

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

**THERESA CHRISTINE FILGUEIRAS RUSSO ARAGÃO**

**DANOS OXIDATIVOS E O ENVELHECIMENTO DE  
SEMENTES DE FEIJÃO CAUPI**

**FORTALEZA  
2007**

**THERESA CHRISTINE FILGUEIRAS RUSSO ARAGÃO**

**DANOS OXIDATIVOS E O ENVELHECIMENTO DE  
SEMENTES DE FEIJÃO CAUPI**

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. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

**FORTALEZA  
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- A672d Aragão, Theresa Christine Filgueiras Russo.  
Danos oxidativos e o envelhecimento de sementes de feijão caupi: estudo do estresse oxidativo/ Theresa Christine Filgueiras Russo Aragão. – 2007.  
141 f. : il., color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2007.  
Área de concentração: Bioquímica Vegetal.  
Orientação: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira.
1. Feijão-caupi. 2. Sementes - Fisiologia. 3. Bioquímica. I. Título.

---

CDD 574.192

**Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.**

A transcrição de qualquer trecho dessa Dissertação será permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da Ética Científica.

Tese aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007.

**Theresa Christine Filgueiras Russo Aragão**

Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

UFC/DBBM – Orientador

Dirce Fernandes de Melo, Dra.

UFC/DBBM – Conselheiro

José Hélio Costa, Dr.

UFC/ DBBM – Conselheiro

Maria Erivalda Farias de Aragão, Dra.

UECE/ CCS – Conselheiro

Victor Alexandre Vitorello, PhD

USP/ ESALQ – Conselheiro

## Agradecimentos

Ao professor Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, por seu constante estímulo, incentivo, orientação e pelo grande exemplo profissional e pessoal.

A professora Dra. Maria da Guia Silva Lima pelo exemplo de mulher, profissional e conselheira quando da minha opção pela carreira acadêmica.

A professora Dra. Dirce Fernandes de Melo e ao Dr. José Hélio Costa pelas valorosas contribuições e exemplo profissional.

Ao professor Dr. Gandhi pelo exemplo de postura científica e colaboração profissional.

Ao professor Dr. Sebastião Medeiros Filho pelo incentivo e colaboração profissional.

A professora Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão pela amizade, colaboração e exemplo profissional.

A todos os amigos e funcionários do LABPLANT, pela ajuda, amizade, alegrias e tristezas partilhadas comigo ao longo do processo.

Aos inesquecíveis companheiros Eduardo Voigt, Lucilene Silva, Iza Rocha, Luiz Ferreira Ponte, João Paulo Matos, Josemir Maia, Sérgio Ferreira e Fábio Rossi pela convivência e aprendizado.

Aos meus pais Lúcio e Márcia pela vida, doce vida.

Ao João Martins Aragão pelos nossos filhos maravilhosos.

Aos meus filhos Laila, Nadine e João Filho pelo amor, colaboração, compreensão e paciência.

A minha neta *Isabella* pela sua existência, por ter transformado a minha vida e me tornado um ser humano melhor.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente pela realização desse trabalho.

Dedico essa Tese aos meus filhos Laila,  
Nadine e João Filho e a minha neta  
Isabella, aos quais amo  
incondicionalmente.

*O amor é a essência de todas as formas...*

*A essência de todas as eras, de todos os risos e de todos os clamores.*

*O amor pela luz, o amor pela chuva, o amor pelas árvores, o amor pelo mar...o amor ao SENHOR!*

*O amor encanta e desencanta. Acalenta e endoidece e anoitece.*

*O amor engrandece. Assim como o padeiro a fazer o pão, o pedreiro com as pedras a consolidar paredes, a mulher a lavar as roupas, o professor a ensinar, o cientista a pensar e a pensar e a fazer.... Com amor...*

*Por amor... Por amor a todos nós. Pelo bem de toda a humanidade.*

*Assim, tudo valerá a pena.*

*Theresa Christine F. R. Aragão*

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Universidade Federal do Ceará
- FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<i>xi</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xii</i>
<b>Capítulo 1 - Envelhecimento de sementes e espécies reativas de oxigênio – uma revisão</b> .....	<b>1</b>
Introdução .....	2
Envelhecimento.....	4
A Teoria do envelhecimento por radicais livres (“The Free Radical Theory”) .....	5
Sementes de plantas superiores como modelos de estudo do envelhecimento .....	8
Envelhecimento, deterioração e viabilidade de sementes .....	8
Armazenamento de sementes.....	10
Testes de vigor .....	14
Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	16
ROS e viabilidade de sementes.....	23
ROS mitocôndrias e o envelhecimento .....	24
ROS proteínas e o envelhecimento .....	26
ROS, os peroxissomos e o envelhecimento.....	31
ROS e a oxidação de lipídios.....	31
Antioxidantes.....	33
Pré-tratamento de sementes com antioxidantes e respostas no vigor .....	40
O feijão caupi.....	41
Hipótese.....	43
Objetivos.....	43
Referências bibliográficas.....	44

<b>Capítulo 2- Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de duas cultivares de feijão caupi envelhecidas artificialmente</b> .....	51
Introdução .....	52
Material e Métodos.....	55
Material vegetal .....	55
Preparação das sementes para testes e análises .....	55
Seleção das sementes .....	55
Desinfecção das sementes.....	55
Envelhecimento artificial.....	56
Teste de germinação.....	57
Determinação do teor de água (base úmida) .....	58
Teste de condutividade elétrica .....	58
Resultados .....	60
Discussão e Conclusão.....	66
Referências bibliográficas.....	68
<b>Capítulo 3- Peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas associados com o envelhecimento artificial de sementes de feijão caupi</b> .....	72
Introdução .....	73
Material e métodos.....	77
Material vegetal .....	77
Envelhecimento artificial.....	78
Peroxidação de lipídios (TBARS) .....	78
Índice de hidroperóxidos de lipídios (LPO) .....	80
Detecção de proteínas oxidadas.....	81
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS.....	82
Western Blot .....	83
Determinação do teor de carbonilação de proteínas.....	84

Resultados .....	85
Discussão e Conclusão.....	88
Referências bibliográficas .....	90
<b>Capítulo 4- Alterações nas atividades de catalase, peroxidase de ascorbato e dismutase de superóxido em sementes de duas cultivares de feijão caupi envelhecidas artificialmente.....</b>	<b>93</b>
Introdução.....	94
Material e métodos .....	101
Material vegetal .....	101
Envelhecimento artificial.....	101
Extração das enzimas do estresse oxidativo.....	102
Dosagem de Proteínas.....	102
Atividade total de peroxidases de ascorbato (APXs) .....	102
Atividade total de dismutase de superóxidos (SODs).....	103
Atividade total da catalase (CAT) .....	103
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS .....	104
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições nativa .....	104
Géis de atividade enzimática.....	105
Diferenciação de isoformas da SOD .....	105
Desenho do peptídeo de catalase .....	106
Preparação de anticorpos.....	107
Western Blot.....	108
Extração de RNA total .....	109
Eletroforese de RNA em condições não-desnaturantes .....	109

Síntese da primeira fita de cDNA .....	110
Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores Específicos .....	111
Resultados .....	112
Discussão e Conclusão .....	119
Referências bibliográficas .....	123
Conclusões Gerais.....	130

# DANOS OXIDATIVOS E O ENVELHECIMENTO DE SEMENTES DE FEIJÃO CAUPI

**Autor: Theresa Christine Filgueiras Russo Aragão**

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira**

## RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido na intenção de elucidar a relação entre o envelhecimento de sementes e danos oxidativos em duas cultivares contrastantes de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), denominadas Pitiúba e Pérola. As sementes foram artificialmente envelhecidas a 45 °C e 99% de umidade relativa até 72 h e coletadas diariamente. Germinação de sementes, vazamento de eletrólitos, oxidação de lipídios e proteínas foram avaliados. Além disso, alterações em atividade de enzimas como dismutase de superóxido (SOD), peroxidase de ascorbato (APX) e catalase (CAT) assim como o padrão de suas isoformas e expressão de RNAm de CAT e APX também foram investigados. Somente em sementes de Pérola decresceu a germinabilidade enquanto que aumentou significativamente o vazamento de eletrólitos com o envelhecimento artificial, indicando danos de membrana. Além disso, sementes de Pérola apresentaram maiores danos oxidativos em lipídios e proteínas do que sementes de Pitiúba. A atividade total da SOD não foi alterada durante o tratamento de sementes em ambas cultivares. Análise de zimograma revelou cinco diferentes isoformas, designadas SOD1 a SOD5 de acordo com a migração eletroforética. Não houve diferença significativa no padrão isoenzimático de SOD durante as 72 h de tratamento. Inibição específica com peróxido de hidrogênio e cianeto revelou as isoformas SOD1 e SOD2 como SOD-Mn e SOD3, SOD4 e SOD5 com SOD Cu/Zn. Foi verificado um “cross-talk” entre as atividades de CAT e APX durante o envelhecimento artificial. As 72 h de tratamento, a expressão de RNAm de CAT e sua atividade aumentaram em Pitiúba e diminuíram em sementes de Pérola. A expressão e a atividade de APX demonstrou um padrão oposto nas cultivares estudadas. Análise de imunoblot demonstrou que não houve alterações significativas no conteúdo de CAT em ambas as cultivares durante a indução do envelhecimento. Desse modo, o turnover de CAT não envolve necessariamente a síntese coordenada de RNAm, síntese de proteína e degradação de proteína. Em conclusão, danos oxidativos em lipídios e proteínas estão estreitamente envolvidos no envelhecimento de sementes de caupi. Sementes de Pitiúba são mais resistentes aos danos oxidativos induzidos por envelhecimento do que sementes de Pérola. A resistência de sementes de Pitiúba contra o envelhecimento parece estar relacionada à indução da expressão e atividade de CAT, sugerindo que esta enzima realiza uma função protetora contra danos oxidativos.

# **DANOS OXIDATIVOS E O ENVELHECIMENTO DE SEMENTES DE FEIJÃO CAUPI**

**Autor: Theresa Christine Filgueiras Russo Aragão**

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira**

## **ABSTRACT**

The present study was carried out to elucidate the relationship between seed ageing and oxidative damage in two cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars, namely Pitiúba and Pérola. The seeds were artificially aged at 45 °C and 99% relative humidity until 72 h and daily harvested. Seed germination, electrolyte leakage, lipid and protein oxidation were evaluated. Moreover, changes in superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activity as their isoform pattern and CAT and APX mRNA expression were also investigated. Only in Pérola seeds germinability was decreased whereas electrolyte leakage was increased with artificial ageing, indicating membrane damage. Moreover, Pérola seeds presented higher lipid and protein oxidative damage than the Pitiúba ones. Total SOD activity was not altered by the treatment in both cultivars. Zymogram analysis revealed five different isoforms, designated SOD1 to SOD5 according to the electrophoretic migration. No significant difference in the SOD isoenzyme pattern up to 72 h were detected. Specific inhibition with peroxide and cyanide showed SOD1 and SOD2 as SOD-Mn and SOD3, SOD4 and SOD5 as SOD-Cu/Zn isoforms. It was verified a cross-talk between CAT and APX activities through artificial ageing. At 72 h of treatment, CAT mRNA expression and activity increased in Pitiúba seeds and decreased in the Pérola ones. Conversely, APX mRNA expression and activity showed an opposite pattern in the studied cultivars. Immunoblot analysis demonstrated that no significant changes in CAT content were verified in Pérola and Pitiúba seeds during induced aging. Thus, the CAT turnover did not necessarily involve coordinated mRNA synthesis, protein synthesis and protein degradation. In conclusion, lipid and protein oxidative damage were narrowly involved in seed aging in cowpea. Pitiúba seeds were more resistant to age-induced oxidative damage than that of Pérola. Pitiúba seed resistance against aging were related to induced CAT expression and its activity, suggesting that this enzyme play a role in oxidative damage protection.

## **CAPÍTULO 1**

# **ENVELHECIMENTO DE SEMENTES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO – UMA REVISÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

As condições ambientais para o armazenamento de sementes constituem um sério problema, especialmente em regiões tropicais úmidas. Geralmente, a viabilidade das sementes é perdida durante períodos prolongados de armazenamento. O uso de sementes de alta qualidade é fundamental para a instalação e a produção de uma cultura. Dessa forma, tem-se estimulado o desenvolvimento de novos testes de vigor para avaliar a qualidade fisiológica das sementes. Testes de vigor são considerados de maior importância no controle de qualidade de empresas produtoras de sementes, visando minimizar a comercialização de sementes de baixa qualidade, ou fora dos padrões de qualidade. Esses testes têm sido bastante utilizados por empresas produtoras de sementes, devido a sua habilidade de revelar pequenas diferenças na deterioração de sementes de lotes comerciais.

O teste de envelhecimento acelerado (artificial), desenvolvido por Delouche & Baskin, em 1973, é um teste de vigor indicado para diferentes espécies, sendo geralmente utilizado em programas de controle de qualidade de empresas produtoras de sementes. Esse teste é eficiente para avaliar o vigor de lotes de sementes de feijoeiro e acompanhar a sua variação durante o período de armazenamento (Salinas *et al.*, 2001).

Para avaliar alterações nos processos bioquímicos, como a mensuração do nível de integridade das membranas celulares (Ferguson, 1995), a condutividade elétrica é considerada um ótimo teste de vigor. Esse teste permite medir a lixiviação de eletrólitos de tecidos vegetais, sendo utilizado para sementes e algumas espécies de cultivo (Hibbard & Miller, 1928). Atualmente, o teste de condutividade elétrica é usado extensivamente na Europa, Austrália e Nova Zelândia, para muitas espécies (Hampton & Coolbear, 1990; Salinas *et al.*, 2001).

Em fisiologia de sementes está aumentando o interesse pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). Um grande número de contribuições atualizadas nesse campo tem demonstrado a relação das ROS com a perda de vigor e viabilidade durante o armazenamento prolongado de sementes ortodoxas. Interessantemente, a peroxidação de lipídios induzida por esses componentes tem sido vastamente citada como sendo a maior causa do envelhecimento de

sementes (Priestley, 1986; McDonald, 1999). Segundo Bowler *et al.* 1992 e McDonald 1999, mecanismos enzimáticos antioxidativos (catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase), estão envolvidos com a viabilidade de sementes. Além disso, protetores antioxidantes não-enzimáticos como ácido ascórbico tem sido usado em pré-tratamentos para a proteção e revigoração de sementes, aumentando sua capacidade de germinação e emergência quando submetido ao envelhecimento natural e acelerado (Chhetri *et al.*, 1993, Powell *et al.*, 2000). Tem sido relatado que o pré-tratamento com antioxidantes, aumentam o vigor e a capacidade de armazenamento de sementes em condições adversas de temperatura e umidade (Basu 1994; Maity *et al.* 2000).

O fenômeno do envelhecimento e o programa de morte celular (PCD) são tipicamente estudados preferencialmente em células humanas ou de animais do que em plantas. NO entanto, as sementes de plantas superiores representam excelentes modelos para o estudo do envelhecimento devido a perda de sua viabilidade ser facilmente induzida. Sementes ortodoxas são tolerantes a dessecação e podem ser armazenadas no estado seco. Sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecação. Danos letais, como os avaliados por testes de germinação, podem ser induzidos pelo envelhecimento artificial em ortodoxas, e pela dessecação em sementes recalcitrantes. A dinâmica da perda de viabilidade no estado seco e os aspectos físicos fundamentais tem recebido muita atenção (Kranner, 2006).

A utilização de sementes como modelo para o estudo do envelhecimento, especialmente por possibilitar a avaliação da perda da viabilidade em pouco tempo, pode ser uma excelente ferramenta no estudo do esclarecimento das intrínsecas relações entre deterioração e espécies reativas de oxigênio. Além disso, esse estudo estabelece um meio de produção de importantes informações que podem adicionar colaborações substanciais ao estudo do envelhecimento em animais e no homem, como o estudo da relação entre as espécies reativas de oxigênio, o envelhecimento e a morte.

Finalmente, o estudo da relação entre as ROS, perda de vigor e viabilidade de sementes, utilizando o feijão caupi como modelo experimental, pode gerar estratégias de meios de potencializar as defesas antioxidativas e amenizar efeitos de estresse em ambientes de armazenamento de sementes sob condições não controladas. Dessa forma, pretendemos utilizar nossos resultados como

ferramentas que tem por finalidade elaborar soluções alternativas para o melhor armazenamento de sementes, principalmente para médios e pequenos produtores.

### **1.1. Envelhecimento**

A característica mais relevante do envelhecimento do organismo é o declínio funcional progressivo, incluindo a perda de respostas adaptativas ao estresse ao longo do tempo. A extrema complexidade desses mecanismos básicos naturais é o maior empecilho para entendermos o processo biológico irreversível associado ao envelhecimento. O intrincado fenômeno do envelhecimento tem gerado ao longo do tempo uma miríade de hipóteses. Os modernos gerontologistas têm uma nova concepção onde o envelhecimento é definido como um processo adaptativo, não causado somente por simples fatores ou processos, mas por um processo multifatorial modulado pela interação entre fatores genéticos e ambientais.(Yu & Chung, 2006).

A maior corrente da causa do envelhecimento é o conceito popular de que a raiz do envelhecimento é o estresse oxidativo. No entanto, esse conceito pode ser interpretado de inúmeras formas. O termo estresse oxidativo deriva significativamente da força básica que elicita a oxidação pelo seu poder oxidante, o oxigênio, que é essencial para o suporte do metabolismo aeróbico e da vida. Numerosos estudos documentam a clara evidência da relação entre oxidantes e alterações em estruturas e funções, em todos os níveis, molecular, celular, tecidual, sistemas e órgãos. Além disso, recentes estudos moleculares com o estresse oxidativo têm mostrado uma alteração na regulação gênica durante o envelhecimento, provando que há uma forte evidência da natureza inseparável do estresse oxidativo do nível genético. Contudo, a acumulação de danos e a modulação genética são excelentes marcadores dos efeitos do estresse, mas, não são a causa direta do envelhecimento. A via mais direta para mostrar a casualidade entre o estresse oxidativo e o envelhecimento poderá ser a exploração do processo do envelhecimento na ausência do estresse oxidativo, o que significa estar fora o oxigênio, uma prática impossível.(Yu & Chung, 2006).

A centena de milhões de anos de processo de evolução tem ensinado que a vida aeróbica envolve extremos processos adaptativos para sobreviver num

ambiente com oxigênio. Desde a vida de organismos procariotos a dos complexos eucariotos têm sido desenvolvidos elaboradas seqüências de mecanismos adaptativos para a regulação da homeostase do oxigênio. Desse modo, a longevidade de uma espécie muito provavelmente depende do seu ajuste ao ambiente oxidativo e aos desafios, isto é, sua habilidade adaptativa. No período do estágio de adaptação, o oxigênio devia funcionar como defesa aos organismos contra a irradiação e a ameaça oxidativa. Um modo para determinar a eficácia da estratégia de sobrevivência sob condições de estresse oxidativo leva a pergunta: como organismos aeróbicos adaptados ao ambiente com oxigênio contornou os potenciais danos dos radicais livres e de outros derivados reativos relacionados aproveitando-os em benefício da fisiologia como mensageiros celulares e sinais transdutores de sistemas, atividade fagocitária e modulação do tônus vascular. De modo adicional, a determinação de formas de estratégias como mecanismos celulares protetores para minimizar danos oxidativos pela regulação da reatividade do radical livre. Teoricamente, é possível que se os sistemas de defesa são completamente funcionais para anular os danos oxidativos, o estresse oxidativo não deveria ser a maior ameaça para a sobrevivência dos organismos. No entanto, as bases do princípio das condições da subsistência, proveram sistemas de defesa de organismos com capacidade adaptativa como a maior estratégia contra o estresse oxidativo. Os processos adaptativos aos estressores foram documentados em uma série de estudos com animais, provindo várias respostas para dúvidas sobre os vários estágios ou fases de adaptação. Embora a exposição crônica ao estresse inicie ou acelere o envelhecimento fisiológico, estes estudos mostram uma resposta biológica bifásica. Sob condições primárias, o nível de estresse pode ser efetivo para induzir o organismo à adaptabilidade. Porém, muitos exemplos de mecanismos adaptativos têm mostramos que durante o desenvolvimento do processo da sobrevivência estes mecanismos mostraram-se comprometidos com o envelhecimento (Yu & Chung, 2006).

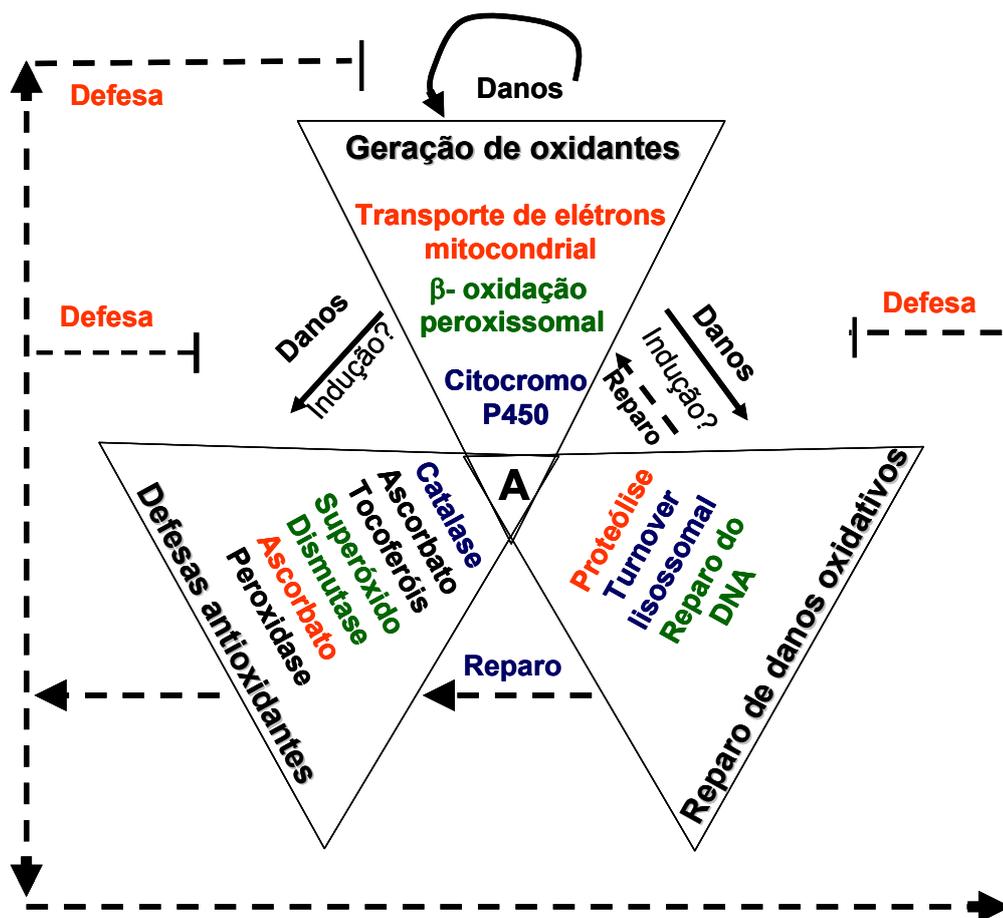
## **1.2. A Teoria do envelhecimento por radicais livres (“The Free Radical Theory”)**

Em 1956, Denham Harman sugeriu que os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbica causam danos oxidativos acumulativos, resultando

no envelhecimento e morte (figura 1). Ele estabeleceu o famoso paralelo entre os efeitos do envelhecimento e a radiação ionizante, incluindo mutagenese, câncer e graves danos celulares. Harman hipotetizou que a geração de radicais endógenos de oxigênio ocorre *in vivo*, como produto redox químico enzimático. Ele especulou que essas enzimas estão envolvidas na direta utilização do oxigênio molecular, particularmente as que contêm ferro. Finalmente ele hipotetizou que traços de ferro e outros metais que catalisam reações oxidativas *in vivo* e cadeias de reações peroxidativas podem estar nesse processo, tendo analogia com os princípios *in vitro* de polímeros químicos.

