.A.; BRADSTREET, H.D. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of monogroves and some other plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52:119-125, 1964.

SENARATNA T., MCKERSIE B.D. & BOROCHOV A. Dessication and free radical mediated changes in plants membranes. *J.Exp. Botany*, 38:2005-2014, 1987.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M.*, 1994. p.20-33. (ACS Symposium Series, n.546).

SINCLAIR, T.R.; MUCHOW, R.C.; LUDLOW, M.M.; LEACH, G.J.; LAWN, R.J.; FOALE, M.A. Field and Model analysis of the effect of water deficits on carbon and nitrogen accumulation by soybean, cowpea and black gram. *Field Crops Res.*, 17:121-140, 1987.

SINCLAIR, T.R.; ZIMET, A.R.; MUCHOW, R.C. Changes in soybean nodule number and dry weight in response to drought. *Field Crops Research*, v.18, p.197-202, 1988.

SINGH, K.; MANN, S.S.; BAJWA, M.S. Effect of auxins, sodium benzoate e calcium chloride on postharvest berry drop in Himrod grapes. *Acta Horticultural*, Addis Abeba, n.158, p.413-418, 1985.

SINGH, K.; MANN, S.S.; BAJWA, M.S. Effect of auxins, sodium benzoate e calcium chloride on postharvest berry drop in Himrod grapes. Acta Horticultural, Addis Abeba, n.158, p.413-418, 1985.

SINGH, S.P. Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. Crop Science, Madison, v.35, p.118-124, 1995.

SINGH, S.P. Selection for water-stress tolerance in interracial populations of common bean. Crop Science, Madison, v.35, p.118-124, 1995.

SINGH, T.; DEVI, S.; CHAWLA, G.; GUPTA, M.; VISWANATHAN, P.N. Ultrastructural and biochemical effects of cadmium on the aquatic *Marsilea minuta* Linn. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.21, p.171-181, 1991.

SREENIVASULU, N. et al. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by SALT stress in two cultivars of fox-tail millet with differential SALT tolerance. Plant Science. v.141:1-9. 1999.

STEVANOVIC B., PHAM THI A.T., MONTEIRO DE PAULA F. & VIEIRA DA SILVA J. Effects of dehydration and rehydration on the polar lipids and fatty acids composition of *Ramonda* species. Can.Journal of Bot., 70:107-113, 1992.

STONE, L.F.; MOREIRA, J.A.A; SILVA, S.C. da. Efeitos da tensão da água do solo sobre a produtividade e crescimento do feijoeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.23, n.2, p.161-167, 2000.

SWIDALE, L. D. & BIDINGER, F. R . The human consequences of drought and crop research priorities for their alterations. In: The physiology and Biochemistry od

*drought resistance in plants* . Ed. By Paleg, L. G. and Aspinall D. Academic press, 1-13.1981.

SYLVESTER, I e PAULIN, A . (1987). Accelerated ethylene production as related to changes in lipids and electrolyte leakage during senescence of petals of cut carnation (*Dianthus coryophyllus*). *Plant Physiology*, 70: 530-536.

TURNER, N.C. Adaptation to water deficits a changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13:175-190, 1986a.

VENANCIO, T.M., OLIVEIRA, A.E.A., SILVA, L.B. *et al.* A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea). *Braz J Med Biol Res*, Sept. 2003, vol.36, no.9, p.1167-1173. ISSN 0100-879X.

VIEIRA DA SILVA J. Water stress, ultrastructure and enzyme activity. *In* Lange O. L. Kappen L., Schulze E.D. – Springer-Verlag, Berlin, 207-224, 1976.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. *Talanta*, v.52, p.681-689, 2000.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source. *Anal. Chim. Acta*, v.366, p.111-118, 1998.

WANG G.X., YANG C.D., LIANG H.G. Changes of SOD activity and MDA content during development senescence of broad bean leaves. *Acta Phytophysiol.*, 15(1):13-17, 1989.

WILSON R. F.; BURKE J. J. , QUISENBERRY J. E. (1987). Plant morphological and biochemical responses to field water deficits. II. Responses of leaf glycerolipid composition incotton. *Plant Physiology*, 84: 251-254.

ZÁMOCKY, M., REGELSBERGER, G., JAKOPITSCH, C. e OBINGER, C. The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. *FEBS letters*. V.492:177-182. 2001.

ZHU, J-K. Plant-Salt Tolerance. *Trends in Plant Science*. V.6(2):56-71.2001a.

ZUILY-FODIL. Y., VASQUEZ-TELLO, A. e VIEIRA DA SILVA, J. Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. *Société botanique de France*. 1987.

ZWIAZEKJ.J. & BLAKE T.J.. Effects of preconditioning on eletrolyte leakage and lipid composition inblack spruce (*Pinea mariana*) stressed. *Physiol.Plant.*, 79(1):71-77, 1990.