A Teoria do envelhecimento por radicais livres ganhou credibilidade com a identificação em 1969 da enzima superóxido dismutase (SOD) que forneceu a primeira evidência obrigatória da geração *in vivo* do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ). O uso da SOD com uma ferramenta para localizar sítios subcelulares da geração de  $O_2^{\cdot -}$ , levou a realização do fortalecimento da teoria do radical livre, isto é, que as mitocôndrias são a principal fonte de oxidantes endógenos. Em relação a esse fato, gerontologistas têm observado a longo do tempo que espécies com alto metabolismo tem um curto potencial de tempo de vida (“*Maximum life span potential*” - *MLSP*).

A compreensão de que o consumo de energia pela mitocôndria pode resultar na produção de  $O_2^{\cdot -}$ , interliga a teoria do radical livre irrevogavelmente com a teoria da vida. A respiração, associada com a grande geração de radicais de oxigênio, leva ao envelhecimento (Beckman & Ames, 1998).



**Figura 1.** O resultado final do estresse oxidativo é em função de: 1) Geração de oxidantes; 2) Defesas antioxidantes; 3) Reparo de danos oxidativos. As setas escuras denotam os danos oxidativos e as tracejadas as rotas de prevenção ou reparo. Envelhecimento (A) está situado na intersecção desses processos.(Adaptado de Beckman ad Ames,1998).

### **1.3.Sementes de plantas superiores como modelos de estudo do envelhecimento**

O fenômeno do envelhecimento e a Morte Celular Programada (PCD) são tipicamente estudados em humanos ou em células animais preferivelmente as plantas. No entanto, as sementes de plantas superiores representam excelentes modelos para o estudo do envelhecimento, pois a perda da viabilidade pode ser facilmente induzida experimentalmente (Kranner *et al.*, 2006). Sementes ortodoxas são tolerantes a dissecação e podem ser armazenadas no estado seco. Sementes recalcitrantes são sensíveis à dissecação (Roberts, 1973). Danos letais, como os avaliados por testes de germinação, podem ser induzidos por envelhecimento artificial em sementes ortodoxas, e pela desidratação em sementes recalcitrantes. A dinâmica da perda da viabilidade no estado seco e as bases das características biofísicas têm recebido muita atenção. A debilidade do estado vítreo do citoplasma, combinado com hidrolises de açúcares e o desencadeamento dos processos oxidativos, resultam em danos a lipídios, proteínas e DNA. Em particular os danos a macromoléculas são pontos fortes da ação ofensora do estresse oxidativo.

A fragmentação do DNA em fragmentos intranucleosomal é uma clássica indicação de PCD. Em sementes, a fragmentação intranucleosomal do DNA ocorre com o aumento intensivo da perda de viabilidade sugerindo que a morte durante o envelhecimento da semente no baixo estágio de hidratação (em sementes ortodoxas) ou durante a dissecação (em sementes recalcitrantes) levam a um controlado padrão de PCD. Sementes pré-tratadas antes do envelhecimento com inibidores de caspases (proteínas relacionadas ao programa de morte celular) têm sua viabilidade aumentada.(Kranner *et al.*, 2006).

### **1.4. Envelhecimento, deterioração e viabilidade de sementes**

A temperatura e a umidade têm um papel fundamental na determinação da longevidade das sementes durante o armazenamento. A umidade relativa alta combinada a uma temperatura elevada acelera o processo de deterioração de

sementes (Abba & Lovato,1999). A temperatura afeta a germinação total, a velocidade de germinação, a velocidade de absorção de água e as reações bioquímicas, que determinam todo o processo germinativo (Borghetti & Ferreira, 2004).

O padrão de envelhecimento da semente é em geral descrito em termos de conteúdo de água durante o armazenamento (Walters, 1998). Quanto maior o número de ciclos de hidratação-secagem o qual as sementes são submetidas, maior será a redução da germinação, sendo que estes efeitos deletérios aumentam com o período de hidratação (Willians, 1980). Em face disso, as condições ambientais para armazenamento de sementes constituem um sério problema em regiões tropicais úmidas. Especialmente nessas condições, a viabilidade das sementes é perdida durante períodos prolongados de armazenamento, pois, elas se deterioram e perdem sua habilidade de germinar. No entanto, a razão da deterioração de sementes varia entre espécies (Subba Rao *et al.*, 1996, Dhakal & Pandey, 2001). Particularmente, sementes de feijão são armazenadas na maioria das vezes sob condições ambientais não controladas (Vieira & Yokoyama, 2000). Embora a qualidade das sementes não possa ser melhorada durante o armazenamento, a preservação pode ocorrer quando as condições de conservação são favoráveis (Copeland & McDonald, 1995).

Muitas pesquisas têm sido conduzidas em prol do conhecimento da fisiologia do envelhecimento e deterioração das sementes, porém ainda não existem explicações definitivas (Walters, 1988; McDonald, 1999). A partir da maturidade fisiológica das sementes, processos degenerativos, físicos, fisiológicos ou bioquímicos, começam a ocorrer, caracterizando a deterioração. A deterioração é considerada como toda e qualquer mudança degenerativa, após a semente ter atingido sua máxima qualidade. A constituição genética parece determinar a sensibilidade das sementes ao processo de deterioração, em determinado ambiente. Além disso, como citado anteriormente, as condições de temperatura e umidade relativa do ar, durante o armazenamento, são de grande importância no processo da deterioração, não podendo ser evitada, no entanto, podendo ser minimizada no armazenamento sob condições adequadas. Durante o processo de deterioração ocorrem(Wilson & McDonald, 1986; Basavarajappa *et al.*, 1991):

- Danos genéticos;
- Perda da integridade do sistema de membranas;
- Redução da capacidade seletiva;
- Peroxidação de lipídios;
- Lixiviação de solutos;
- Mudanças na atividade respiratória das sementes;
- Modificações em atividades enzimáticas e síntese de proteínas;
- Incapacidade de manutenção do gradiente eletroquímico;
- Perda da compartimentalização celular;
  - Atraso na germinação;
- Redução do crescimento e vigor das plântulas;
- Aumento do número de plântulas anormais;
- Aumento da suscetibilidade a ataques de microrganismos patogênicos;
- Diminuição do potencial de armazenamento;
- Completa perda da capacidade germinativa;
- Morte das sementes.

### **1.5.Armazenamento de sementes**

A maneira correta de armazenar sementes de espécies economicamente importantes, deve ser aquela na qual seja preservada sua qualidade física, a fisiológica e a sanitária para posterior semeadura no ano seguinte (Silveira, 1999). O armazenamento de sementes de feijão é feito, geralmente, em condições ambientais não controladas, sendo a temperatura, umidade relativa do ar bem como os fatores inerentes à própria semente, como o teor de água determinantes na longevidade das sementes (Vieira & Yokoyama, 2000). O teor de água das sementes exerce influência acentuada e direta na longevidade destas, pois estimula a atividade metabólica do embrião (Macedo *et al.*, 1999). As sementes possuem natureza higroscópica e, dependendo das condições ambientais, podem ganhar ou perder água facilmente. Neste processo de hidratação secagem, geralmente, ocorrem danos ao tegumento que resultam na redução na qualidade

fisiológica (Copeland & McDonald, 1995). O armazenamento de sementes de feijoeiro com teor de água inicial superior a 13% resultará em danos provocados por mudanças no metabolismo celular, como o aumento da atividade enzimática e respiratória das sementes, propiciando o desenvolvimento de fungos, que serão favorecidos pela elevada temperatura (Vieira & Yokoyama, 2000). Condições ambientais adversas durante o armazenamento resultam no envelhecimento das sementes que podem apresentar desde redução da viabilidade até a completa perda do poder germinativo, produção de plântulas de menor tamanho, produção de plântulas anormais, dentre outros (Mattews, 1985; Bewley & Black, 1994; Pádua, 1998). Em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir o vigor, o que pode ser verificado pelo aumento da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição das sementes (Marcos Filho *et al.*, 1990; Lin, 1990; Salinas *et al.*, 1998).

Sementes do feijão Caupi em pequenas propriedades são armazenadas em garrafas de vidro, em recipientes com camadas de areia fina, latas de flandres e tambores de zinco. Nas médias e grandes propriedades, as sementes são armazenadas em tambores de zinco e silos metálicos (Santos *et al.*, 2003). As alternativas tecnológicas hoje disponíveis para uma melhor preservação, baseiam-se na manutenção constante de ambientes refrigerados e atmosferas modificadas com a presença de gases, que atuam na redução dos processos metabólicos e na respiração dos grãos (Brasil, 1992). Essas condições, contudo, são na prática complexas, caras e podem sofrer com fatores externos, como quedas de energia ou vazamentos, inviabilizando muitas vezes a manutenção desses procedimentos (Brasil, 1992).

### **1.5.1. Condições para o armazenamento de sementes**

Como princípios gerais do armazenamento temos: 1.) O armazenamento não melhora a qualidade das sementes, apenas as mantêm; 2.) Quanto maior a temperatura e a umidade no armazenamaento, maior será a atividade fisiológica da semente e mais rápida sua deterioração; 3.) A umidade é mais importante do que a temperatura; A umidade da semente é função da umidade relativa e em menor escala da temperatura; 4.) O frio seco é a melhor condição para o armazenamento de sementes ortodoxas; 5.) Sementes imaturas e danificadas

não resistem bem ao armazenamento, enquanto as sementes maduras e não danificadas permanecem viáveis por mais tempo; 6.) O potencial de armazenamento varia com a espécie; sementes armazenadas sempre deterioram com o passar do tempo. Essas condições são adequadas para sementes ortodoxas, enquanto para as recalcitrantes, nem sempre são aplicáveis. Espécies recalcitrantes, geralmente, necessitam manter a umidade com que foram colhidas, não suportando perdas superiores a 5% da umidade inicial para permanecerem viáveis. (Floriano, 2004).

Sementes ortodoxas são as que podem ser estocadas com menos de 10% de teor de umidade mantendo ou aumentando a longevidade e as sementes recalcitrantes não podem ser desidratadas para teor de umidade abaixo de 25% a 50%, dependendo da espécie, sem perder a viabilidade. Esta sensibilidade para dessecação tem implicações importantes no armazenamento de sementes. Sementes ortodoxas podem ser desidratadas sem dano para baixos teores de umidade e, sob uma extensa gama de ambientes, sendo que a longevidade no armazenamento aumenta com a diminuição do teor de umidade e da temperatura de modo controlado. (Cunha, 1986).

### **1.5.2.Princípios gerais do Armazenamento de sementes**

O armazenamento não melhora as qualidades do lote de sementes, apenas as mantêm (Cunha, 1986; Floriano, 2004).

1. Temperatura e umidade são os dois fatores mais importantes no armazenamento.
2. A umidade é mais importante do que a temperatura.
3. A cada 5,5°C de decréscimo de temperatura aumenta o dobro no potencial de armazenamento, no intervalo de 0 a 45°C.
4. A cada 1% de decréscimo na umidade, dobra o potencial de armazenamento, na faixa de 4 a 14%.
5. A umidade da semente é função da umidade relativa e em menor escala da temperatura.
6. As melhores condições para o armazenamento de sementes ortodoxas são clima frio e seco.

7. Sementes imaturas e danificadas não armazenam bem, enquanto as sementes maduras e não danificadas armazenam bem.
8. O potencial de armazenamento varia com a espécie.

### **1.5.3. Fatores que influenciam a longevidade das sementes armazenadas**

A longevidade das sementes armazenadas é influenciada principalmente pelos seguintes fatores (Cunha, 1986; Floriano, 2004):

1. Qualidade inicial das sementes;
2. Teor de umidade da semente;
3. Tempo decorrido entre colheita e o armazenamento;
4. Tratamentos fitossanitários e térmicos aplicados;
5. Tipo de embalagem;
6. Temperatura de armazenamento;
7. Umidade relativa de armazenamento.

### **1.5.4. Ambiente de armazenamento das sementes e temperatura**

#### **1.5.4.1. Armazenamento seco com baixa temperatura**

Este tipo de ambiente é adequado para armazenar sementes ortodoxas. Ele é obtido através de câmaras frias e desumidificadores. A temperatura de armazenamento é mantida entre 3 a 5 ° C para espécies ortodoxas temperadas e entre 10 e 20° C para espécies ortodoxas tropicais, com a umidade relativa do ar em torno de 45%. (Cunha, 1986; Floriano, 2004).

#### **1.5.4.2. Armazenamento úmido com baixa temperatura**

Este tipo de ambiente é utilizado para conservar sementes recalcitrantes que necessitam de ambiente úmido, como a *Araucaria angustifolia*. É obtido através de câmaras frigoríficas ou refrigeradores. A temperatura é mantida entre - 3° C e 5° C para as recalcitrantes temperadas e entre 7 e 17° C para as recalcitrantes tropicais, com a umidade relativa entre 98 e 99%, sendo que a maioria das recalcitrantes necessita de boa aeração. (Cunha, 1986; Floriano, 2004).

#### **1.5.4.3. Armazenamento à umidade e temperatura ambientais**

Esse tipo de ambiente é utilizado para sementes de espécies de tegumento duro. É necessário o uso de embalagens adequadas, preferencialmente semipermeáveis ou impermeáveis, dependendo da sensibilidade da espécie à desidratação. É recomendável para curto período de tempo. (Cunha, 1986; Floriano, 2004).

#### **1.6. Testes de vigor**

A qualidade de um lote de sementes encerra atributos que determinam seu valor para a semeadura, sendo de natureza genética, física, fisiológica e sanitária (Popinigis, 1985). Destaca-se, entre estes, o potencial fisiológico, por ser diretamente responsável pelo desempenho das sementes no armazenamento e no campo. Elegem-se como objetivos básicos da pesquisa sobre vigor de sementes (extremamente importante para a agricultura moderna) tentativas para solucionar problemas como a resistência de sementes de alta qualidade às condições adversas de campo e, conseqüente, emergência de plantas e produção. Essas pesquisas vêm procurando obter informações sobre o manejo de lotes durante o beneficiamento e armazenamento das sementes, de modo a possibilitar a manutenção de alto vigor das sementes pelo maior período possível.

Segundo Ferguson (1993) e Marcos Filho (1994), os testes de vigor descrevem informações adicionais sobre a qualidade fisiológica de sementes, como seu potencial de armazenamento e produção de plântulas normais em condições adversas.

##### **1.6.1. Teste de germinação**

O teste de germinação é utilizado em laboratórios para avaliar o potencial fisiológico das sementes. Ele deve ser conduzido em condições favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade para permitir ao lote expressar seu potencial máximo de produzir plântulas normais. No entanto, esse teste pode ser pouco eficiente para indicar o desempenho no campo, onde as condições ambientais nem sempre são ideais (Marcos Filho, 1999). A maior

limitação do teste de germinação, segundo Hampton & Tekrony (1995), é sua inability para detectar diferenças de qualidade entre lotes com alta germinação.

Por este motivo, têm sido desenvolvidos testes de vigor com o objetivo de identificar possíveis diferenças no potencial fisiológico de lotes que apresentam porcentagem de germinação semelhante, fornecendo informações complementares às obtidas no teste de germinação. Os testes de vigor são considerados muito importantes para a tomada de decisões no controle de qualidade das empresas produtoras de sementes, tendo em vista evitar o manuseio e a comercialização de sementes de baixa qualidade, ou fora dos padrões de qualidade. Eles têm sido bastante utilizados pelas empresas produtoras de sementes, porque podem revelar pequenas diferenças na deterioração de sementes de lotes comerciais, fornecendo informações mais confiáveis.

#### **1.6.2. Teste de envelhecimento acelerado**

O teste de envelhecimento acelerado desenvolvido por Delouche & Baskin (1973), tem sido bastante estudado e recomendado para diferentes espécies e vem sendo incluído em programas de controle de qualidade de empresas produtoras de sementes. Este teste tem como base o princípio de que lotes de alto vigor manterão sua viabilidade quando submetidos, durante curtos períodos de tempo, às condições severas de temperatura e umidade relativa do ar, enquanto que os de baixo vigor terão sua viabilidade reduzida, possibilitando a separação de lotes de sementes em diferentes níveis de vigor (Tekrony, 1993; Rodo *et al.*, 2000). O envelhecimento acelerado é eficiente para avaliar o vigor de lotes de sementes de feijoeiro e acompanhar a sua variação durante o período de armazenamento (Krzyzanowski *et al.*, 1982). Os testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada têm como princípio a aceleração do processo de deterioração (Rossetto & Marcos Filho, 1995). Lotes de sementes com percentuais de germinação semelhantes poderão apresentar diferentes níveis de deterioração (Krzyzanowski & Vieira, 1999). Diferenças de vigor de sementes somente são importantes quando ocorrem entre lotes que apresentam alta germinação e, portanto, disponíveis para a comercialização (Krzyzanowski &

Vieira, 1999). Na condução dos testes que avaliam o vigor das sementes, muitos fatores afetam o comportamento das sementes como o grau de umidade das sementes e temperatura de incubação. No teste de envelhecimento acelerado, as sementes mais úmidas mostram maior sensibilidade às condições de temperatura e de umidade relativa do ar, por apresentarem atividade metabólica intensificada sob estas condições de ambiente. Portanto, os efeitos do envelhecimento acelerado são mais acentuados em sementes com graus de umidade mais elevados (Marcos Filho *et al.*, 1987; Rossetto & Marcos Filho, 1995). Um dos aspectos importantes no uso deste teste é a determinação do conteúdo de água das sementes, que pode variar conforme o lote (Powell & Matthews, 2000).

### **1.6.3. Condutividade elétrica (CE)**

Para avaliar o nível de integridade das membranas celulares (Ferguson, 1995), a condutividade elétrica (CE) é considerada um ótimo teste de vigor. Esse teste permite medir a lixiviação de eletrólitos de tecidos vegetais, sendo utilizado para sementes e algumas espécies cultivadas (Hibbard & Miller, 1928). Brouwer & Mulder, (1982), utilizando o teste de CE em sementes de feijão, observaram ser um método rápido para detectar a baixa qualidade de lotes de sementes e ao mesmo tempo, a condutividade elétrica completava o teste de germinação para avaliar o potencial no campo. Atualmente, o teste de condutividade elétrica é usado extensivamente na Europa, Austrália e Nova Zelândia, para muitas espécies (Hampton & Coolbear, 1990; Salinas *et al.*, 2001).

### **1.7. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)**

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico ( $O_2$ ). Elas tipicamente resultam da excitação do  $O_2$  para formar oxigênio singleto ( $O_2^1$ ) ou da transferência de um, dois ou três elétrons do  $O_2$  para formar, respectivamente, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou radical hidroxila ( $HO^-$ ). Contrastando com o oxigênio atmosférico, as ROS podem promover a destruição oxidativa da célula.

ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com

aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $\text{H}_2\text{O}$ . Normalmente, a redução completa do  $\text{O}_2$  ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ROS é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons. Durante esse processo, são formados intermediários reativos como (ver também tabela 1) (Ferreira, 2003):

1. Radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que ocorre em quase todas as células aeróbicas formado após a primeira redução do  $\text{O}_2$ ;
2. Hidroperoxila ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ), que representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio, com fortes evidências de que é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas;
3. Hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), que é considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos;
4. Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que, apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o  $\text{OH}^{\bullet}$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com membranas e com proteínas.

A combinação extremamente rápida do  $\text{OH}^{\bullet}$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Dessa forma, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Adicionalmente, o radical hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas ( $-\text{SH}$ ) a pontes dissulfeto ( $-\text{SS}$ ), podendo também iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). (Ferreira & Matsubara, 2003).

$O_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido ou radical superóxido
$HO_2^{\bullet}$	Radical perhidroxil
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxila
$RO^{\bullet}$	Radical alcoxil
$ROO^{\bullet}$	Radical peroxil
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico (ex.: lipoperóxido)
$^1O_2$	Oxigênio singlet
$RO^{\bullet}$	Carbonila excitada

Tabela 1. Espécies reativas de Oxigênio (ROS). (Adaptado de Sies, 1991).

### 1.7.1. ROS em plantas

Em plantas, reações que envolvem o metabolismo normal como fotossíntese e respiração são fontes potenciais de ROS (tabela 2). Também nos peroxissomos, durante o aumento de estresse abiótico há um aumento de ROS durante a fotorespiração. Adicionalmente, nos recentes anos de pesquisa, novas fontes de ROS têm sido identificadas em plantas, incluindo NADPH oxidases, amino oxidases e peroxidases ligadas à parede celular. Elas participam da produção de ROS durante processos como a morte celular programada e a defesa contra patógenos. Em condições normais, a produção de ROS as células é baixa, e muitos processos rompem a homeostase celular de células aumentando a produção de ROS, como estresse por seca e dessecação, estresse salino, choque térmico, metais pesados, radiações UV, poluentes doar como ozônio e  $SO_2$ , estresse mecânico, ataque de patógenos e excesso de luz. (Mittler, 2002)

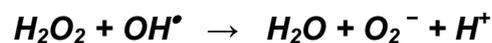
As ROS induzem a morte celular que resulta de processos oxidativos como a peroxidação de membranas, oxidação de proteínas, inibição de enzimas e

danos no DNA e RNA. Alternativamente, aumento nos níveis de ROS pode ativar a via PCD, como foi demonstrado pela inibição e estresse oxidativo (paraquat) induzindo morte celular em fumo por genes anti-apoptóticos. (Mittler, 2002).

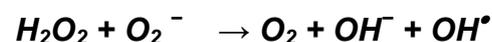
Pesquisas recentes sugerem que há várias possibilidades de vias de remoção de ROS em diferentes compartimentos celulares. Durante muito tempo, o cloroplasto foi considerado como sendo a maior fonte de produção de ROS nas células e conseqüentemente um dos maiores marcadores de danos durante o estresse. A mitocôndria é um outro sítio celular de produção de ROS. Além disso, recentes estudos sugeriram que a mitocôndria é também um regulador chave de PCD em plantas e o aumento dos níveis de ROS na mitocôndria podem “disparar” a PCD. Os peroxissomos também têm importância relevante no metabolismo de ROS. Eles não são somente o sítio de detoxificação de ROS pela CAT, mas também o sítio de produção de ROS pela gliocalato oxidase e  $\beta$ -oxidação dos ácidos grãos.

Um dos maiores mecanismos de remoção de ROS de plantas (figura 5) inclui a superóxido dismutase (SOD), peroxidase de ascorbato (APX) e catalase (CAT). O balanço entre as atividades de SOD e APX ou CAT nas células é crucial para determinar o nível de constante de radicais superóxidos e de peróxido de hidrogênio. Esse balanço, junto com o seqüestro de íons metais, previne a formação de radical hidroxila, altamente tóxico, via metal- dependente- Haber-Weiss ou de reações de Fenton.

*O ciclo Haber-Weiss consiste das duas reações a seguir:*



e



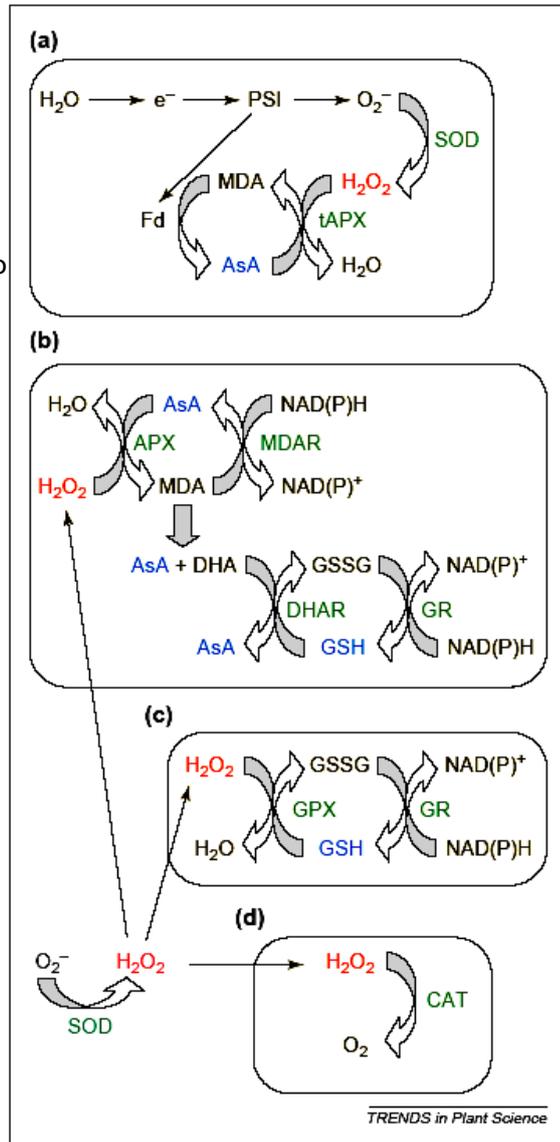
**Tabela 2.** Produção, localização, remoção e estratégias de “fuga” de espécies reativas de oxigênio em plantas.(Adaptado de Mittler,2002).

<b>Mecanismos</b>	<b>Localização</b>	<b>ROS</b>
<b>Produção</b>		
Fotossíntese	Cloroplastos	$O_2^-$
Respiração (CTE)	Mitocôndrias	$O_2^-$
Glicolato oxidase	Peroxisomos	$H_2O_2$
Clorofila excitada	Cloroplastos	$O_2^1$
NADPH oxidase	Memb. Plasmática	$O_2^-$
$\beta$ -Oxidação	Peroxisomos	$H_2O_2$
<b>Remoção</b>		
Superóxido dismutase	Chl,Cit,Mit,Per,Apo	$O_2^-$
Ascorbato peroxidase	Chl,Cit,Mit,Per,Apo	$H_2O_2$
Catalase	Per	$H_2O_2$
Ácido ascórbico	Chl,Cit,Mit,Per,Apo	$H_2O_2, O_2^-$
Glutationa	Chl,Cit,Mit,Per,Apo	$H_2O_2$
A-tocoferóis	Membranas	$ROOH, O_2^1$
Carotenóides	Cloroplastos (Chl)	$O_2^1$
<b>Escape</b>		
Adaptações anatômicas	Folha, epiderme	$O_2^-, O_2^1, H_2O_2$
Supressão fotossíntese	Cloroplasto	$O_2^-, O_2^1, H_2O_2$
Alternativa Oxidase	Chl, Mitocôndrias	$O_2^-$

Abreviações: Apo, apoplasto; Chl, cloroplasto; CW, parede celular; Cyt, citosol; ET, transporte de elétrons; Mit, mitocôndria;  $O_2^1$ , oxigênio singlet; Per, peroxissomo; PM,membrana plasmática; PS, fotosistema; ROS, espécies reativas de oxigênio; Vac, vacúolo.

A maior via de remoção de ROS de plantas inclui a enzima SOD, encontrada em muitos compartimentos celulares, nos cloroplastos, no ciclo da ascorbato-glutationa, no citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos. Em cloroplastos e em outros compartimentos celulares os antioxidantes ascorbato e glutaciona são encontrados em altas concentrações, como uma defesa crucial de plantas contra o estresse oxidativo. Geralmente a manutenção de uma alta redução pela razão entre ácido ascórbico e glutaciona é essencial para uma apropriada remoção de ROS nas células. Essa razão é mantida pela glutaciona redutase (GR), monodeidroascorbato redutase (MDAR) e deidroascorbato redutase (DHAR) usando NADPH como força redutora. (Mittler, 2002).

**Fig.5.** Vias de remoção de espécies reativas de Oxigênio (ROS) em plantas. (a) Ciclo água-água. (b) Ciclo ascorbato glutaciona. (c) Ciclo glutaciona peroxidase (GPX). (d) Catalase (CAT). Superóxido dismutase (SOD) age como a Primeira linha de defesa convertendo  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ . Ascorbato peroxidase (APX), GPX e CAT que detoxifica  $H_2O_2$ . Em contraste a CAT (d), APX e GPX requerem ascorbato (AsA) e/ou a glutaciona (GSH) Regenerando o ciclo (a–c). Esse ciclo usa elétrons Diretamente do aparato fotossintético (a) ou NAD(P)H (b,c) como Força redutora. ROS estão indicados em vermelho, antioxidantes em azul e Enzimas removedoras de ROS em verde. Abreviaturas: DHA, deidroascorbato; DHAR, DHA redutase; Fd, ferredoxina; GR, glutaciona redutase; GSSG, Glutaciona oxidada; MDA, monodeidroascorbato; MDAR, MDA redutase; PSI, fotossistema I; tAPX, APX ligado ao tilacóide.



## 1.8. ROS e viabilidade de sementes

As ROS têm sido estudadas largamente no campo da fisiologia de sementes, sendo particularmente ressaltado o estudo da sua relação com a perda do vigor e da viabilidade de sementes durante prolongado armazenamento. Um grande número de contribuições atualizadas nesse campo tem sido relacionado ao papel das ROS na perda de vigor e viabilidade durante o prolongado armazenamento de sementes ortodoxas tolerantes a dissecação. O acúmulo de ROS é freqüentemente indicado como a primeira causa da deterioração de sementes, gerando reações com ácidos graxos polinsaturados, levando a peroxidação lipídios e a destruição das membranas celulares (Senaratna *et al.*, 1988; Pukacka, 1991; McDonald, 1999).

A peroxidação de lipídios, uma conseqüência da reação de lipídios que compõem a membrana celular, principalmente os polinsaturados, com o  $O_2^-$ , resultando em radicais livres e peróxidos instáveis (Vieira & Carvalho, 1994), tem sido veementemente citado como o maior responsável pelo envelhecimento de sementes (Priestley, 1986; McDonald, 1999). Além disso, é sabido que mecanismos protetores de danos oxidativos como a enzima catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) e a superóxido dismutase (SOD) estão relacionados com a deterioração de sementes (Bowler *et al.* 1992, McDonald 1999).

O envelhecimento acelerado reduz a viabilidade e o vigor das sementes em muitas espécies de importância econômica. O fenômeno é em parte devido a peroxidação de lipídios induzida pelo envelhecimento que potencialmente danifica membranas de tecidos de sementes (Sung & Jeng, 1994).

Em cultivares de amendoim (Sung & Jeng, 1994), sementes envelhecidas a 45 °C e 99% de umidade relativa, o aumento da peroxidação de lipídios e a inibição das enzimas superóxido dismutase, peroxidase e ascorbato peroxidase foi observado. Dois maiores antioxidantes solúveis em água, ascorbato e glutathione foram mensurados nesse trabalho com um significativo decréscimo de ambos nas sementes com o armazenamento. Em algodão (Anuradha *et al.*, 2002), sementes envelhecidas artificialmente a 40°C e 100% de umidade relativa tiveram sua germinabilidade decrescida, deterioração de membranas e aumento da perda de eletrólitos com o progresso do envelhecimento artificial. O decréscimo na germinabilidade foi correlacionado com o aumento da acumulação

de peróxidos e decréscimo da atividade das enzimas antioxidantes catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase. Segundo os autores, esses resultados sugerem que a deterioração de sementes durante o envelhecimento acelerado está intimamente relacionado com a atividade de várias enzimas removedoras de peróxidos e a peroxidação de lipídios. Em sementes de *Ginkgo biloba* L. houve um significativo aumento da peroxidação de lipídios tanto no embrião quanto no endosperma (Tommasi *et al*, 2006). Durante o armazenamento uma progressiva deterioração do tecido do endosperma foi evidente.

### **1.9. ROS, mitocôndria e o envelhecimento**

As mitocôndrias são a maior fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, que aumenta consideravelmente de produção durante o envelhecimento, sendo a cadeia respiratória uma das maiores fontes endógenas de ROS. Essas organelas são alvos de danos oxidativos. Os efeitos deletérios das ROS podem ser responsáveis por prejuízo funcional das mitocôndrias observado durante o envelhecimento. Dessa forma, as proteínas mitocondriais representam excelentes alvos para modificações oxidativas e perda de função. (Bulteau, 2006).

A membrana interna de mitocôndrias de plantas contém a cadeia transportadora de elétrons (mtCTE), consistindo de complexos de proteínas que usam como fonte de energia um gradiente de prótons através da membrana. Esse gradiente de prótons passa pela ATP sintetase sendo os elétrons transferidos diretamente da ubiquinona a oxidase terminal, onde o oxigênio é reduzido até água.

As ROS são produzidas em condições normais de respiração, mas podem aumentar consideravelmente em resposta a uma larga faixa de condições anormais, incluindo exposição aos estresses bióticos e abióticos. Os marcadores da reatividade de ROS concernentes a moléculas biológicas, incluem lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, requerendo múltiplos mecanismos para harmonizar os níveis de controle de ROS mitocondriais, incluindo vias que atenuem a formação de mtROS em resposta a estresses impostos como sistemas antioxidantes protetores. Porém, quando ROS mitocondriais formadas excedem

os níveis normais a despeito da ação desses mecanismos protetores, elas podem promover conseqüências para a célula, incluindo a alteração de expressão de genes e eventualmente a morte celular programada (PCD). As ROS não são simples causadores de danos, mas também exercem a função de sinalizadores. As ROS podem alertar a célula para minimizar seus níveis para que não sejam suficientes para causar danos, como uma prevenção de larga escala de danos.

Proteínas mitocondriais podem ser danificadas ou inibidas por condições oxidativas de várias formas como: oxidação direta de aminoácidos por ROS, como a oxidação de resíduos de cisteína para formar pontes dissulfeto, oxidação de resíduos arginina, lisina, proteínas e resíduos de treonina com formação de grupos carbonilas nas cadeias laterais.

Particularmente, as proteínas da matriz mitocondrial são sensíveis à inativação oxidativa e as proteínas oxidadas acumulam-se durante o envelhecimento. O declínio da atividade e da regulação do sistema proteolítico nas mitocôndrias pode estar sujeito à acumulação de modificações oxidativas e funcionais das proteínas e perda da viabilidade das mitocôndrias. A falta de sistemas de manutenção das proteínas é considerada um componente crítico no processo de envelhecimento. No Citosol, o proteosomo constitui a maior maquinaria proteolítica envolvida na eliminação de proteínas oxidadas, no entanto, esse complexo proteolítico não está presente na mitocôndria. (Bulteau, 2006).

Danos oxidativos as proteínas mitocondriais incluem subunidades do complexo piruvato descarboxilase, subunidades da ATP sintase e das enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico. Adicionalmente, proteínas oxidadas pelo tratamento com  $H_2O_2$ , marcadas com dinitrofenilidrazina, que forma ligações covalentes com grupos carbonila resultam na oxidação de aminoácidos. (Rhoads *et al*, 2006).

A peroxidação de ácidos graxos polinsaturados de membrana mitocondrial é iniciado com a abstração de um átomo de hidrogênio pelas ROS, especialmente por radicais hidroxila. Uma vez formados, os produtos da peroxidação de lipídios, como aldeídos citotóxicos e malondialdeído, podem causar danos celulares pela reação com proteínas, outros lipídios e com ácidos nucléicos. Além disso, radicais hidroxilas por serem altamente reativos podendo danificar DNA mitocondrial e nuclear. A acumulação de danos ao DNA

mitocondrial causados pelas ROS causam decréscimo na função mitocondrial e contribuem com doenças e o envelhecimento. (Rhoads *et al*, 2006).

Em plantas, os superóxidos produzidos pela CTE (Cadeia Transportadora de Elétrons) podem ser reduzidos por mecanismos como as enzimas mitocondriais AOX (Alternativa Oxidase) e UCP que diminui a produção de ROS. Os superóxidos gerados da CTE mitocondrial é dismutado inicialmente a  $H_2O_2$  pela Superóxido dismutase mitocondrial dependente de manganês e o  $H_2O_2$  é removido pelo ciclo ascorbato glutationa. A ascorbato peroxidase reduz o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  usando ascorbato, que é reduzido pela ação seqüencial da monodeidroascorbato redutase e deidroascorbato redutase. (Rhoads *et al*, 2006).

Os sistemas antioxidantes de mitocôndrias de plantas podem conectar as ROS mitocondriais a outros processos celulares. Glutaciona e ascorbato, por exemplo, induzem a expressão de genes de defesa de plantas e são sinais indicativos de estado redox celular e PCD (Rhoads *et al*, 2006).

### **1.10. ROS, proteínas e o envelhecimento**

Oxidantes em geral produzem modificações em proteínas levando à perda da função e aumentando a taxa de degradação das proteínas oxidadas. Proteínas severamente oxidadas parecem ser substratos de difícil ubiquitinação, primeiro agregando-se e então formando ligações cruzadas que as tornam altamente resistentes à proteólise. A incapacidade de degradar proteínas extensivamente oxidadas pode contribuir para o acúmulo de agregados protéicos que ocorre, sobretudo durante o processo de envelhecimento. Uma importante consequência biológica da oxidação de proteínas é a oxidação posterior do DNA pelos peróxidos formados. Eles são capazes de clivar o DNA em experimentos realizados com plasmídio. Desta forma, a geração inicial de peróxidos nas proteínas nucleares, tais como as histonas, pode promover um dano subsequente ao DNA, incluindo ligações cruzadas DNA-proteína e mutações.(Ronsein *et al.*, 2006).

### 1.10.1. Oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e a oxidação de proteínas

No estado fundamental, O oxigênio molecular, possui dois elétrons com *spins* paralelos ocupando dois orbitais  $\pi$  de mesma energia, denominados de degenerados. Conseqüentemente, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio singleto pode ser gerada por um acréscimo de energia. Nela, a restrição da regra de conservação do spin é removida. Dessa forma, o oxigênio singleto é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental. Existem dois estados singleto do oxigênio: o primeiro estado excitado, tem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida em solvente aquoso de aproximadamente  $10^{-6}$  s; o segundo estado excitado, tem um elétron em cada orbital  $\pi$  degenerado, com spins opostos, e possui uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental. O segundo estado tem um tempo de vida muito curto ( $10^{-11}$  s) em meio aquoso, sendo rapidamente desativado para o primeiro estado. Portanto, apenas o primeiro estado apresenta interesse em sistemas biológicos e será denotado por  $^1\text{O}_2$ . (Ronsein *et al.*, 2006).

Os hidroperóxidos de proteínas gerados a partir do  $^1\text{O}_2$  podem sofrer decomposição térmica ou catalisada por íons metálicos, gerando radicais peroxila:



Os hidroperóxidos de proteínas também podem sofrer redução por um elétron, gerando radicais alcoxila (reação de Fenton):



Portanto, a formação de peróxidos em uma proteína a partir do  $^1\text{O}_2$  pode resultar em danos subseqüentes a outras proteínas. Estes danos incluem inativação enzimática.

A remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  das células pela catalase é de suma importância para a vida, pois, este peróxido pode originar espécies mais reativas, tais como

$^1\text{O}_2$  e radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ). Estudos mostraram que a oxidação da catalase pelo  $^1\text{O}_2$  gera espécies enzimáticas com pontos isoelétricos mais ácidos. A modificação parece ocorrer no grupo heme da enzima. A presença deste grupo heme modificado foi sugerida como indicadora da geração de  $^1\text{O}_2$  *in vivo*. Contrastando com as modificações causadas ao grupo heme da catalase, verificou-se que o  $^1\text{O}_2$  promove a oxidação de resíduos de metionina e tirosina do citocromo c. O citocromo c é uma heme proteína mitocondrial fundamental no processo respiratório. Esta heme proteína também é envolvida na cascata apoptótica, pois a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol promove a ativação das caspases, desencadeando a apoptose celular. Contudo, os efeitos desta oxidação no apoptose celular ainda precisam ser detalhados. (Ronsein *et al.*, 2006)

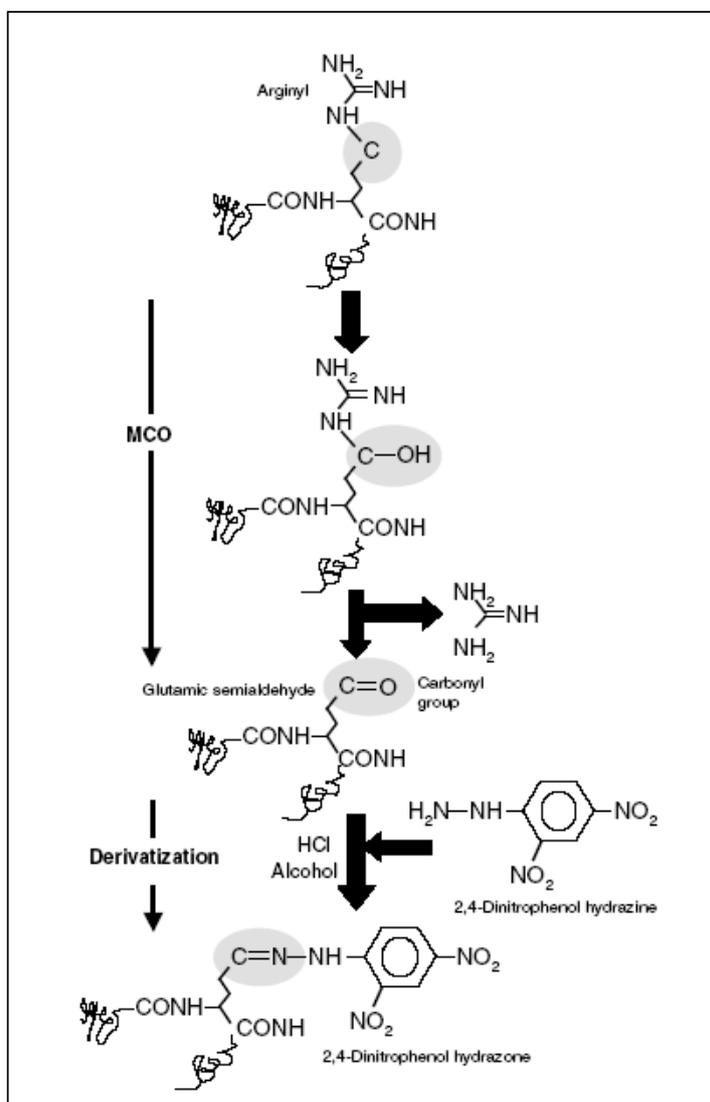
A oxidação de proteínas mediada por radicais livres resulta na formação de grupos carbonila em quantidades que refletem a intensidade do estresse oxidativo (figura 6). A formação de grupos carbonila em resíduos de aminoácidos com resultado de reações com radicais livres é bem documentada. A formação da carbonila é uma marcação para a degradação e turnover da proteína e pode levar a inativação enzimática da proteína ativa. A formação de grupos carbonila ocorre durante o envelhecimento normal. A formação de carbonila é aumentada por estresse oxidativo e associado com várias doenças incluindo doença de Alzheimer e artrite reumática. (Nystrom, 2005).

Um grande número de estudos tem mostrado que a carbonilação de proteínas aumenta com o envelhecimento de células, organelas e tecidos de várias espécies e em muitos casos, a carbonilação tem sido relacionada ao envelhecimento. Em muitos casos, o nível de proteínas carboniladas danificadas tem sido associado com o envelhecimento fisiológico ou com a expectativa de vida do organismo em relação ao seu envelhecimento cronológico.

A tarefa da identificação de fatores que causam o envelhecimento relacionando-o a carbonilação tem sido difícil, pois são muitas as possibilidades envolvidas com o processo do envelhecimento como, o declínio do sistema de defesa antioxidante, o aumento da produção de ROS, a diminuição da capacidade de remoção de proteínas oxidadas ou o aumento da susceptibilidade do de proteínas ao ataque oxidativo.

Análises bioquímicas revelaram que grupos carbonila introduzidos nas cadeias laterais de específicos aminoácidos num centro ativo que dispara as etapas iniciais da degradação de enzimas. Estudos paralelos com o envelhecimento de animais são similares, identificando a carbonilação oxidativa como um importante fator na função e remoção da proteína. No entanto, as possibilidades não são mutuamente excludentes. Por exemplo, tem sido demonstrado que catalases aumentam com o envelhecimento em muitos tecidos, e é possível que o aumento no nível de carbonilação é uma consequência direta da diminuição da atividade primária de sistemas oxidantes de defesa. Isto aparece devido o clássico envolvimento da detoxificação de ROS que são as enzimas superóxido dismutases, catalases e peroxidases, membros chaves da defesa celular contra a carbonilação de proteínas. (Nystrom, 2005).

Derivados carbonilados são formados por catalise oxidativa por metal com ataque da cadeia lateral do aminoácido prolina, arginina, lisina e treonina. Comparado a outras modificações oxidativas. Diferentes métodos sensíveis têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação de grupos carbonila. Um clássico método da detecção de proteínas carboniladas envolve reação com 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) acompanhada por quantificação espectrofotométrica de ácidos hidrazonas a 370nm. (Nystrom, 2005)



**Figura 6.** Carbonilação e derivatização de aminoácidos de cadeia lateral de uma proteína. Um esquema que demonstra a derivatização pelo 2,4-diitrofenil hidrazina. O resultado, 2,4-dinitrofenil hidrazona, que pode ser detectado por anticorpos específicos monoclonal ou policlonal. (Adaptado de Nystrom,2005).

### 1.11. ROS, os peroxissomos e o envelhecimento

O oxigênio é consumido em várias reações metabólicas em diferentes localizações onde, mitocôndrias, retículo endoplasmático (RE), peroxissomos, constituem os maiores sítios. A via da respiração nos peroxissomos não está acoplada a fosforilação oxidativa, e não leva a produção de ATP. Energia livre é liberada em forma de calor.

O alto consumo de  $O_2$ , pela demonstração da produção de  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}OH$ , e recentemente de  $^{\bullet}NO$  nos peroxissomos, é um suporte para a noção de que essa organela tem uma função chave tanto na produção quanto na remoção de ROS na célula, em particular  $H_2O_2$ . Os principais processos metabólicos que contribuem para a geração de  $H_2O_2$  nos peroxissomos, são a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, as reações enzimáticas de flavinas oxidases, e em peroxissomos de plantas, a reação da glicolato oxidase, da fotorespiração. Foi estimado que cerca de 35% de todo  $H_2O_2$  formado em fígado de ratos deriva de oxidases de peroxissomos. Para degradar as ROS, que são produzidas devido a sua atividade metabólica e para a manutenção do equilíbrio entre produção e remoção de ROS, os peroxissomos abrigam um poderoso mecanismo de defesa e enzimas antioxidante em adição a catalase.

Petriv & Rachubinski (2004), utilizando mutantes genéticos do nematodo *C.elegans*, verificaram que, a ausência da catalase peroxissomal causou um fenótipo envelhecido nessa espécie. Em contraste, a ausência da catalase citosólica não afetou o *C.elegans* por interferência no seu desenvolvimento nem tampouco por envelhecimento. O rápido envelhecimento do mutante alterou a morfologia do peroxissomo sugerindo que ocorreram alterações funcionais nos peroxissomos incluindo o aumento da produção de ROS induzindo o fenótipo de envelhecimento. Dessa forma, os autores sugerem que o estudo da importante função da catalase peroxissomal em ambos, desenvolvimento e envelhecimento em *C. elegans* é modelo conveniente para o estudo do envelhecimento.

### 1.12. ROS e a oxidação de lipídios

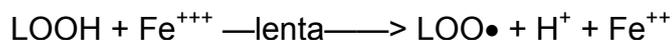
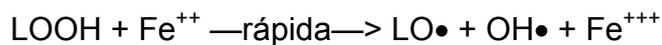
Componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que

acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, ocorre perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento e do câncer.

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:



A reação começa com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Esse seqüestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}\bullet$  ou pelo  $\text{LO}\bullet$  (radical alcoxila), com conseqüente formação do  $\text{L}\bullet$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $\text{L}\bullet$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{LOO}\bullet$  (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o  $\text{L}\bullet$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $\text{L}\bullet$  e  $\text{LOO}\bullet$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios. A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcoxila,  $\text{LO}\bullet$  e peroxila,  $\text{LOO}\bullet$ ), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação. Essas reações, que podem ser rápidas ou lentas, dependem da valência do ferro:



O radical hidroxila ( $\text{OH}\bullet$ ) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação.(Ferreira,2004).

### 1.13.Antioxidantes

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com aqueles substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa. Estas substâncias antioxidantes podem ser de natureza enzimática ou não-enzimática (Halliwell & Gutteridge, 1989).

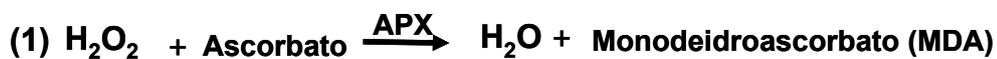
#### 1.13.1.Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico, glutatona,  $\alpha$ -tocoferóis e carotenóides ocorrem em altas concentrações nos vegetais. A vitamina C (ácido ascórbico) é hidrossolúvel e também age contra os radicais livres e o oxigênio singlete. O ácido ascórbico é necessário *in vivo* como cofator de várias enzimas, sendo a mais impressionante propriedade química do ascorbato, a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons), participando ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E. A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), um importante antioxidante não-enzimático, é considerado o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares atuando na proteção contra a lipoperoxidação. A vitamina A tem pouca ação antioxidante e é incapaz de agir sobre o oxigênio singlete, mas seu precursor, o  $\beta$ -caroteno, é o mais eficiente ligante desta forma reativa de oxigênio encontrada na natureza e pode agir como antioxidante. Existe ainda, uma série

de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reativas do oxigênio nos sistemas biológicos como, por exemplo, a ubiquinona, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal. Além destes, há vários nutrientes essenciais de origem mineral, que participam do processo antioxidante em associação com enzimas. São eles, zinco, cobre, manganês, selênio e ferro (Halliwell & Gutteridge, 1989).

### **1.13.2. Antioxidantes enzimáticos**

O mecanismo mais funcional que retira as ROS em plantas (figura 7) inclui as enzimas dismutase de superóxido (SOD), a peroxidase de ascorbato (APX) e a catalase (CAT) (Willekens, *et al.*, 1997; Bowler *et al.*, 1992). O balanço entre a atividade da SOD e da APX ou da CAT nas células, é crucial para determinar o nível “*steady-state*” de radicais superóxidos e peróxidos de hidrogênio (Bowler *et al.*, 1992). Esse balanço, juntamente com o seqüestro de íons metálicos, é extremamente importante na prevenção da formação do aumento de radicais tóxicos via metal dependente da reação de Haber-Weiss ou reações de Fenton. A diferente afinidade da APX (faixa de  $\mu\text{M}$ ) e da CAT (faixa de mM) para  $\text{H}_2\text{O}_2$  sugere que estas enzimas pertencem a duas classes distintas. No que concerne à retirada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , APX pode ser responsável pela modulação fina da sinalização para ROS, enquanto CAT pode ser responsável pela remoção do excesso de ROS durante o estresse. Os modos de ação dessas enzimas são essencialmente diferentes. A catalase catalisa a dismutação de duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até água e oxigênio molecular, enquanto a APX usa substratos para reduzir  $\text{H}_2\text{O}_2$  até água. A enzima APX tem maior afinidade por  $\text{H}_2\text{O}_2$  do que a catalase, porém, a catalase tem um  $V_{\text{máx}}$  mais elevado. (Asada, 1992).

**a) Superóxido dismutase:****b) Catalase:****c) Ciclo da Ascorbato-glutationa:****d) Ciclo da Glutationa Peroxidase:**

**Figura 7.** O principal modelo de remoção enzimática de ROS pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), o ciclo ascorbato-glutationa, e o ciclo da glutaciona peroxidase (GPX). SOD converte superóxido em peróxido de hidrogênio. CAT converte peróxido de hidrogênio em água. Peróxido de hidrogênio é também convertido em água pelo ciclo ascorbato-glutationa. O agente redutor da primeira reação catalisada pela ascorbato peroxidase (APX) é o ascorbato, que é oxidado a monodeidroascorbato (MDA). MDA redutase (MDAR) reduz MDA a ascorbato na presença de NAD(P)H. Deidroascorbato (DHA) is produzido espontaneamente por MDA e pode ser reduzido a ascorbato por DHA redutase (DHAR) com a ajuda de GSH que é oxidado a GSSG. O ciclo termina com glutaciona redutase (GR) convertendo GSSG de volta a GSH com o agente redutor NAD(P)H. O ciclo GPX converte peróxido de hidrogênio a água usando equivalentes redutores de GSH. GSSG oxidado is novamente convertido em GSH pela GR e pelo agente redutor NAD(P)H. (Adaptado de Apel & Hirt, 2004)

### 1.13.2.1. Superóxido dismutases

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. A SOD dependente do cobre-zinco (SOD Cu,Zn) é muito estável e parece estar presente em praticamente todas as células eucarióticas (plantas ou animais) (Halliwell & Gutteridge, 1989). A SOD Cu,Zn eucariótica, tem massa molecular de 32.000 Da e é constituída de duas subunidades protéicas idênticas, com um átomo de cobre e um de zinco em cada uma delas. O cobre sofre oxidações e reduções alternadas durante a dismutação do superóxido, enquanto o zinco atua na estabilização da proteína. A SOD Cu,Zn, a forma citoplasmática da SOD, tem sido localizada também, em cloroplastos e suas propriedades têm sido marcadamente resistentes às pressões seletivas, podendo-se distinguir a enzima obtida de fungos, plantas, aves e mamíferos com facilidade (Fridovich, 1977). As SODs-Fe são tipos de SODs encontradas em cloroplastos de plantas e algas, podendo formar dímeros ou tetrâmeros. Os átomos de ferro e manganês atuam de forma semelhante ao átomo de cobre, na ciclagem redox para a dismutação do  $O_2^-$ . As superóxido dismutases dependente do manganês (SODs Mn) são proteínas mitocondriais, tanto em animais como em plantas, formam homotetrâmeros cuja massa molecular é de 40.000 Da e contêm manganês nos seus sítios ativos. A sua atividade diminui em pH alcalino (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Com relação à inibição das diferentes formas de SOD, pode-se afirmar que as isoformas dependentes de Cu/Zn são inibidas pelo cianeto e por  $H_2O_2$  em concentrações acima de 10  $\mu$ M (Fridovich, 1977), enquanto a SODs Mn não são inibidas nas mesmas condições, sendo resistentes ao KCN e ao  $H_2O_2$ . As SODs dependentes de Fe são resistentes a cianeto, porém, são inibidas por  $H_2O_2$  (Droillard *et al.* 1990). Com dados bioquímicos e imunológicos, localizações subcelulares alternativas foram propostas para algumas SODs. Atividades SOD Mn e SOD Cu,Zn foram demonstradas em peroxissomos de ervilha e melancia, respectivamente (Scandalios, 1993), e SODs Cu,Zn foram imunolocalizadas no núcleo e apoplasto de espinafre (Ogawa *et al.*, 1996).

Enquanto a maioria dos organismos possui apenas uma isoforma de cada classe, as SODs de plantas são codificadas por pequenas famílias gênicas. Em

*Arabidopsis*, um cDNA foi identificado para SOD Mn (*MSD1*), três para SOD Fe (*FSD1 A FSD3*) e mais três para SOD Cu/Zn cloroplástica (*CSD1 a CSD3*). Em tabaco, dois genes (*Sod A1* e *Sod A2*) codificam isoformas mitocondriais, porém, apenas um gene foi isolado para SOD Fe (*SodB*), um para SOD Cu,Zn cloroplástica (*SodCp*) e um terceiro para SOD Cu,Zn citosólica (*SodCc*) (Khanna-Chopra *et al.*, 2004). Em milho, nove genes distintos codificam SODs: *Sod1*, *Sod2*, *Sod3*, *Sod4* e *Sod5*, codificam isoformas dependentes de Cu,Zn, sendo SOD-1 de localização cloroplástica e as outras, isoformas citosólicas. Em arroz, cinco genes ou cDNAs foram identificados e estudados (Khanna-Chopra *et al.*, 2004). Em *Chenopodium murale*, seis isoformas de SOD foram identificadas (*SOD I a SOD VI*) sendo que a SOD V demonstrou estabilidade após uma extração por dez minutos em temperatura de ebulição e foi identificada como uma SOD Cu,Zn cloroplástica. Nesse trabalho, acima da temperatura de 60 °C ocorreu o aparecimento de uma nova SOD com alta mobilidade eletroforética (Khanna-Chopra *et al.*, 2004).

#### 1.13.2.2. Catalases

Uma das mais importantes enzimas antioxidantes é a catalase (oxirredutase  $H_2O_2:H_2O_2$ , CAT, EC 1.11.1.6), uma enzima tetrâmera presente em todos os organismos aeróbicos, protegendo esses organismos contra os efeitos tóxicos do  $H_2O_2$  e outras espécies reativas do oxigênio (Scandalios,1993). A CAT apresenta quatro subunidades idênticas, cada uma com massa molecular aproximadamente de 56-60 kDa (Guan & Scandalios,1992). Porém existem relatos de catalases heterotetrameras (Turley, 1990). Geralmente, catalases de plantas são tetrâmeros com aparente massa molecular em torno de 220 to 240 kDa. (Kunce,1988).

A atividade catalítica da catalase pode ser inibida por superóxido, azida, cianeto de hidrogênio (HCN), não sendo, entretanto, inibida por outros íons cianetos ( $CN^-$ ). No entanto, o inibidor mais usado é o aminotriazol. Com relação ao pH, pode-se observar uma diminuição da sua atividade abaixo de pH 4,0. Na faixa de pH 4,0 a 8,5, a atividade da enzima permanece constante (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A catalase está presente na matriz dos peroxissomos e, ocasionalmente, forma cristalóides (cores) em plantas (Heinze, 2000; Corpas *et al.*, 1999). Em plantas superiores, o metabolismo oxidativo gera ROS, como superóxidos, radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em peroxissomos e glioxissomos. Essas moléculas tóxicas são formadas durante as funções metabólicas normais em peroxissomos ou induzidas por estímulos ambientais aos quais os organismos são expostos. Por exemplo, moléculas de  $H_2O_2$  são produzidas pelas acil-CoA oxidases, no início da oxidação dos ácidos graxos, nos glioxissomos. Superóxidos resultam de oxidações do NADH e certos metabólitos no interior dos glioxissomos, são convertidos em  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase (Del Rio, & Donaldson, 1995). Embora o  $H_2O_2$  seja uma molécula nociva, ela tem suas vantagens tanto em plantas quanto em animais, participando de cascatas sinalizadoras na indução da expressão de genes de defesa, como por exemplo, genes relacionados a patógenos (Kenton *et al.*, 1995).

As catalases são proteínas amplamente distribuídas nos organismos vivos, estando presentes em bactérias, alguns eucariotos inferiores, fungos, animais e vegetais (Orendi *et al.*, 2001). Uma principal localização subcelular destas proteínas são os peroxissomos. As catalases de plantas (contrastando com os animais, que possuem apenas uma isoforma de CAT), são constituídas por uma família gênica pequena de três membros, fato esse inicialmente demonstrado em milho e, posteriormente, em tabaco (Havir e McHale, 1989; Willekens *et al.*, 1997), algodão (Ni *et al.*, 1991), *Arabidopsis* (Frugoli *et al.*, 1996; McClung *et al.*, 1987) e arroz (Iwamoto *et al.*, 1998). As CATs foram estudadas mais extensivamente em milho (Scandalios, 2002), onde três genes, *Cat1*, *Cat2* e *Cat 3*, codificam três isoformas distintas CAT-1, CAT-2 e CAT-3. As CAT-1 e CAT-2 foram localizadas no citosol, em glioxissomos e peroxissomos, enquanto CAT-3 possui localização mitocondrial. Dentro do glioxissomo, CAT catalisa a decomposição tóxica do  $H_2O_2$  produzido como resultado da oxidação de ácidos graxos (Beevers, 1979).

O efeito da atividade de catalase glioxissomal em eixo embrionário e endosperma na germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L., cv. Hale) foi examinado. Nesse estudo com sementes de mamona, a remoção do eixo embrionário levou ao decréscimo máximo da atividade da catalase em estrato de células livres do endosperma (Mullen *et al.*, 1995).

Em estudos recentes foi observado que a germinação está estritamente relacionada com a atividade da catalase (Bailly *et al.*, 1998, 2000, 2002). Em girassol, por manipulação da germinabilidade das sementes com tratamento de envelhecimento acelerado e controle de embebição, observou-se que esta enzima realiza um papel durante a dessecação da semente pela prevenção de danos oxidativos relacionados à desidratação, e que o  $H_2O_2$  pode realizar um papel de regulação da expressão gênica da CAT e da via de transdução de sinal de desidratação. (Bailly *et al.*, 2000, 2002).

### 1.13.2.3. Ascorbato peroxidases

As plantas possuem dois tipos de heme-peroxidases: as não específicas, secretadas no espaço extracelular (POX, EC 1.11.1.7) e as ascorbato peroxidases (Foyer & Noctor, 2000). Ascorbato peroxidases (APXs), que catalisa o primeiro passo do ciclo da ascorbato-glutationa (Foyer & Noctor, 2000), são as mais importantes peroxidases que detoxifica  $H_2O_2$  em plantas. Estas enzimas são heme-peroxidases cujo grupo prostético é a protoporfirina e foram imunolocalizadas nos cloroplastos (Asada, 1992), no citosol, membranas de peroxissomos e glioxissomos e nos cloroplastos (Foyer & Noctor, 2000; Foyer e Noctor, 2003; Mittova *et al.*, 2003). Elas possuem alta especificidade para o ascorbato como substrato redutor, sendo inibidas por cianeto e azida. As APXs catalisam a redução de  $H_2O_2$  a água e, juntamente com as CATs, são responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio a água.

O nível de atividade da APX foi investigado em plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) tratadas a 42 °C por 24h. Nesse trabalho, resultados revelaram que a atividade da APX nessas condições exerce o papel de proteção antioxidativa em detrimento do declínio da atividade da catalase (Sato *et al.*, 2001).

Em sementes de algodão envelhecidas artificialmente, a atividade da APX decresceu progressivamente durante o curso do envelhecimento (Goel *et al.*, 2003). Também em amendoim, o estudo do efeito do envelhecimento acelerado na germinabilidade em sementes de duas cultivares foi relatado. O envelhecimento acelerado foi promovido pela incubação das sementes a 45 °C e 79% de umidade em câmara fechada por 3, 6 e 9 dias. Os resultados indicaram que o envelhecimento acelerado inibiu a germinação e o estabelecimento de

plântulas, ocorrendo um aumento na peroxidação de lipídios e decréscimo na atividade da APX (Sung & Jeng, 1994).

#### **1.14. Pré-tratamento de sementes com antioxidantes e respostas no vigor**

Interessantemente, as plantas possuem sistemas removedores de radicais livres e moléculas antioxidantes como a vitamina E, o  $\beta$ -caroteno e o ácido ascórbico dentre outros que auxiliam no controle da oxidação dos ácidos graxos, ligando-se ao oxigênio ativado adquirido quando as sementes apresentam baixos teores de água. Em função disso, o pré-tratamento de sementes com compostos diversos como ácido ascórbico, hormônios e vitaminas, antes do envelhecimento natural e acelerado, vem sendo testado (Chhetri *et al.* 1993; Powell *et al.* 2000). O tratamento prévio das sementes com aplicação de antioxidantes como o ácido ascórbico (Raghuramulu & Purushotham, 1991; 1992; Chhetri *et al.*, 1993; Basu, 1994; Maity *et al.*, 2000;) aumentou o vigor e prolongou a armazenabilidade das sementes pela “remoção” de radicais livres.

Estudos em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar HS6 e cultivar H1098 (Goel *et al.*, 2003), foram realizados para tentar elucidar o mecanismo de deterioração de sementes. As sementes foram artificialmente envelhecidas a 40°C e 100% de U.R. durante 4 dias. Como resultado, decresceu a germinação nessas cultivares, houve deterioração das membranas por ensaio de condutividade elétrica enquanto ocorria o envelhecimento artificial progressivamente. O decréscimo na germinação mostrou alta correlação com o decréscimo na atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutatona redutase. Os resultados sugeriram que a deterioração de sementes de algodão durante o envelhecimento acelerado apresenta relação com o decréscimo da atividade de várias enzimas “removedoras” de peróxido como também a peroxidação de lipídios. Adicionalmente, foi observado que a atividade de várias enzimas antioxidantes decresceu durante o tratamento de envelhecimento sendo parcialmente restaurada por 12h de hidratação por tratamento com ácido ascórbico comparado com as condições do controle. A presença de antioxidantes como o ácido ascórbico protegeu a peroxidação de lipídios e a formação de radicais livres (McDonald, 1999). Esses resultados suportam claramente a hipótese que a deterioração de sementes ocorre devido a

peroxidação de lipídios de membrana causada pelo desequilíbrio no sistema de remoção de espécies reativas de oxigênio.

### 1.15. O feijão-caupi

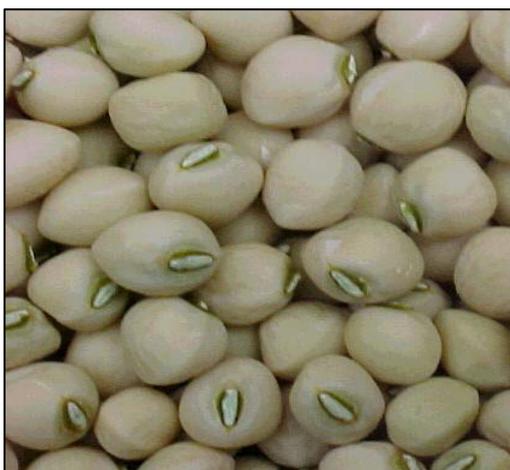
O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cuja origem está ligada ao continente africano, foi introduzido no Brasil, nas regiões tropicais encontrando características edafoclimáticas distintas (quente/úmida na região Norte e quente/seca na região Nordeste) adequadas ao seu desenvolvimento (Araújo *et al.*, 1984). Trata-se de uma espécie de leguminosa amplamente cultivada no nordeste brasileiro por técnicas de cultivo que variam desde as rudimentares até as mais modernas, representando uma das principais fontes de proteínas de origem vegetal para a população nordestina sendo cultivado predominantemente na região semi-árida do Nordeste Brasileiro (Santos *et al.*, 2003). Pelo seu valor nutritivo, o feijão-caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, visando o consumo humano in natura, na forma de conserva ou desidratado. Além disso, o caupi também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo.

No Brasil, o feijão-caupi é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia. Representa 95% a 100% do total das áreas plantadas com feijão-caupi nos Estados do Amazonas, Maranhão, Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte (Maia 1996). Além disso, o feijão-caupi possui ampla variabilidade genética e excelente potencial de produção e adaptação a fatores adversos (Freire-Filho *et al.*, 2003), sendo bem adaptado às condições de temperatura elevada e estresse hídrico e salino, quando comparado, a outras espécies agronomicamente importantes (Ehlers & Hall, 1997).

Segundo Araújo (1988) os programas de melhoramento do caupi, no Brasil, começaram em 1963, por diversas instituições de pesquisa das regiões Norte e Nordeste. Entretanto, apenas em 1975 é que houve um grande esforço na introdução de novos materiais genéticos com a remessa dos Ensaios Internacionais de Rendimento, do International Institute of Tropical Agriculture (IITA), localizado na Nigéria. Também, após, a criação da Empresa Brasileira de

Pesquisa Agropecuária – Embrapa, em 1973 e com a criação do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão – CNPAF, em 1974, houve a estruturação em nível nacional, do programa de pesquisa com o caupi em 1977, envolvendo as instituições de pesquisa que já trabalhavam com a espécie. Assim, em 1978, foi criada o Programa de Melhoramento do Caupi, com a cooperação internacional do IITA. (Freire-Filho *et al.*, 2000).

**Cultivar Pérola**



**Cultivar Pitiúba**



A cultivar Pitiúba tem sua origem na Universidade Federal do Ceará sendo tendo sua procedência da cidade de Pentecoste, no estado do Ceará, sendo referido por João Ribeiro, no ano de 1965. Essa cultivar é uma das que mais se destacou no estado do Ceará (Cardoso, 2000). O feijão Pitiúba apresenta flor de cor Violeta, porte ramador, ciclo de 52 dias, vagem amarela com comprimento médio de 22,7 cm, número 19 de sementes/vagem, cor do grão marrom, sementes de 15,9 mm com forma semente reniforme.

A cultivar Pérola (origem não informada), é procedente de Recife, estado de Pernambuco, e referida pela Dra. Sarah Krutman, Eng<sup>a</sup>. Agrônoma do IPANE (Instituto de Pesquisa do Nordeste), datada de janeiro de 1970. O feijão Pérola apresenta flor branca, porte ramador, ciclo de 45 dias, vagem amarela, comprimento da vagem de 16,7 cm, número 16 de sementes/vagem, cor do grão verde, tamanho da semente, 22 mm(?); com forma globosa.

## **2. HIPÓTESE**

O envelhecimento artificial de sementes induzido pela combinação de umidade elevada e temperatura alta é determinado, pelo menos em parte, devido ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição da atividade e expressão de algumas enzimas antioxidantes (especialmente catalase e peroxidase de ascobato).

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Estabelecer relações entre a resistência ao envelhecimento acelerado e a expressão e atividade de catalase e peroxidase de ascobato, assim como com os danos oxidativos gerados pela produção de espécies reativas de oxigênio.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar danos fisiológicos (perda de germinação, diminuição no vigor e perda de viabilidade) em sementes de cultivares contrastantes de feijão caupi envelhecidas artificialmente;
- Avaliar danos oxidativos em lipídeos e proteínas de tecidos de sementes envelhecidas artificialmente;
- Determinar alterações no perfil protéico através de eletroforese em SDS-PAGE;
- Avaliar as atividades totais e zimograma de catalase, peroxidase de ascobato e de superóxido dismutase em função do envelhecimento acelerado;

- Caracterizar por eletroforese de imunoensaio (“Westen blot”), as concentrações de catalase em sementes envelhecidas artificialmente;
- Caracterizar os níveis de transcritos de catalase e peroxidase de ascobato através de RT-PCR em sementes envelhecidas artificialmente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, E.J.; LOVATO, A. Effect of seed storage temperature and relative humidity on maize (*Zea mays* L.) seed viability and vigour. **Seed Science Technology**, v.27, p.101–114, 1999.

ANURADHA G.; KUMAR, A. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum*L.) seeds. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 1093–1100, 2003.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase – scavenging enzyme in plants. **Physiology Plantarum**, v.85, p. 235-241, 1992.

BAILLY,C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU,F.; COĂME,D. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p.646±652, 1988.

BAILLY,C.; AUDIGIER, C.; LADONNE,F.; WAGNER, M.H; COSTE, F.; CORBINEAU, F.; COĂME, D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, v. 357, p.701±708, 2001.

BAILLY,C.; BENAMAR,A.; CORBINEAU,F.; COĂME,D. 200. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, v.10, p. 35±42, 2000.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed science and technology**, v. 19, n. 2, p. 279-286, 1991.

BASU, R.N. An appraisal of research on wet and dry physiological seed treatments and their applicability with special reference to tropical and sub-tropical countries. **Seed Science and Technology**, v. 22, p. 107–126, 1994.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. Free Radical Theory of Aging matures. **The Physiological Reviews**, v.78,p.,n.2,1998.

BEWLEY, J.D.; BLACK,M.Physiology of development and germination. **Seeds**,v.,p.445,1994.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A.G. Germinação: do básico ao aplicado. **Artmed.**, v., p., 2004.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 43, p. 83–116, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**, v., p.365, 1992.

BULTEAU A.L., LUKE,I.; SZWEDA, B.; FRIGUET,B.A. Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aginganne. **Experimental gerontology**,v.41,p.653–657, 2006.

CARDOSO, B. B. **Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculado com *Bradyrhizobium* sp.** 2000. 98 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

CHHETRI, D. R.; RAI, A. S.; BHATTACHARJEE, A. Chemical manipulation of seed longevity of four crop species in an unfavourable storage environment. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, n. 2, p. 269-300,1993.

COPELAND, L.O.; MCDONALD, M.B. **Seed Science and Technology**. New York: Chapman & Hall, v., 410 p., 1995.

CUNHA, N. T. S. Viveiros Florestais. Manual do Técnico Florestal. **Apostilas do Colégio Florestal de Irati**. Campo Largo, Ingra S.A., 4 v4.,p., 1986.

DELOUCHE, J.C., BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology** v.1, p. 427±452, 1973.

DHAKAL, M.R.; PANDEY, A.K. Storage potential of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seeds under ambient conditions. **Seed Science and Technology**, v. 29, p.205–213, 2001.

DROILLARD, M. J., PAULIN, A. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and in peroxisomes isolated from petals of carnation during senescence. **Plant Physiology**, v.94, p. 1187-1192, 1990.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research**. v.53, p.187-204, 1997.

FERGUSON, J. An introduction to seed vigour testing. Seed Vigour Testing Seminar. **International Seed Testing Association**,v., p. 1-9, 1995.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas ao sistema de defesa e estresse oxidativo. **Artigo de revisão**, v., p., 2003.

FLORIANO, E. P. Armazenamento de sementes florestais. **Caderno Didático nº 1**, v., p.10, 2004.

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

FREIRE-FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAUJO, J. P. P de; WATT, E. E. (eds). O caupi no Brasil, p.27-46. Brasília: IITA/EMBRAPA, p. 722, 1988.

FRIDOVICH. Superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochemistry** v. 44, p. 147–159, 1977.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, T.L. M.A.; THOMAS, C.R. MCCLUNG. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, **Plant Physiol** v.112, p327–336, 1996.

GOEL, A; AJAY GOEL, K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum*L.) seeds. **J Plant Physiol**, v.160, p. 1093–1100, 2003.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J.G. Characterization of the Catalase antioxidant defense gene *Cat1* of maize, and its developmentally regulated expression in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v.3, p. 537-536, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**, v., p. 543, 1989.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, 2000.

HAMPTON, J. G.; COOLBEAR, P. Potential versus actual seed performance: can vigour testing provide an answer? **Seed Science and Technology**, v.18, p. 215-228, 1990.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D.M. Controlled deterioration test. **Handbook of vigour test methods**, v., p.70 – 78, 1995.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves, **Plant Physiol**, v.84, p. 450-455, 1987.

HEINZE, M. GERHARDT, B., PLANT CATALASES, IN: A. BAKER, I.A. GRAHAM, (Eds.), **Plant Peroxisomes**, v., p. 103–140, 2002.

HIBBARD, R.P.; MILLER, E.V. Biochemical studies on seed viability: Measurements of conductance and reduction. **Plant Physiology**, v. 3, p. 335-352, 1928.

IWAMOTO, M.; MAEKAWA, M.; SAITO, H.; HIGO, H.; HIGO, K. Evolutionary relationship of plant catalase genes inferred from exon-intron structures: isozyme divergence after the separation of monocots and dicots, **Theor. Appl. Genet**, v.97, p.9–19, 1998.

KHANNA- CHOPRA, R., SABARINATH, S. Heat-stable chloroplastic Cu /Zn superoxide dismutase in *Chenopodium murale*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 1187–1192, 2004.

KRANNER, I.; BIRTIĆ, S. ANDERSON, K.M. HUGH; PRITCHARD, W. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? **Free radical biology & medicine**, v., p., 2006.

KRZYŻANOWSKI, F.C.H.; COSTA, J.D.; Scotti, C.A.; Da Silveira, J.F. O envelhecimento precoce na avaliação de lotes de sementes de feijoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.4, n.1, p.45 -58, 1982.

KRZYŻANOWSKI, F.C.H.; Vieira, R.D. Deterioração controlada. Vigor de sementes: conceitos e testes. **ABRATES**, v., p. 218, 1999.

KUNCE, C.M. TRELEASE, R.N. Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds, **Plant Physiology**, v. 81, p.1134–1139, 1986.

LIN, S.S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**, v.2, n.2, p.1-6, 1990.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science Technology**, v. 27, p. 177–237, 1999.

MACEDO, E.C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influência da embalagem do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Revista brasileira de sementes**, v. 21, n.1, p.67-65, 1999.

MAITY, S.; BANERJEE, G.; ROY, M.; PAL, C.; PAL, B.; CHAKRABARTI, D.; BHATTACHARJEE, A. Chemical induced prolongation of seed viability and stress tolerance capacity of mung bean seedlings. **Seed Sci Technology**, v. 28, p. 155–162, 2000.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; Silva, W.R. Avaliação da qualidade das sementes. **FEALQ**, v., p.230, 1987.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R.; NOVEMBRE, A.D.C. Estudo comparativo de métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa agropecuária**, 1990.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Vieira, R.D. & Carvalho, N.M. Testes de vigor em sementes. **FUNEP**, v., p.164, 1994.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França Neto, J.B. Vigor de sementes: conceitos e testes. **ABRATES**, v., p.1-24, 1999.

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

MULLEN, R. T.; GIFFORD, D.J. Effect of the embryo axis on catalase in the endosperm of germinating castor bean seeds. **Plant Science**, v. 107, p. 177-187, 1995.

MITTOVA, V., TAL, M. VOLOKITA, M. OUY, A. M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p. 845-856, 2003.

NI, W.; TRELEASE, R.N. Post-transcriptional regulation of catalase isozyme expression in cotton seeds. **Plant Cell**, v. 3, p. 737-744, 1991.

NYSTRO, T.M.N. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The embo journal**, v. 24, p.1311–1317, 2005.

ORENDI, G.; ZIMMERMANN, P.; BAAR, C.; ZENTGRAF, U. Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. **Plant Science**, v. 161, p. 301–314, 2001.

PETRIV, O. I.; RACHUNBINSKI, R.A. Lack of Peroxisomal Catalase Causes a Progeric Phenotype in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.19996-20001, 2004.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. **ABEAS**, v., p. 289, 1985.

POWELL, A. A.; YULE, L.J.; JING, H.C.; GROOT, S.P.C.; BINO, R.J.; PRITCHARD, H.W. The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. **Journal Experimental Botany**, v. 51, p. 2031–2043, 2000.

POWELL, A.A.; MATTHEWS, S. Evaluation of controlled deterioration: a new vigour test for small seeded vegetables. **Seed Science & Technology**, v.9, p.633-640, 2000.

PRIESTLEY, D.A. Seed aging. Implications of seed storage and persistence in the soil. Ithaca: **Cornell University Press**, v., p., 1986.

PUKACKA, S. Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural aging of seeds of *Acer platanoides*. **Physiology Plant**, v. 82, p.306-310, 1991.

RAGHURAMULU, Y.; PURUSHOTHAM, K. Effect of pre-storage and mid-storage treatments on the germination of coffee seeds. **Journal of Coffee Research**, v. 21, n. 1, p. 42-51, 1991.

RHOADS, D.M. CHALIVENDRA, I.U.; SUBBAIAH, C.; SIEDOW, J.N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution To oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant physiology**, v. 141, p. 357–366, 2006.

ROBERTS, E. H. Predicting the viability of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499–514, 1973.

RODO, A.B.; PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agrícola**, v.57, n.2, p.289-292, 2000.

RONSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G.R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, p.563-568. 2006.

ROSSETTO, C.A.V.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre os métodos de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Scientia Agrícola**, v.52, n.1, p.123 - 131, 1995.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. fisiologia da deterioração em sementes de soja (*glycine max* (L.) Merril) durante o armazenamento. **Revista científica rural**, v.3, n. 2, p.106-118, 1998.

SALINAS, A. R. YOLDJIAN, A. M. ROQUE; CRAVIOTTO, M Y BISARO, V. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 36, p. 371-379, 2001.

SANTOS, A.P., Embrapa Meio-Norte. **Sistemas de Produção**, 2ISSN, 1678-8818. Versão Eletrônica, 2003.

SATO, Y., MURAKAMI, T. Heat -shock mediated APX gene expression and protection against chilling injury rice seedlings. **J. Exp Botany**, v. 151, p.52145, 2001.

SCANDALIOS, J.G.; GUAN, L. Characterization of the catalase antioxidant defense gene *Cat1* of maize, and its developmentally regulated expression in transgenic tobacco, **Plant J**, v. 3, p. 527–536, 1992.

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

SENARATNA, T.; GUSSE, J.F.; MC KERSIE, B.D. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean axes. **Physiology Plant**, v.73, p. 85-91, 1988.

SILVEIRA, T. L. D. Regras de Armazenamento de Semente. **Núcleo Sementes**. Departamento de Fitotecnologia. Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria, 1999.

SUBBA RAO, L.V.;KUMAR, S.; VANISREE, G. Genetic variability for seedling characteristics among rice (*Oryza sativa* L.) cultivars.**Seed Research**, v.24, p.124–128,1996.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 51-55, 1994.

TEKRONY, D. M. Accelerated ageing: Congress of the International Seed Testing Association, v. 24, 1995. Seed vigour testing: contributions to a seminar. **International Seed Testing Association**, v., p.816 -822,1995.

TOMMASI, F.; PACIOLLAA, C.; DE PINTOA,M.C.; DE GARAA, L. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in ginkgo biloba l. **Seeds Plant Physiology and Biochemistry** ,v.44,p.359–368, 2006.

VIEIRA, E.H.N.; YOKOYAMA, M. Colheita, processamento e armazenamento. In: Vieira, E.H.N.; Rava, C.A. Sementes de feijão - produção e tecnologia. Santo Antonio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, p. 233-248, 2000.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. Testes de vigor em sementes. **FUNEP**, v., p. 164,1994.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Res**; v.8, p. 223-44, 1998.

WILLIAMS, R.D. Moisture stress and hydration-dehydration effects on hemp Sesbania (*Sesbania exaltata*) seed germination. **Weed Science**, Lawrence, v.28, n.2, p.487-492, 1980.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.;LANGEBARTELS, C. VAN MONTAGU,;M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. **EMBOJ**, v.16, p. 4806–4816, 1997.

WILSON, D.O.; MCDONALD, M.B. The lipid peroxidation model of seed ageing. **Seed science and technology**, v. 14, p. 269-300,1986.

YU,B.P.; CHUNG,H.Y. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging mechanisms of ageing and development,v.127,p. 436–443, 2006.

## **CAPÍTULO 2**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE DUAS  
CULTIVARES DE FEIJÃO CAUPI ENVELHECIDAS ARTIFICIALMENTE**

## 2.1. INTRODUÇÃO

Sementes deterioram durante períodos prolongados de armazenamento, mas, a velocidade de deterioração varia bastante entre as espécies (Priestley 1986, Roberts 1986). A exata causa da perda da viabilidade de sementes ainda não foi bem definida. Vários estudos têm elegido danos de membrana como o fator principal da causa da deterioração. O grau de envelhecimento acelerado em lotes de sementes sob exposição à alta temperatura e alta umidade relativa tem sido reconhecido com um bom prognóstico de armazenamento de sementes (Sung & Jeng, 1994).

O armazenamento de sementes em condições ambientais, especialmente em regiões tropicais úmidas consiste num problema. Geralmente, a viabilidade da semente é perdida durante o armazenamento por longos períodos. Dessa forma, uma combinação de umidade alta e temperatura alta favorecem a aceleração da deterioração da semente (Willians, 1980; Hampton & Tekrony, 1995; Walters, 1998; Abba & Lovato, 1999). Essas condições ambientais adversas durante o armazenamento, resultam no envelhecimento de sementes, podendo ocorrer redução da viabilidade até a completa perda do poder germinativo, produção de plântulas de menor tamanho e plântulas anormais (Bewley & Black, 1994; Pádua, 1998).

A longevidade da semente armazenada é extremamente dependente do conteúdo de água e da temperatura. Sementes ortodoxas são tolerantes a dessecação e podem ser armazenadas em estado seco. Sementes recalcitrantes são sensíveis á dessecação. O processo de deterioração de sementes ortodoxas durante o armazenamento depende do estado e das propriedades da água. As reações degradativas podem ser controladas pelo potencial químico da água e a avaliação da água por reações químicas. As sementes recalcitrantes são caracterizadas pela perda da viabilidade durante a dessecação. Elas não podem ser armazenadas por longos períodos, pois ocorre sua maturação e perda da casca (Pukaka *et al.*, 2003).

Com a evolução da tecnologia verificada na agricultura nas últimas décadas, o uso de sementes de alta qualidade passou a ser fundamental. Desta forma, o teste de vigor, capaz de avaliar o grau de deterioração das sementes, tornou-se um componente de major importância na avaliação da qualidade fisiológica,

contribuindo na solução de problemas enfrentados pelas empresas produtoras deste importante órgão de propagação (Dutra *et al.*, 2005).

A avaliação da qualidade fisiológica da semente tem sido fundamentalmente baseada no teste de germinação. No entanto, esse teste não detecta diferenças mais sutis em termos de deterioração, como também não avalia o potencial de armazenamento e o desempenho das sementes em condições gerais de campo. Dessa forma, o teste de germinação não apresenta sensibilidade suficiente para avaliar o estado fisiológico das sementes. No entanto, esse teste fornece dados que podem ser utilizados, juntamente com outras informações, para a comparação entre lotes de sementes (Marcos Filho *et al.*, 1987).

Os testes de vigor (International Seed Testing Association-Ista, 1981), foram desenvolvidos durante a busca de métodos com sensibilidade suficiente para avaliar com maior precisão o nível de deterioração das sementes e tem se constituído em excelentes instrumentos auxiliares nos processos de decisão na produção, armazenamento e comercialização de sementes. De acordo com Marcos Filho (1994), os testes de envelhecimento acelerado, de frio, de condutividade elétrica entre outros, podem ser considerados os testes de vigor mais indicados para a composição de um programa de controle de qualidade. O teste de envelhecimento acelerado desenvolvido por Delouche & Baskin (1973), tem sido bastante estudado e recomendado para diferentes espécies e vem sendo incluído em programas de controle de qualidade de empresas produtoras de sementes. O teste de envelhecimento acelerado tem se mostrado eficiente na seleção de lotes para a semeadura com base no potencial de desempenho da semente em condições de campo e na avaliação da capacidade potencial de armazenamento (Popinigis, 1985). Este teste tem como base o princípio de que lotes de alto vigor manterão sua viabilidade quando submetidos, durante curtos períodos de tempo, às condições severas de temperatura e umidade relativa do ar, enquanto que os de baixo vigor terão sua viabilidade reduzida, possibilitando a separação de lotes de sementes em diferentes níveis de vigor (Tekrony, 1995; Rodo *et al.*, 2000).

Estudos revelaram que em função da desorganização das membranas celulares, as sementes tendem a reduzir o vigor, o que pode ser verificado pelo aumento da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição das sementes (Marcos Filho *et al.*, 1994; Salinas *et al.*, 2001). Para avaliar o nível de

integridade das membranas celulares (Ferguson, 1995), a condutividade elétrica (CE) é considerada um ótimo teste de vigor. Esse teste permite medir a lixiviação de eletrólitos de tecidos vegetais, sendo utilizado para sementes e algumas espécies cultivadas (Hibbard & Miller, 1928). O teste de condutividade elétrica baseia-se no princípio de que com o processo de deterioração ocorre a lixiviação dos constituintes celulares das sementes embebidas em água devido à perda da integridade dos sistemas celulares. A célula fica danificada, com membranas mal estruturadas, havendo a perda de constituintes celulares, com menor capacidade de reparação aos danos causados a sementes. Dessa forma, baixa condutividade significa alta qualidade da semente e alta condutividade, ou seja, maior saída de lixiviados da semente, sugere o menor vigor desta (Vieira & Krzyzanowski, 1999; Dutra *et al.*, 2006).

Perdas na germinação e no vigor, em sementes de feijão soja e amendoim, envelhecidas artificialmente, correlacionaram-se com o aumento da lixiviação eletrolítica. Este aumento da lixiviação de solutos nas sementes envelhecidas, tem sido relatado como decorrente da deterioração das membranas celulares. Estudos com ervilha e feijão, revelaram que a concentração de K<sup>+</sup> foi alterada com a duração dos períodos de embebição e de envelhecimento das sementes. Quando o período de envelhecimento aumentou, a habilidade das membranas de restabelecerem a semipermeabilidade ficou reduzida, havendo maiores perdas de K<sup>+</sup> durante os estágios iniciais de embebição (Silva & Silva, 2000). A condutividade elétrica como teste de vigor é recomendado para sementes de ervilha e sugerido para soja (Association of Official Seed Analysts, 2002). Marcos Filho *et al.* (1990) e Dias & Marcos Filho (1995) obtiveram distinção entre lotes de sementes de soja, usando o teste de condutividade elétrica. Dias *et al.* (1998) concluíram que o teste de condutividade elétrica foi suficiente para a avaliação do vigor das sementes de feijão-de-vagem e quiabo. Em sementes de algodão, houve um aumento progressivo da condutividade elétrica durante o tratamento de envelhecimento artificial e estes resultados foram correlacionados com o decréscimo na taxa de germinabilidade (Goel *et al.*, 2002). Tem sido observada uma relação entre os resultados do teste de condutividade elétrica e os de emergência de plântulas em campo para sementes de soja (Vieira *et al.*, 1999). No entanto, pouco se tem estudado com relação a sementes de feijão (Dutra *et al.*, 2006).

Dessa forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de colaborar com a elucidação do processo de deterioração em sementes de feijão caupi pela avaliação de respostas aos testes de vigor, testando a taxa de germinação, a condutividade elétrica e avaliando as alterações morfológicas em plântulas obtidas de sementes envelhecidas artificialmente.

## **2.2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Material Vegetal**

Nesse trabalho foram utilizadas sementes de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.),Walp.],cultivar Pitiúba e cultivar Pérola, disponíveis no Banco de Germoplasma do Departamento de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

### **2.2.2. Preparação das sementes para testes e análises**

Para a realização de testes e análises, amostras de sementes do feijão caupi, cultivar Pitiúba e cultivar Pérola, armazenadas em câmara de refrigeração (10°C; 45% U.R.) foram selecionadas e desinfetadas como descrito abaixo:

**2.2.2.1. Seleção das sementes:** Para a seleção de sementes de feijão caupi os seguintes critérios foram estabelecidos – tamanho, aparência e sanidade das sementes.

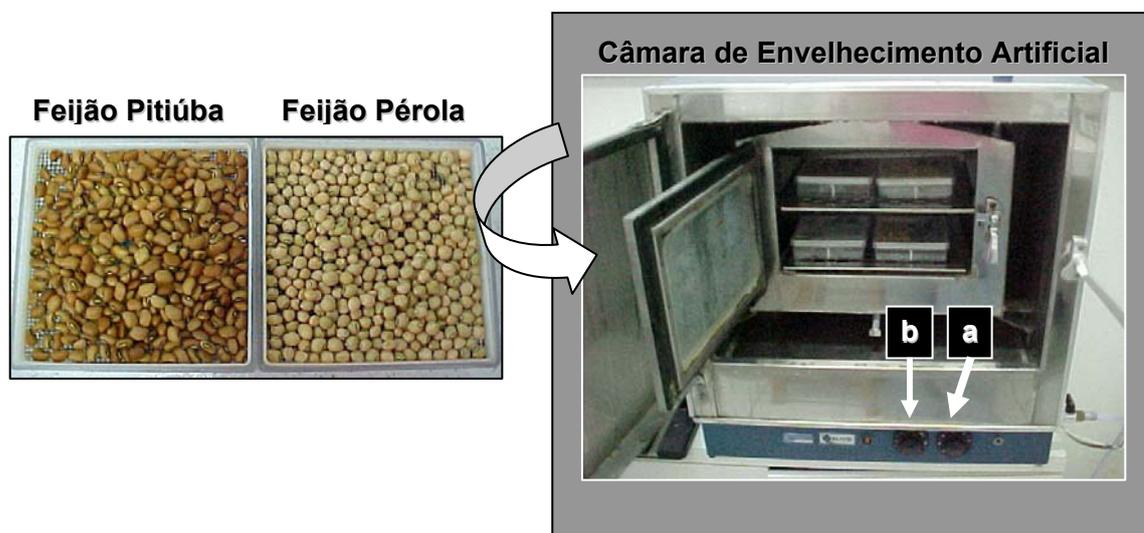
#### **2.2.2.2. Desinfecção das sementes:**

A desinfecção foi feita pela imersão das sementes em solução de etanol 70% (v/v) com agitação por 30s, seguidas de três lavagens rápidas em água destilada estéril. Logo depois, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 0,2% (v/v), por 10 minutos (cv. Pitiúba) e por 1-2 minutos (cv. Pérola), sendo posteriormente lavadas rapidamente três vezes em água destilada estéril.

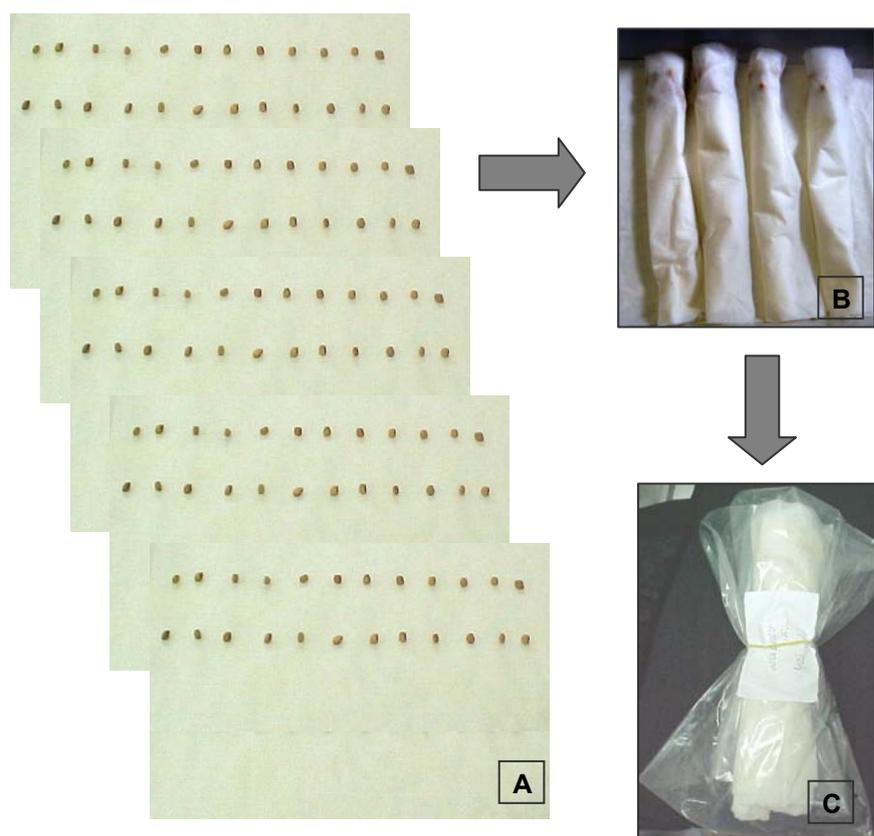
### 2.2.3. Envelhecimento Artificial

Amostras de sementes de feijão caupi (cv. Pérola e v.Pitiúba) previamente selecionadas, foram distribuídas e incubadas em caixas “gerbox” em câmara de envelhecimento acelerado por 72 horas (figura 1).O grupo controle (0h) trata-se de sementes de ambas as cultivares que não foram incubadas em câmara de envelhecimento artificial.

A câmara de envelhecimento artificial utilizada em nosso experimento (ELO'S; 220V) é composta de duas divisões: uma interna superior e outra externa inferior, as quais foram preenchidas respectivamente com 3 L e 7 L de água destilada. Uma combinação de 45 °C com 99 % de U.R., no escuro (regulada 24 h antes do início do experimento), foi preestabelecida na câmara para o processo de envelhecimento artificial (Delouche & Baskin, 1973). Para a realização dos testes de vigor, foram feitas coletas de sementes em 0 h, 24 h, 48 h e 72 h de envelhecimento. Uma parcela dessas sementes foi imediatamente utilizada em testes e análises e uma outra parcela foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente mantida a -83 °C. (Desenho experimental: 1 controle x 3 repetições x 1 tempo; 1 tratamento x 3 repetições x 3 tempos).



**Figura 2.1.** Teste de envelhecimento artificial. Transferência de sementes de feijão caupi (Pitiúba e Pérola) em caixas gerbox para a câmara de envelhecimento artificial (a- 45 °C; b - 99 % U.R.)



**Figura 2.2.** Teste de germinação. **(A)** -Distribuição das sementes do feijão-caupi (Pérola e Pitiúba) em folhas de papel *germitest*; **(B e C)** - Rolos com sementes ensacadas para o processo de germinação sob condições controladas.

#### 2.2.4. Teste de Germinação

Uma quantidade de 100 sementes do controle (sementes não incubadas em câmara de envelhecimento) e de 100 sementes obtidas de cada um dos tempos de envelhecimento artificial (24 h, 48 h e 72 h), foi posta para germinar em papel *germitest*, em laboratório, a 25 °C, 67 % U.R., no escuro, por três dias (figura 2).

A partir de experimentos preliminares (Maia, 2004), para cada 12 folhas de papel *germitest* para a germinação das sementes da cv. Pitiúba foram adicionados 200 mL de água destilada e para cada 12 folhas de papel *germitest* para a germinação de sementes da cv. Pérola foram adicionados 150 mL de água destilada. A distribuição da água nas folhas foi de forma homogênea. As sementes foram dispostas em fileiras, sendo mantida uma distância de,

aproximadamente, 1,5 cm entre uma semente e outra. Cada repetição foi organizada em rolos, cada um rolo com 20 sementes (2 fileiras de 10 sementes dispostas paralelamente) totalizando 5 rolos, ou seja, 100 sementes. Após três dias, foi feita a contagem das sementes germinadas (ISTA, 1985). Após a contagem e registro, as sementes germinadas foram colocadas imediatamente de volta nos rolos de papel para produzirem plântulas de 5 dias em casa de vegetação ( $31,1 \pm 4^\circ\text{C}$  e  $66,8 \pm 12,9\%$  U.R.); fotoperíodo médio de 12 h de insolação e quantidade máxima de radiação fotossintética ativa de  $1000 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$  (meio dia). Mensuração do tamanho de raízes e parte aérea e, análise de alterações morfológicas em plântulas provenientes das sementes envelhecidas artificialmente foi realizada.

#### **2.2.5. Determinação do Teor de água (base úmida)**

A determinação do teor de água foi realizada em estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}/24 \text{ h}$  (Brasil, 1992), utilizando-se quatro amostras de 50 sementes para cada cultivar (Dutra e Teófilo, 2004).

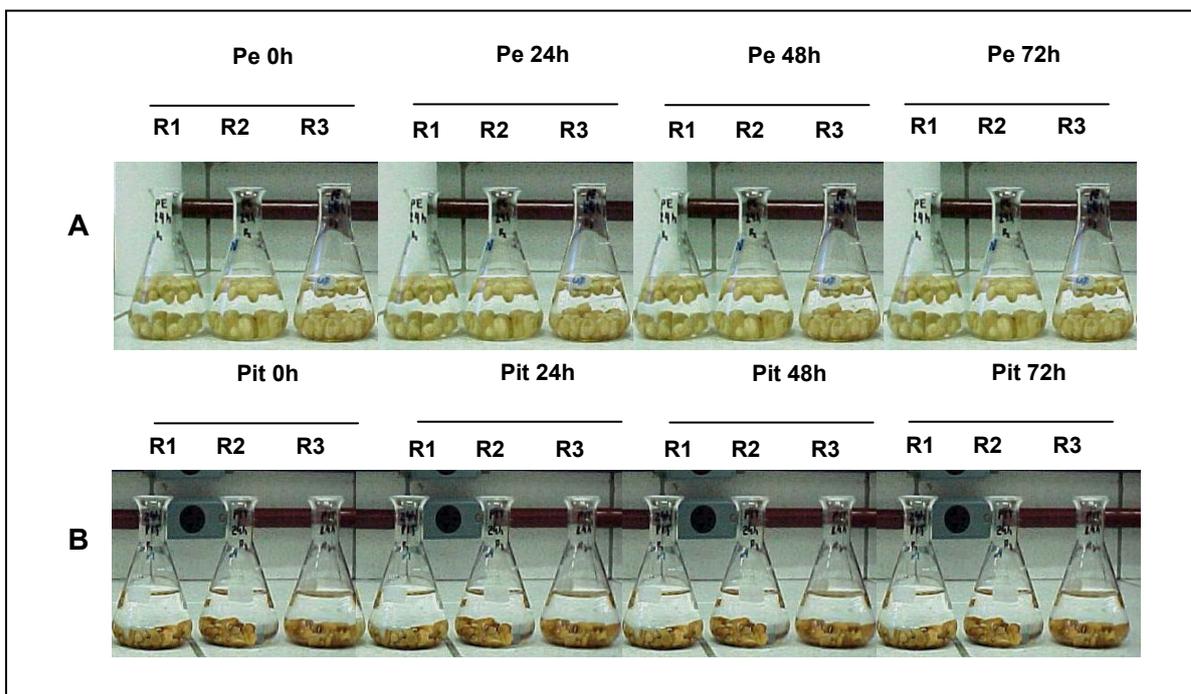
A umidade das sementes foi determinada segundo Slavik (1979), com a seguinte equação:

$$\text{UMIDADE} = \frac{\text{MF} - \text{MS}}{\text{MF}} \times 100 \text{ (Kg H}_2\text{O/ 100 Kg de MF)}$$

#### **2.2.6. Teste de condutividade elétrica**

Para o teste de condutividade elétrica (CE), três repetições de amostras de 50 sementes do controle (0 h) e três repetições de cinquenta sementes envelhecidas artificialmente por 24 h, 48 h e 72 h, de cada cultivar de feijão-caupi foram pesados e registrados. Essas repetições de amostras de 50 sementes foram colocadas em 24 recipientes de vidro cada um deles com 75 mL de água destilada, durante 24 h, a  $25^\circ\text{C}$  (figura 3). Após as 24 h, foram realizadas em um condutímetro DIGIMED CD 21, leituras da condutividade elétrica das soluções. O resultado da leitura foi dividido pela massa das amostras e a condutividade foi

expressa em  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ . Uma média foi estabelecida para as repetições (Vieira, 1994; Hepburn, *et al.*, 1984; Hampton, 1995).



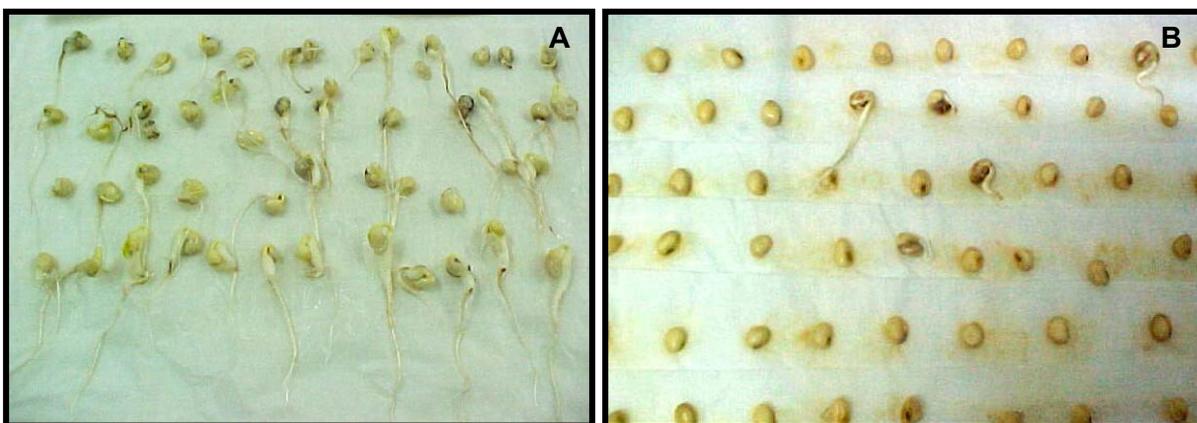
**Figura 2.3.** Teste de condutividade elétrica (CE) em sementes de feijão-caupi envelhecidas artificialmente por 72 h. **A** – Repetição de amostras de 50 sementes (R1,R2 e R3) para o teste de CE em sementes da cv. Pérola (Pe); **B**- Repetição de amostras de 50 sementes (R1,R2 e R3) para o teste de CE em sementes da cv. Pitiúba (Pit).

### 2.3. RESULTADOS

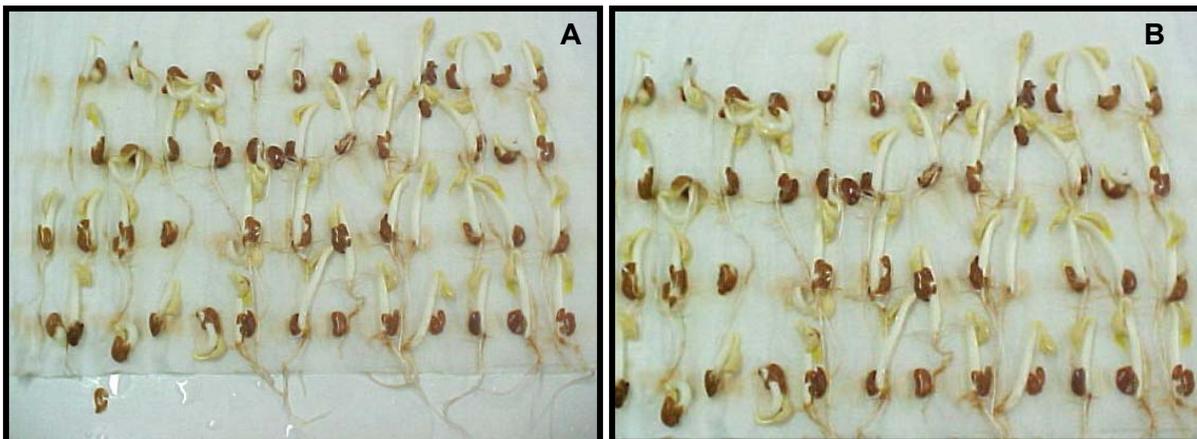
Em nossos estudos, a taxa de germinação das sementes de feijão caupi, cv. Pérola decresceu progressivamente com o envelhecimento artificial enquanto que em sementes da cv. Pitiúba, não ocorreu alterações nesse parâmetro fisiológico (Figuras 2.4, 2.5 e 2.6).

A condutividade elétrica (CE) de sementes lixiviadas da cv. Pérola aumentou progressivamente com o tratamento de envelhecimento (Figura 2.6). Em sementes da cv. Pitiúba, entretanto, os valores de condutividade elétrica de lixiviados não foram expressivos.

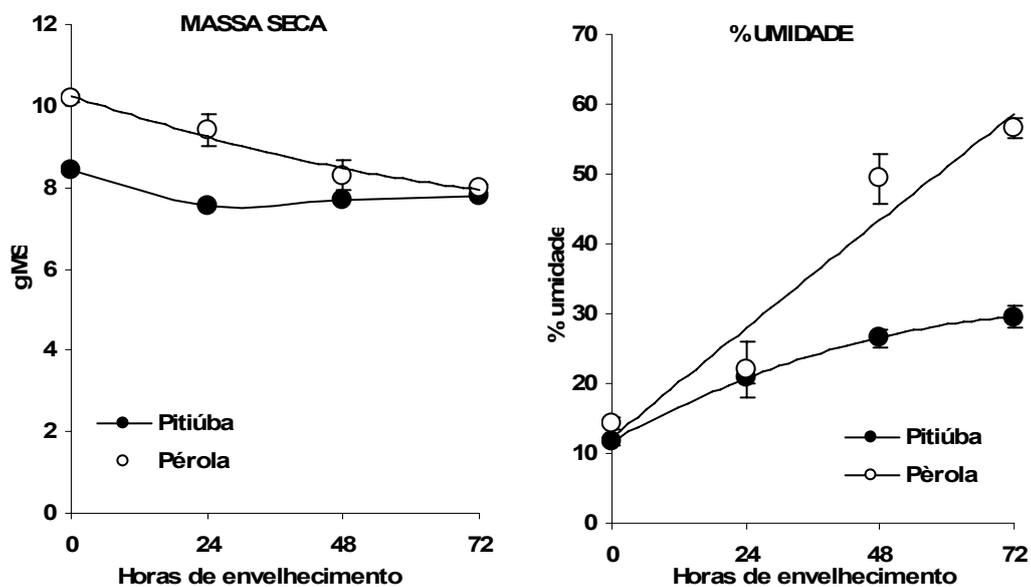
O grau de umidade da semente, que é influenciado pelo estresse decorrente da alta umidade relativa e temperatura elevada, foi crescente em sementes da cv. Pérola ao longo do tratamento de envelhecimento artificial (Figura 2.7). Porém, em sementes da cv. Pitiúba houve apenas um discreto aumento no percentual de umidade das sementes (figuras 2.6 e 2.7).



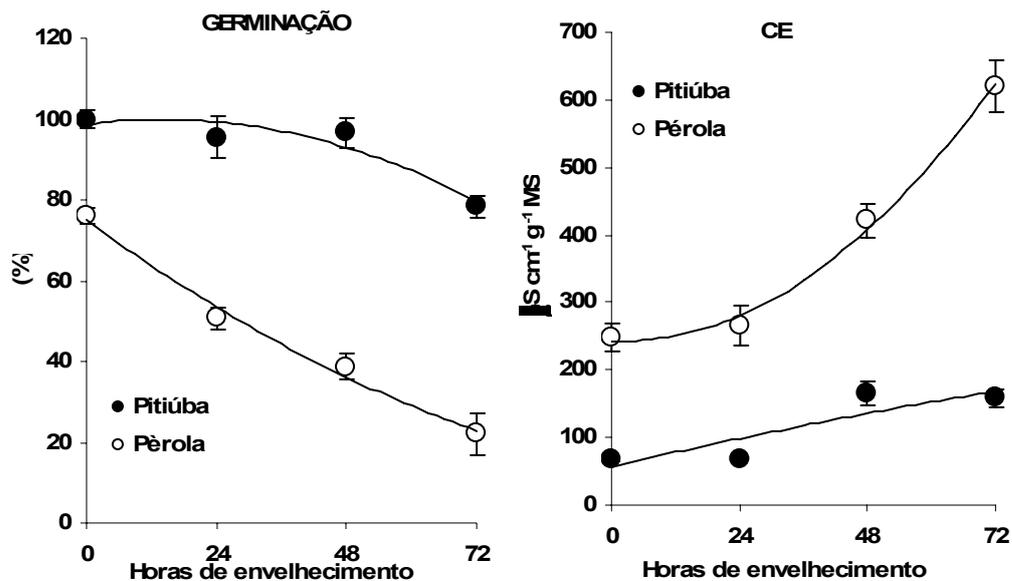
**Figura 2.4.** Teste de germinação em sementes de feijão-caupi. Teste de germinação em sementes de Pérola: (A) controle; (B) Sementes envelhecidas artificialmente por 72 h.



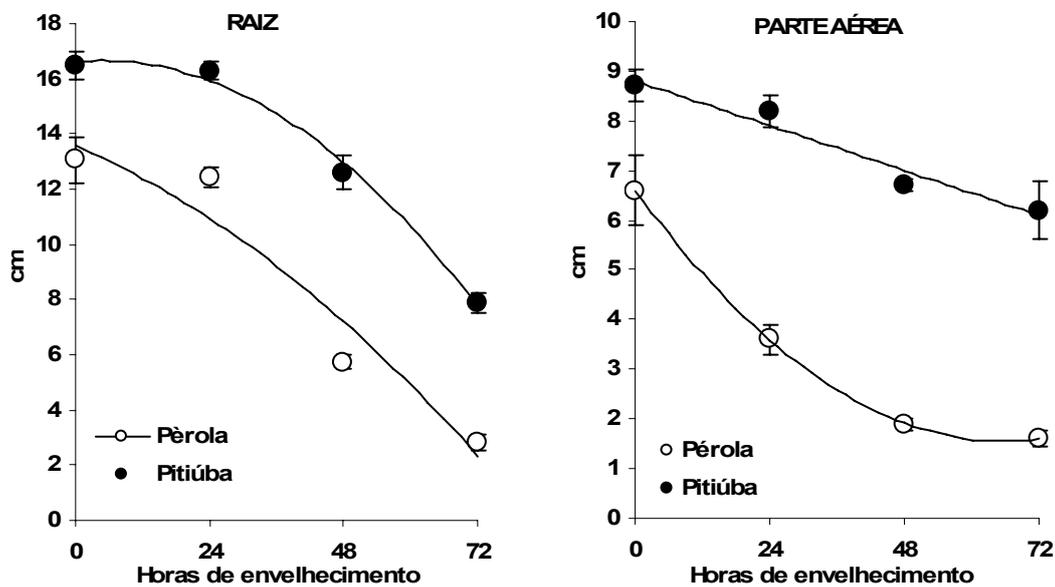
**Figura 2.5.** Teste de germinação em sementes de feijão-caupi. Teste de germinação em sementes de Pitiúba: (A) controle; (B) Sementes envelhecidas artificialmente por 72 h.



**Figura 2.6.** Teor de massa seca e de umidade em sementes de duas cultivares de feijão caupi (Pérola e Pitiúba) envelhecidas artificialmente por 72 h.



**Figura 2.7.** Teste de germinação e teste de condutividade elétrica (CE) em sementes de feijão caupi (Pérola e Pitiúba) envelhecidas artificialmente por 72 h.



**Figura 2.8.** Medidas do comprimento de raízes e de parte aérea de plântulas (3-4 dias) obtidas de sementes de feijão-caupi (Pérola e Pitiúba) envelhecidas artificialmente por 72 h.

Houve uma redução significativa no comprimento de raízes e parte aérea de plântulas originadas de sementes da cv. Pérola envelhecidas artificialmente.

Porém, em plântulas obtidas de sementes da cultivar Pitiúba, esses valores foram significativos somente em relação ao tamanho de raízes, onde foi verificada uma redução em torno de 50% em relação ao controle, em 72 h de tratamento de envelhecimento (figura 2.8).

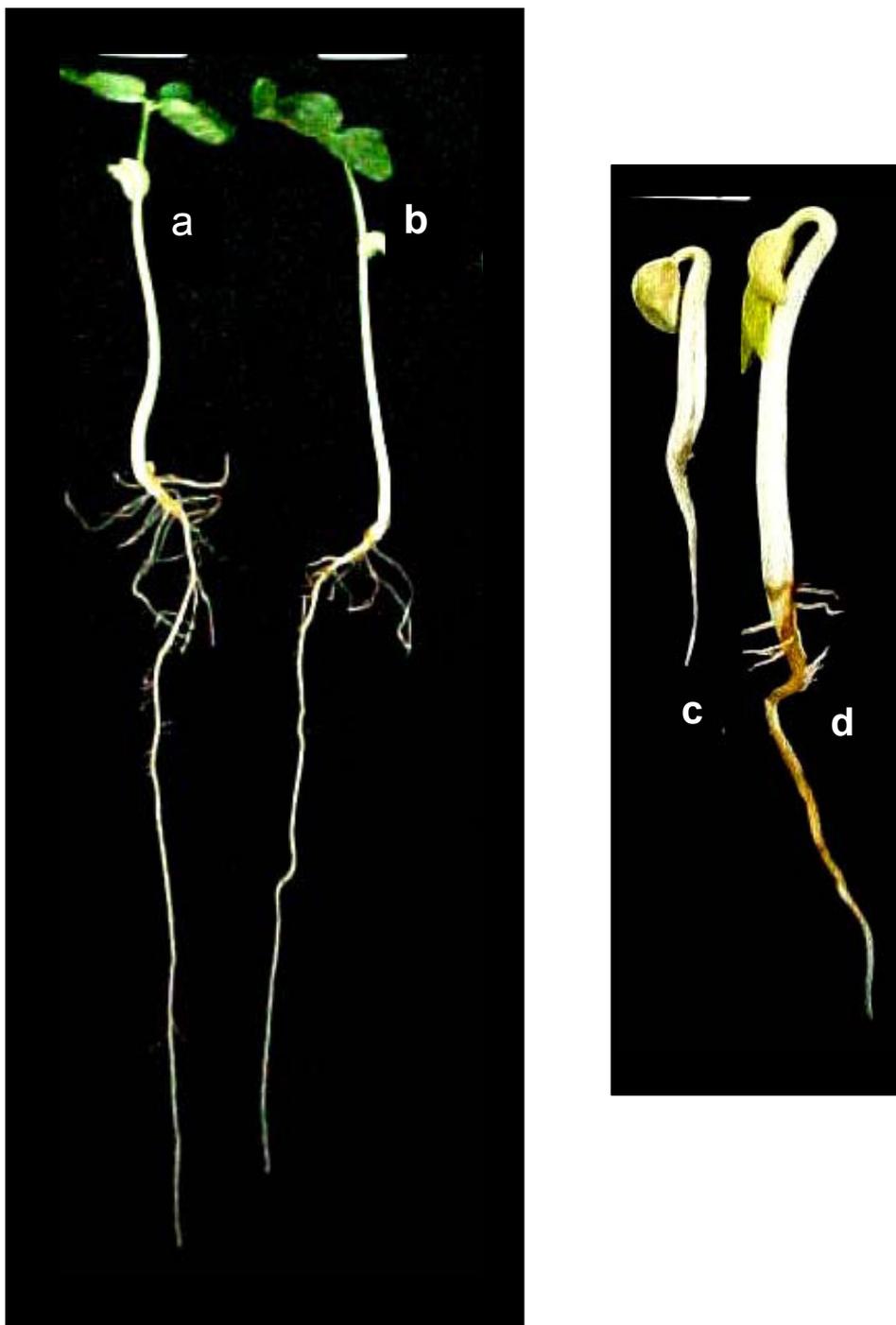
Durante o período do envelhecimento artificial, não houve mudanças significativas na morfologia externa de plântulas originadas de sementes da cv. Pitiúba, ao contrário do que ocorreu com as plântulas obtidas de sementes da cv. Pérola, que deram origem a um número expressivo de plântulas anômalas, a partir de 48 h de exposição ao tratamento de envelhecimento (figuras 2.9, 2.10 e 2.11).



**Figura 2.9.** Sementes de feijão caupi (cv. Pérola e cv. Pitiúba) germinadas após 72h de envelhecimento artificialmente. As sementes germinadas da cv. Pitiúba (**B**), apresentaram aspecto morfológico uniforme ao longo do processo de envelhecimento artificial enquanto as da cv. Pérola (**A**), apresentaram fenótipos anômalos em 48 e 72 h de envelhecimento artificial.



**Figura 2.10.** Aspecto morfológico externo de plântulas de 5 dias obtidas de sementes de feijão caupi, cv. Pérola. **(A)** Controle; **(B)** Plântulas obtidas de sementes envelhecidas artificialmente por 48 h e **(C)** Plântulas obtidas de sementes envelhecidas artificialmente por 72 h. As plântulas obtidas de sementes envelhecidas artificialmente por 48 h e 72 h apresentaram aspecto anômalo.



**Figura 2.11.** Plântulas de 5 dias obtidas de sementes de feijão caupi, cv. Pitiúba. Controle (a); Plântulas obtidas de sementes de Pitiúba envelhecidas artificialmente por 72 h (b). Aspecto morfológico externo comparado de plântulas de 3 dias obtidas de sementes de Pérola (c) e sementes de Pitiúba (d) envelhecidas artificialmente por 72 h.

## 2.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O vigor, a germinação e lixiviados no teste de condutividade elétrica, analisados em sementes de duas cultivares de feijão caupi (cv. Pérola e cv. Pitiúba) apresentaram efeitos significativos e contrastantes quanto ao período de envelhecimento artificial (acelerado). Os dados obtidos em sementes da cv. Pérola se ajustaram em regressões polinomiais, onde, quanto maior for o período de exposição das sementes a um ambiente adverso com temperatura e umidade elevada, maior será o grau de deterioração. O grau de umidade em sementes da cv. Pérola aumentou gradativamente com o aumento da exposição das mesmas ao tratamento de envelhecimento acelerado (Figura 2.6). Provavelmente, essa condição levou a uma crescente deterioração das sementes, causando danos na integridade do sistema de membranas celulares, com conseqüente diminuição da sua seletividade, permitindo assim, uma maior velocidade de entrada de água nas células. A verificação do aumento significativo de lixiviados da solução da condutividade elétrica nessas sementes (Figura 2.7), devido a maior exposição dessas ao envelhecimento artificial, fortalece a hipótese de que o aumento da umidade nas sementes envelhecidas está diretamente relacionado a danos mecânicos nas membranas celulares levando a semente rapidamente a deterioração. Segundo Pádua & Vieira (2001), a exsudação de constituintes celulares está inversamente associada ao vigor, refletindo a perda da integridade das membranas com conseqüente perda de compartimentalização dos constituintes celulares constituindo um excelente substrato para o estabelecimento de microorganismos patogênicos. Em sementes de feijão, Lin (1990) verificou que o decréscimo no vigor e na germinação está diretamente associado ao aumento da condutividade elétrica das sementes sugerindo uma relação íntima entre deterioração das membranas e redução do vigor e germinação. Segundo Salinas *et al.* (1998), alterações na integridade das membranas citoplasmáticas ocorrem com conseqüente aumento na lixiviação de solutos, em sementes de soja armazenadas em condições de alta temperatura e alta umidade relativa. Adicionalmente, houve um decréscimo significativo na taxa de germinação de sementes da cv. Pérola ao longo do período de envelhecimento acelerado (Figuras 2.4 e 2.7), acompanhada da redução do

comprimento de raízes e parte aérea de plântulas originadas dessas sementes em 48 h e perda da viabilidade em 72 h de envelhecimento artificial (figura 2.8).

Em sementes envelhecidas artificialmente da cv. Pitiúba, entretanto, não houve aumento na taxa de umidade (Figura 2.6), não ocorrendo também aumento significativo de lixiviados na solução de condutividade elétrica durante as 72 h de tratamento de envelhecimento (Figura 2.7). Adicionalmente, não ocorreu diminuição na taxa de germinação durante as 72 h de tratamento de envelhecimento (Figuras 2.5 e 2.7). Essas verificações implicam provavelmente na habilidade das sementes da cultivar Pitiúba em reparar melhor o dano causado em membranas celulares, além de provavelmente possuir outros mecanismos de reparo ou suporte ao processo de envelhecimento, impedindo assim a sua deterioração. Além disso, as plântulas obtidas de sementes envelhecidas da cultivar Pitiúba não apresentaram redução significativa de tamanho, ocorrendo, no entanto, uma redução em torno de 50% do comprimento de raízes das obtidas de sementes envelhecidas por 72 h (Figura 2.8).

Quanto ao aspecto morfológico externo, plântulas obtidas de sementes da cv. Pérola envelhecidas artificialmente durante 48 h e 72 h apresentaram morfologia externa anômala, fortalecendo os demais parâmetros que evidenciaram a perda de vigor e viabilidade (Figura 2.9 A; Figuras 2.10 B e 2.10 C; Figura 2.11 c). Ao contrário, as plântulas obtidas de sementes da cv. Pitiúba envelhecidas artificialmente, não mostraram essas alterações (Figura 2.9. B; Figuras 2.11 a, 2.11 b e 2.11 d).

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, E.J.; LOVATO, A. Effect of seed storage temperature and relative humidity on maize (*Zea mays* L.) seed viability and vigour. **Seed Science Technology**, v.27, p.101–114, 1999.

ANURADHA G.; KUMAR, A. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum*L.) seeds. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p. 1093–1100, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. Lincoln, v., p.105, 2002.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Physiology of development and germination. **Seeds**. v., p.445, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para Análise de Sementes**, v., p.365, 1992.

CARDOSO, B. B. **Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculado com *Bradyrhizobium* sp.** 2000. 98 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

DELOUCHE, J.C., BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science Technology**, v.1, p. 427±452, 1973.

DHAKAL, M.R.; PANDEY, A.K. Storage potential of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seeds under ambient conditions. **Seed Science Technology**, v. 29, p.205–213, 2001.

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Testes de vigor baseados na permeabilidade das membranas celulares: I. Condutividade elétrica. **Informativo Abrates**, v.5, n.1, p.26-36, 1995.

DIAS, D. C. F. S.; VIEIRA, A. N.; BHÉRING, M. C. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio para avaliação do vigor de sementes de hortaliças: feijão-de- vagem e quiabo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.20, n.2, p.408-413, 1998.

DUTRA, A.S.; TEÓFILO, E.M. Envelhecimento acelerado como teste de vigor para sementes de feijão caupi. **Artigos acadêmicos**. Universidade Federal do Ceará, Depto. de Fortaleza, CE, Bolsista DCR/CNPq., 2005.

DUTRA, A.S.; MEDEIROS-FILHO, S.; TEÓFILO, E.M. Condutividade elétrica em sementes de feijão caupi. **Revista Ciência agrônômica**, v.37, n.2, p.166-170, 2006.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research**, v.53, p.187-204, 1997.

FERGUSON, J. An introduction to seed vigour testing. Seed Vigour Testing Seminar. **International Seed Testing Association**, v., p. 1-9, 1995.

FREIRE-FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: Araujo, J. P. P de; Watt, E. E. (eds). O caupi no Brasil, p.27-46. Brasília: **IITA/EMBRAPA**, v.,p. 722, 1988.

FREIRE, M.S.; WETZEL, M.G.V.S.; FAIAD, M.G.R.; BARROS FREIRE, A. Germoplasma de caupi: coleção ativa e de base. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**, v., p., 2000.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D.M. Controlled deterioration test. **Handbook of vigour test methods**, v., p.70 – 78, 1995.

HAMPTON, J.G. Conductivity test. Seed Vigour Testing Seminar. **International Seed Testing Association**, v., p.10-28.1995.

HEPBURN, H.A.; POWELL, A.A.; MATTHEWS, S. Problems associated with the routine application of electrical conductivity measurements of individual seeds in the germination testing of pea and soybean. **Seed Science and Technology**, v. 12, p. 403-413, 1984.

HIBBARD, R.P.; MILLER, E.V. Biochemical studies on seed viability :Measurements of conductance and reduction. **Plant Physiology**, v. 3, p. 335-352, 1928.

IRIGOEN, J. J.; EMERICH, D. W.; SANCHEZ-DIAZ, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfafa (*Medicago sativa*) plants. **Physiologia Plantarum**, v. 84, p.55-60, 1992.

ISTA, International rules for seed testing (Rules+Annexes).Seed Science and Technology, control of humidity in biological research. **Ecology**, v.41; v.13, p.299–513 , 1985.

LIN, S.S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor da semente de feijão envelhecida sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, n.2, p.1-6, 1990.

MAIA, F. M. M. Composição e caracterização nutricional de três cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp: EPACE-10, Olho de ovelha e IPA-206. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Ceará, 1996.

MAIA, J. M. **Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L.(Walp.)]**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2004.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. Avaliação da qualidade das sementes. **FEALQ**, v., p.230, 1987.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R.; NOVENBRE, A. C.; CHAMA, H. C. P. C. Estudo comparativo de métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.12, p.1805-1815, 1990.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Vieira, R.D. & Carvalho, N.M. Testes de vigor em sementes. **FUNEP**, v., p.164, 1994.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science Technology**, v. 27, p. 177–237, 1999.

PÁDUA, G.P. Vigor de sementes e seus possíveis efeitos sobre a emergência em campo e a produtividade. **Informativo abrates**, v. 8, p.46-48, 1998.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p.255-262, 2001.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. **ABEAS**, v., p. 289.1985.

PRIESTLEY, D. A. Morphological, structural, and biochemical changes associated with seed aging. In **Seed Aging** (D. A. Priestley, ed.), v., p.,125-195, 1986.

ROBERTS, E.H. Quantifying seed deterioration. – In **Physiology of Seed Deterioration** ( M. B. McDonald, Jr. And C.J. Nelson, eds), v., p. 101-123,1986.

RODO, A.B.; PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agrícola**, v.57, n.2, p.289-292, 2000.

SALINAS, A.R.; SANTOS, O.S.B.; VILLELA, F.A.; SANTOS FILHO, B.G.; SOUZA SOARES, L.A.; OLIVEIRA, M.F. Fisiologia da deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.3, n. 2, p.106-118, 1998.

SANTOS, R. V.; MURAOKA, T. Interações salinidade e fertilidade do solo. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 26, 1997. Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: UFPB, v.,p., 289-317, 1997.

SILVA, M.A.D.; SILVA, W.R. Comportamento de fungos e de sementes de feijoeiro durante o teste de envelhecimento artificial. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.3, p.599-608, 2000.

SLAVICK, B. **Methods of studying plant water relations**. New York: Springer Verlang, v.,p.449, 1979.

SUBBA RAO, L.V.;KUMAR, S.; VANISREE, G. Genetic variability for seedling characteristics among rice (*Oryza sativa* L.) cultivars.**Seed Research**, v.24, p.124–128, 1996.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 51-55, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. ARTMED, v.,p.719, 2004.

TEKRONY, D. M. Accelerated ageing: Congress of the International Seed Testing Association, v. 24, 1995. Seed vigour testing: contributions to a seminar. **International Seed Testing Association**, v., p.816 -822, 1995.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. **Seed Science Research**, v.8, p. 223-44, 1998.

WILLIAMS, R.D. Moisture stress and hydration-dehydration effects on hemp Sesbania (*Sesbania exaltata*) seed germination. **Weed Science**, Lawrence, v.28, n.2, p.487-492, 1980.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. Testes de vigor de sementes. Jaboticabal: **FUNEP**, v.,p.,1994.

VIEIRA, R. D., KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: **ABRATES**, cap.4,v., p.4.1-4.26, 1999.

## **CAPÍTULO 3**

**PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS E OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS ASSOCIADOS  
COM O ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL DE SEMENTES DE FEIJÃO CAUPI**

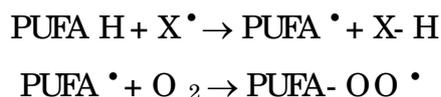
### 3.1. INTRODUÇÃO

As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ser originadas tanto exógenas quanto endogenamente. As ROS formadas intracelularmente podem ser originadas como consequência do próprio metabolismo celular, como os elétrons provenientes da cadeia de transportes de elétrons, localizada na mitocôndria, que podem interagir com várias moléculas intracelulares.

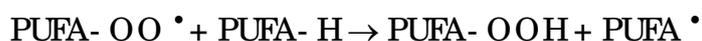
A condição denominada estresse oxidativo ocorre quando a formação de ROS excede a capacidade antioxidante celular, cujos resultados podem ser bastante danosos às células. O estresse oxidativo varia bastante entre organismos, tipos celulares e até mesmo entre células de um mesmo tecido, uma vez que a capacidade antioxidante das células pode ser bastante diversificada (Berra *et al.*, , 2006). Os principais alvos de ROS incluem DNA, lipídios, proteínas sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores, como o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula (Berra *et al.*, 2006).

A peroxidação lipídica é o processo pelo qual as ROS atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios das membranas das células, desintegrando-as e permitindo, assim, a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares. A fosfolipase, ativada pelas espécies tóxicas desintegra os fosfolipídios, liberando os ácidos graxos não saturados, resultando em ações deletérias dos peróxidos lipídicos, como, ruptura das membranas celulares (bombas Na/K e Ca/Mg), mutações do DNA, oxidação dos lipídeos insaturados, formação de resíduos químicos como o malondialdeído. Os peróxidos lipídicos possuem poder de ação maior do que as outras espécies tóxicas primárias de  $O_2$  ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $O_2$ ), atingindo facilmente alvos mais distantes (Halliwell & Gutteridge, 2000). A peroxidação lipídica é dividida em três estágios: iniciação, propagação e terminação (Shewfelt & Purvis 1995). Ácidos graxos polinsaturados (PUFA, principais componentes de lipídios de membranas) são susceptíveis a peroxidação. Peroxidação de lipídios é uma das consequências mais investigadas da ação das ROS. A idéia de que a peroxidação de lipídios era um processo

destrutivo isolado persistiu por décadas. Atualmente, sabe-se que hidroperóxidos de lipídios e produtos oxigenados da degradação de lipídios como também iniciadores da peroxidação de lipídios, ou seja, as ROS, podem participar de uma cascata de sinais de transdução (Tarchevskii,1992). Os radicais hidroxil e o oxigênio singleto podem reagir com os grupos metilenos dos PUFA formando conjugados dienos, radicais peroxilas e hidroperóxidos (Smirnoff,1995).



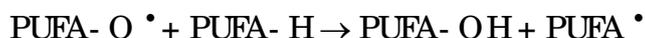
O radical peroxila formado é altamente reativo e hábil para propagar uma reação em cadeia:



A formação de conjugados dienos ocorre quando radicais livres atacam hidrogênios de grupos metilenos separando duplas ligações e levando ao rearranjo de ligações. O produto da peroxidação de lipídios (PUFA - OOH) pode sofrer clivagem redutiva por metais redutores como  $\text{Fe}^{2+}$ , de acordo com a equação a seguir:



O radical lipídico produzido,  $\text{PUFA-O}^\bullet$ , pode iniciar adicionalmente a cadeia de reações:



Entretanto, até agora ainda não está claro se a peroxidação de lipídios pode ser considerada a causa de danos de membranas e desordens metabólicas ou um efeito secundário desses processos. Esse problema tem sua origem em observações feitas em mecanismos e produtos de peroxidação de lipídios em tecidos de plantas. Um compreensivo modelo de peroxidação de lipídios em tecidos de plantas (Shewfelt & Purvis, 1995) enfatiza a importância de processos químicos e bioquímicos no estresse oxidativo.

O vigor das sementes compreende um montante de características ou propriedades que determinam o seu potencial fisiológico, ou seja, a capacidade de desempenho das sementes quando submetidas a diferentes condições ambientais (Marcos-Filho, 1994; 1999; 2001; Carvalho & Nakagawa, 2000). O processo de deterioração, ao qual as sementes estão sujeitas logo após a maturação, está estritamente relacionado ao vigor. Dessa forma, é de fundamental importância à avaliação da deterioração de lotes de sementes utilizando uma metodologia específica. O teste de envelhecimento artificial e o teste de condutividade elétrica são considerados pela Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1983) e pela International Seed Testing Association (ISTA, 1983), dos mais importantes testes de vigor. O processo de deterioração da semente parece iniciar-se com a perda da integridade das membranas celulares e, dentro desse contexto, sementes com baixo vigor tendem a apresentar desorganização na estrutura das membranas celulares, permitindo aumento na lixiviação de solutos (AOSA, 1983; Bewley & Black, 1999).

A perda de viabilidade ou o envelhecimento de sementes é, muitas vezes, associado com peroxidação de ácidos graxos polinsaturados, na presença de oxigênio (Hendry, 1993). O processo pelo qual os radicais livres formam-se pela atividade metabólica da célula é consequência da reação de lipídios que compõem a membrana celular, principalmente os polinsaturados, resultando em radicais livres e peróxidos instáveis, razão pela qual esse processo é designado como peroxidação de lipídios (Vieira & Carvalho, 1994). A desestruturação e perda de integridade do sistema de membranas celulares, causada principalmente pela oxidação dos lipídios, promove o descontrole do metabolismo e das trocas de água e solutos entre as células e o exterior, com reflexos diretos sobre a qualidade fisiológica das sementes (Dias & Marcos-Filho, 1995). Conseqüentemente, uma forte deterioração das membranas celulares é um forte indicativo de sementes de baixo vigor (Queiroga, 1993).

A peroxidação de ácidos graxos polinsaturados pelo ataque de espécies reativas de oxigênio pode levar ao encurtamento e quebra das cadeias, que conduzirá ao aumento da fluidez e permeabilidade das membranas. Quando membranas de mitocôndrias são expostas ao estresse oxidativo, e os fosfolipídios de membranas são danificados provavelmente por peroxidação de ácidos graxos polinsaturados, esses danos levam a inibição da citocromo c oxidase (Paradies *et*

*al.*, 2000). Pesquisas têm mostrado que, na presença de oxigênio, o envelhecimento de sementes pode levar alterações peroxidativas em ácidos graxos polinsaturados. Essa peroxidação não-enzimática induzida por radical livre, é um potencial causador de danos às membranas, sendo uma das maiores causas da deterioração de sementes (Sung & Jeng, 1994).

Outra importante biomolécula, a proteína, pode ser danificada pelas espécies reativas de oxigênio por interação química direta ou indireta, envolvendo produtos finais da peroxidação de lipídios. Um número de aminoácidos pode ser modificado, como por exemplo, cisteína que pode ser oxidada a cistina, e outras, prolina e arginina são convertidas a glutamil semialdeído. Tais modificações não afetam a função das proteínas. Em muitos casos, os danos aos aminoácidos são reparados *in situ*, enquanto que em outros casos, a proteína inteira é removida e degradada (Dean *et al.*, 1997; Møller & Kristensen, 2004). Um número de proteínas oxidadas tem sido identificadas e isoladas em mitocôndrias de plantas, provavelmente devido sua particular susceptibilidade ao estresse oxidativo *in vivo*. Um outro número de proteínas oxidadas da fração da matriz mitocondrial foi identificado após tratamento oxidativo (Kristensen *et al.*, 2004). Uma das teorias do envelhecimento é que proteínas modificadas oxidativamente acumulam com o tempo. Isto não ocorre em *Arabidopsis*, onde a quantidade de proteínas com grupos carbonila livre aumenta durante a fase vegetativa, mas decresce dramaticamente durante as fases de florescência e senescência (Johansson *et al.*, 2004).

Um vasto número de estudos tem revelado que a carbonilação de proteínas aumenta com o envelhecimento de células, organelas e tecidos de várias espécies e, em muitos casos, a carbonilação tem sido relacionada a enzimas envolvidas com o processo de envelhecimento. Em células de *Escherichia coli*, usando detecção de oxidação de proteínas *in situ*, e usam técnica de separação de células cultivadas e não cultivadas de vários tempos de envelhecimento, foi demonstrado que as proteínas da população de células não cultivadas exibiam marcadamente altos níveis de carbonilação irreversível (Nystrom, 2005).

Muitos mecanismos de oxidação de proteínas são conhecidos em detalhes, sendo a maior parte dos estudos feitos em sistemas vivos. Modificações de proteínas *in vitro*, devido ao estresse oxidativo têm sido menos estudadas, especialmente devido à dificuldade de identificar modificações de proteínas no

extrato total. Com esse objetivo, uma técnica de Western blot foi desenvolvida, tendo a vantagem de grupos carbonilas gerados reagirem com dinitrofenilidrazina (DNPH), e que proteínas derivatizadas podem ser separadas por PAGE-SDS e analisadas pelo conteúdo carbonila por imunoenensaio com anticorpos anti-DNP. Essa técnica foi empregada para testar a susceptibilidade relativa de proteínas a modificações oxidativas em células de *Escherechia coli* crescendo aerobicamente quando expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou menadiona (um composto gerador de superóxidos).(Levine *et al.*, 1990; Nystrom, 2005).

A deterioração de sementes ocorre durante períodos prolongados de armazenamento. Esse envelhecimento é manifestado por uma redução na percentagem de germinação, que leva as sementes a produzirem plântulas debilitadas (Byrd & Delouche,1971). Recentemente, o envelhecimento de sementes tem sido o objetivo e muitas pesquisas, no entanto, ainda não está claro quais os principais processos do envelhecimento. Parrish & Leopoldo (1976) sugeriram que o envelhecimento em sementes de soja resulta de alterações deteriorativas nas membranas, provavelmente via reações de peroxidações envolvendo ácidos graxos polinsaturados. Por outro lado, o papel da carbonilação pode alterar com o envelhecimento dos organismos. Proteínas podem ser modificadas por um largo numero de reações envolvendo espécies reativas de oxigênio (Nystrom, 2005).

Dessa forma, em nosso trabalho, utilizando um processo artificial de envelhecimento de sementes de feijão caupi, verificamos a relação entre peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas ou a ação conjunta de ambos os processos com a perda do vigor e da viabilidade.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Material Vegetal**

Nesse trabalho foram utilizadas sementes de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.),Walp.], cultivar Pitiúba e cultivar Pérola, disponíveis no Banco de Germoplasma do Departamento de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

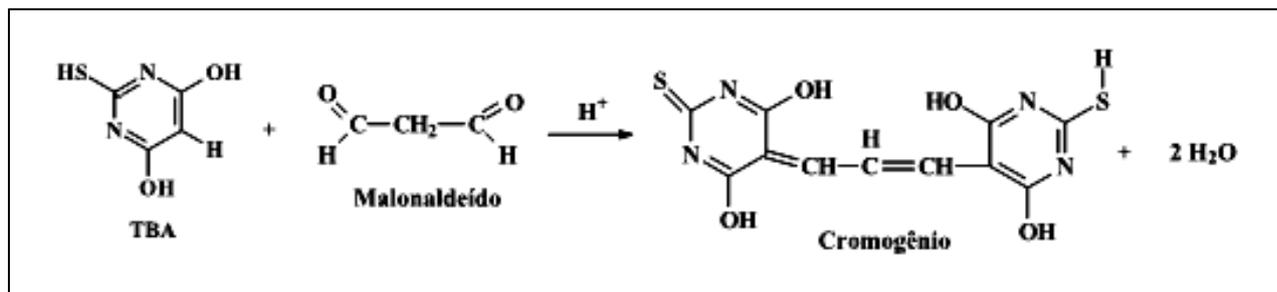
### **3.2.2. Envelhecimento Artificial (acelerado)**

Amostras de sementes de feijão caupi (cv. Pérola e v.Pitiúba) previamente selecionadas, foram distribuídas e incubadas em caixas “gerbox” em câmara de envelhecimento acelerado por 72 h (figura 1). O grupo controle (0 h) trata-se de sementes de ambas as cultivares que não foram incubadas em câmara de envelhecimento artificial.

A câmara de envelhecimento artificial utilizada em nosso experimento (ELO'S; 220V) é composta de duas divisões: uma interna superior e outra externa inferior, as quais foram preenchidas respectivamente com 3 L e 7 L de água destilada. Uma combinação de 45 °C com 99% de U.R., no escuro (regulada 24 h antes do início do experimento), foi preestabelecida na câmara para o processo de envelhecimento artificial (Delouche & Baskin, 1973). Para a realização dos testes de vigor, foram feitas coletas de sementes em 0 h, 24 h, 48 h e 72 h de envelhecimento. Uma parcela dessas sementes foi imediatamente utilizada em testes e análises e uma outra parcela foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente mantida a -83 °C. (Desenho experimental: 1 controle x 3 repetições x 1 tempo; 1 tratamento x 3 repetições x 3 tempos).

### **3.2.3. Peroxidação de lipídios (TBARS)**

Um dos métodos mais utilizados para a determinação do índice de peróxidos (IP), que representa a diferença entre a formação e a decomposição de peróxidos, é o teste do ácido 2- tiobarbutúrico (TBA). Esse teste é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MDA), um aldeído com 3 átomos de carbono. Nesse ensaio, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-535 nm e apresenta máximos de absorção secundários a 245 e 305 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade. (Química Nova 2005).



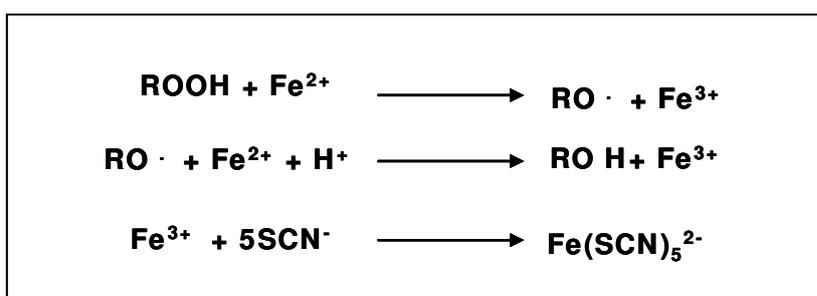
**Esquema 3.1.** Reação do teste de TBA entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído, formando o composto colorido e medido espectrofotometricamente a 532 nm (Química Nova,2005.).

O TBARS foi um dos métodos utilizados no nosso trabalho para mensurar a peroxidação de lipídios (esquema 3.1.). Para isso, foram reservadas 500 mg de material fresco de lotes de sementes do controle e 500 mg de material de sementes de cada um dos tempos de tratamento de envelhecimento artificial (0, 24, 48 e 72h) de ambas as cultivares. As sementes foram maceradas em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, sendo adicionados 2 mL da solução de TCA 1% (m/v). A mistura foi acondicionada em tubos tipo *ependorf* de 2 mL e centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos, a 4 °C. O precipitado foi descartado. Alíquotas de 500 µL foram transferidas para tubos de ensaio e, a estes, foram adicionados 2 mL de reagente contendo TBA a 0,5% (m/v) dissolvido em TCA a 20% (m/v). Os tubos foram hermeticamente fechados e a mistura de reação ficou incubada em banho-maria a 95 °C, por 1 h, e, em seguida, resfriada em banho de gelo. Quando necessário, as amostras foram centrifugadas á temperatura ambiente (25 °C) por 10 minutos a 9.000 x g, em centrífuga de bancada. As leituras foram realizadas a 25 °C nas absorvâncias de 532 e 660nm, respectivamente (esta, relativa à reação não específica). A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a quantidade do complexo MDA-TBA formada foi calculada através do coeficiente de extinção molar de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Heath & Packer, 1968).

### 3.2.4. Índice de hidroperóxidos de lipídios (LPO)

A quantificação de peroxidação de lipídios é essencial para avaliar o papel da injúria oxidativa em desordens fisiológicas. A peroxidação de lipídios resulta na formação de compostos altamente reativos e hidroperóxidos instáveis tanto de ácidos graxos saturados com insaturados. Tradicionalmente, peroxidação de lipídios é quantificada pela mensuração de MDA e 4-hydroxy noneal (4-HNE), os produtos de degradação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAa) (Winger et al., 2005). Métodos colorimétricos têm sido desenvolvidos para mensurar aldeídos. Entretanto, esses ensaios são citados como não sendo específicos, podendo levar a uma super estimação da peroxidação de lipídios (Catálogo 705002 do Cayman Company's Lipid Hydroperoxyde Assay Kit).

Nesse trabalho, utilizamos o Cayman Chemical Company's Lipid Hydroperoxide Assay Kit que mede diretamente os hidroperóxidos utilizando reações redox com íons ferrosos (esquema 3.2.). Os hidroperóxidos são altamente instáveis e reagem facilmente com íons ferrosos para produzirem íons férricos. Os íons férricos resultantes são detectados usando o íon tiocianato como cromógeno.



**Esquema 3.2.** Reações de redução/oxidação

A extração foi feita com clorofórmio, onde 450 µL da mistura clorofórmio-etanol foram adicionados a cada tubo teste com 500 µL do extrato de clorofórmio com um volume final de 950 µL antes de adicionar o cromogênio. A mistura para o cromógeno foi feita com o reagente 1 FTS e o reagente 2 FTS do "Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit", da "Cayman Chemical", em tubos de ensaio, levando posteriormente ao vortex. Logo após, adicionar 50 uL do cromógeno

preparado a cada tubo de ensaio e misturar em vortex. Fechar os tubos com capas plásticas. Deixar os tubos à temperatura ambiente por 5 minutos. Medir a absorbância em cada tubo a 500 nm utilizando uma cubeta de quartzo de 1 mL. Utilizar a mistura clorofórmio-metanol como branco da amostra. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão típica. O cálculo dos valores de hidroperóxidos em amostras nos tubos (HPST) foram feitos usando a equação obtida da regressão linear da curva padrão substituindo os valores de absorbância de cada amostra [Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit , daCayman Chemical].

Cálculo da concentração de hidroperóxidos na amostra ( $\mu\text{M}$ ) =

$$\frac{\text{HPST}}{\text{VE}} \times \frac{1 \text{ mL}}{\text{SV}} \quad \text{onde,}$$

VE = Volume do extrato usado no ensaio (mL)

SV = Volume original usada na extração da amostra (mL)

### 3.2.5. Detecção de proteínas oxidadas

O Kit de detecção de oxidação de proteínas Oxyblot™ da Chemicon, foi utilizado em nosso trabalho visando uma rápida e sensível detecção de proteínas modificadas por radicais livres derivados do oxigênio e outras espécies reativas. Como consequência dessa modificação, grupos carbonila são introduzidos dentro das cadeias laterais das proteínas. Utilizando o protocolo do Kit, os grupos carbonila foram derivatizados com DNPH e posteriormente detectados por anticorpo específico que reconhece o DNP ligado à proteína. Para isso, amostras de 0,25 g de massa fresca (MF) de sementes controle e de sementes envelhecidas artificialmente foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido onde foram adicionados 2,5 mL do tampão de extração de enzimas antioxidativas. Ao tampão de extração, foi adicionado um agente redutor, para prevenir a oxidação das proteínas, que pode ocorrer após a lise da célula, podendo ser 1-2% de 2-mercaptoetanol ou DTT 50 mM, o qual é suficiente para

inibir a oxidação, porém não tem efeito adverso na reação de derivatização com o kit OxyBlot™. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos. O conteúdo de proteínas solúveis do sobrenadante foi determinado segundo Bradford (1976). Duas alíquotas de cada extrato a ser analisado foram tratadas. Uma das alíquotas foi submetida à reação de derivatização e a outra serviu como controle negativo pela substituição da Solução Controle da Derivatização 1 X pela Solução DNPH 1X. Para isso, foram transferidos 5 µL do extrato para 2 tubos *ependorfs* (0.5 – 1.5 mL). Cada alíquota de 5 µL foi desnaturada pela adição de 5 µL de SDS 12% para uma concentração final de SDS 6%. As amostras foram derivatizadas pela adição de 10 µL da Solução DNPH 1X a um dos tubos. Para a alíquota designada ao controle negativo, foram adicionados 10 µL da Solução Controle de Derivatização em substituição da solução DNPH. Os tubos foram incubados a uma temperatura ambiente por 15 minutos. Os extratos das sementes tratadas e do controle negativo foram aplicados em gel unidimensional de poliacrilamida na presença de SDS e as proteínas oxidadas foram posteriormente transferidas e imunodetectadas por Western Blot.

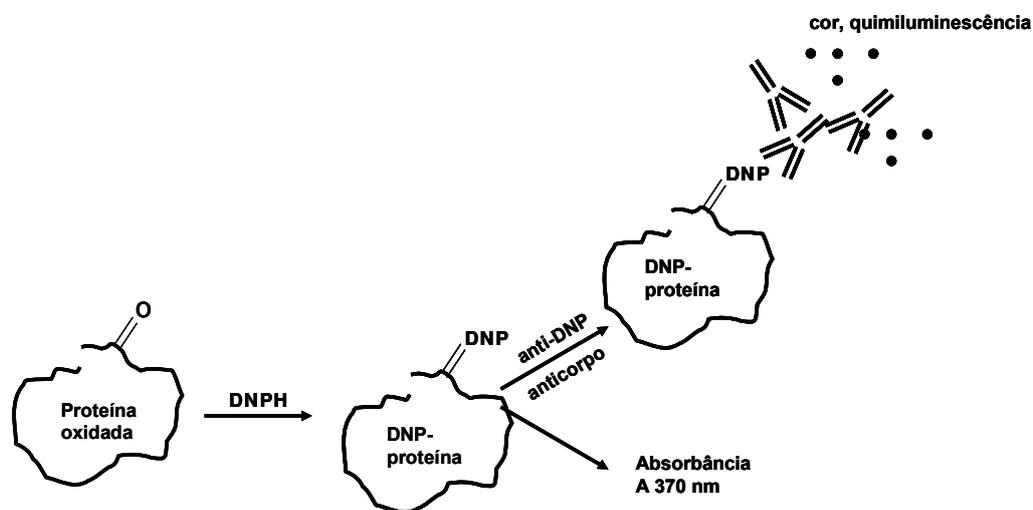
### **3.2.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (PAGE-SDS)**

Para eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS), uma alíquota de 20 µL de cada amostra nas condições derivatizada e não derivatizada foi adicionada a 20 µL do tampão da amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6.8 adicionado de glicerol, SDS 10% e B. Blue). Um sistema de dois géis foi usado nas seguintes condições: uma concentração de 12,5% para o gel principal ou “main gel” e uma concentração de 5% para o gel “organizador” das proteínas ou “stacking gel”. Usamos para a corrida eletroforética o programa 250 V, 40 mA e 20 W, durante 1 hora e trinta minutos, utilizando o tampão de corrida Tris 0,025 M/ Glicina 0,192 M; pH 8,3 com SDS 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas em uma solução contendo metanol 50% e ácido acético 10% por 30 minutos e, em seguida, foram coradas com *Comassie brilliant blue R-250* 0,025% em ácido acético 10%: metanol 40% em água por 2 h. O descoramento foi feito

por 2 horas numa solução de ácido acético 10%: metanol 40% em água. (Laemmli, 1970.).

### 3.2.7. Western Blot

A transferência eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi feita de acordo com o método descrito originalmente por Towbin *et al.* (1979). Para isso, utilizamos uma unidade de transferência Techwave fabricado pelo Sigma-Aldrich. O sistema de tampão utilizado na transferência (Tris 25 mM/glicina 192 mM/ metanol 20%, pH 8,3) também foi aquele descrito por Towbin *et al.* (1979). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose (Hybond<sup>TM</sup> – ECL<sup>TM</sup> fabricado pelo Amersham Biosciences), foi mergulhada numa solução de Ponceau S, para corar as proteínas ligadas na membrana. Esta solução foi preparada (diluição 1:10) a partir de uma solução estoque com a seguinte composição: 2 g de Ponceau S, 30 g de ácido tricloroacético, 30 gramas de ácido sulfossalicílico em um volume final de 100 ml com água destilada. Após identificação e marcação com caneta das posições dos padrões de pesos moleculares, os sítios de ligação para as imunoglobulinas na membrana de nitrocelulose foram bloqueados. Isto foi feito mergulhando-se as membranas numa solução a 10% (em tampão fosfato 0,1 M/NaCl 0,13M, pH 7,4) de leite em pó desnatado Mólico (Nestlé) sob agitação “over night”. Decorrido este tempo, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana incubada com anticorpo primário DNP de coelho. O Anticorpo primário da solução estoque (90451) foi diluído de 1: 150 com o tampão de diluição de bloqueio (Sigma-Aldrich Co). A incubação foi feita à temperatura ambiente sob agitação lenta por 1h. Após cinco lavagens sucessivas com 50 ml de tampão fosfato 0,1 M/NaCl 0,13 M pH 7,4, cada uma com cinco minutos de duração, a membrana foi incubada por 1h com o anticorpo secundário IgG conjugado com fosfatase alcalina e as bandas das proteínas imunorreativas foram visualizadas após adição do substrato 5-bromo,4-cloro,3-indolil fosfatase/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT). O peso molecular aparente das proteínas danificadas oxidativamente foi estimado com base nos padrões do Kit.



**Esquema 3.3.** Protocolo usual para uso de DNPH em testes de carbonilação de proteínas: imunoenensaio e ensaio espectrofotométrico (Shacter,2000).

### 3.2.8. Determinação do teor de carbonilação de proteínas

O teor de carbonilação de proteínas foi determinado pelo método baseado na reação de grupos carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar o 2,4-dinitrofenilhidrazona (Levine *et al.* 1990). Para isso, utilizamos o *Protein Carbonyl Assay Kit* (Cayman, Chemical). Extratos das amostras foram incubados com DNPH por 60 minutos. Posteriormente, o extrato protéico foi precipitado numa solução de TCA 20%. Após centrifugação (3400  $\times$ g) o pellet foi lavado com a mistura acetato de etila e etanol (1:1, v/v), por três vezes para remover o excesso de DNPH. O pellet resultante foi dissolvido em 1.5 mL of de guanidina 6 M. O teor de carbonila foi avaliado em espectrofotômetro a 370 nm. Os resultados da determinação dos teores de carbonilação de proteínas são calculados da seguinte forma:

1. Cálculo da média da absorbância de cada amostra e do controle;

2. Subtração da média da absorbância dos controles da média da absorbância das amostras. Essa subtração é a absorbância corrigida (CA);

3. Determinação da concentração das carbonilas pela utilização da absorbância corrigida na equação a seguir:

**Proteínas carboniladas (nmol/mL)=**

$$[(CA) / (*0,022\mu\text{M}^{-1})] (500 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L})$$

\* O atual coeficiente de extinção para a dinitrofenilidrazina a 370nm é 22,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

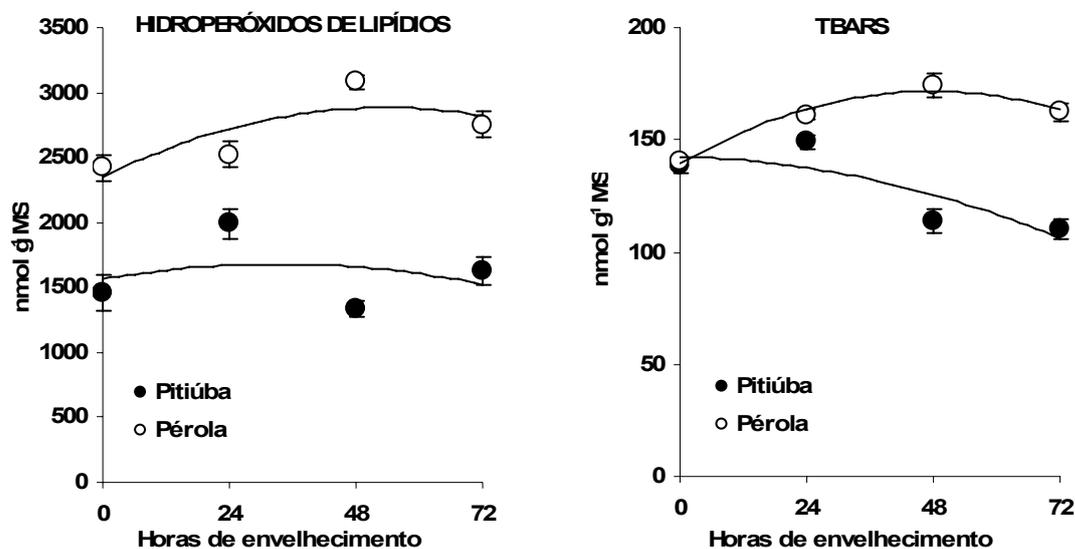
### 2.3. RESULTADOS

Em nossos estudos com sementes de feijão caupi artificialmente envelhecidas, a peroxidação de lipídios quantificada pelo conteúdo de LPO (conteúdo de oxidação de hidroperóxidos de lipídios) e pelo conteúdo de malonaldeído (TBARS), foi expressiva somente em sementes da cv. Pérola, principalmente em 48 horas de envelhecimento artificial. No entanto, esses resultados foram pouco significativos em sementes da cv. Pitiúba ao longo do tempo de envelhecimento artificial (Figura 3.1.).

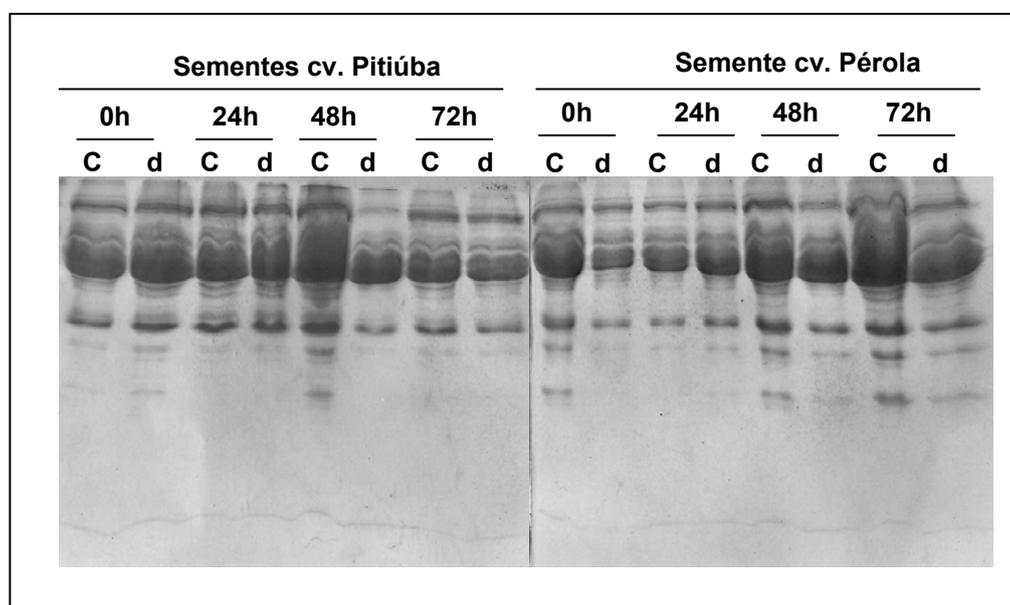
Por outro lado, o teor de carbonilação de proteínas foi bastante elevado em sementes artificialmente envelhecidas da cv. Pérola ao longo do tratamento, tendo sido observado que esse valor foi mais expressivo em 72 horas de tratamento. Entretanto, não houve valores expressivos do teor de carbonilação em sementes artificialmente envelhecidas da cv. Pitiúba (Fig. 3.3.).

Os resultados do teste de imunensaio com anti-DNP (Oxyblot; esquema 3.3.) revelaram que, em sementes envelhecidas artificialmente da cultivar Pérola houve um aumento significativo no padrão de oxidação de proteínas em 72 horas de tratamento, onde aparece um forte sinal representado por uma banda de subunidade protéica com massa molecular próxima a 66kDa. Em sementes envelhecidas artificialmente da cultivar Pitiúba, entretanto, não houve nenhuma mudança significativa no padrão de oxidação de proteínas em relação ao controle

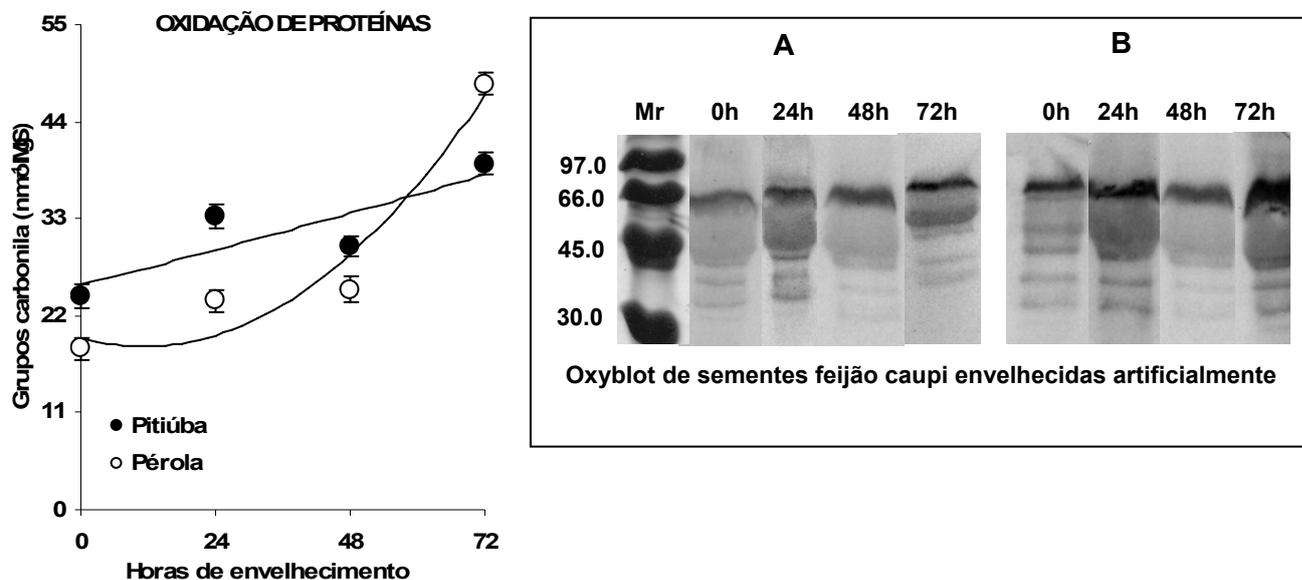
ao longo das 72 horas de tratamento detectado por teste de imunoenensaio (Fig. 3.2. e 3.3.).



**Figura 3.1.** Peroxidação de lipídios (hidroperóxidos de lipídios ou LPO e conteúdo de malonaldeído determinado por TBARS) em sementes de feijão caupi envelhecidas artificialmente por 72 h.



**Figura 3.2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras de sementes de feijão caupi envelhecidas artificialmente. **C** – controle negativo (amostra não derivatizada por DNPH); **d** - amostra derivatizada pela dinitrofenilhidrazina (DNPH).



**Figura 3.3.** Teor de carbonilação de proteínas e detecção de proteínas oxidadas. Quantificação da intensidade de oxidação de proteínas pelo teor de carbonilação (gráfico acima, à esquerda). Oxyblot de sementes de feijão caupi cv. Pitiúba (**A**) e cv. Pérola (**B**), envelhecidas artificialmente. Os grupos carbonila de proteínas de sementes foram derivatizados pelo DNPH. A membrana de nitrocelulose foi incubada contra o anticorpo primário (anti-DNPH) e posteriormente incubada com IgG de coelho conjugado com a enzima fosfatase alcalina. As bandas foram reveladas pela adição do substrato (BCIP/NBT).

## 2.4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O aumento da peroxidação de lipídios mediado por radicais livres e peróxidos é considerado como sendo uma das explicações da perda da viabilidade das sementes durante o envelhecimento (Sung 1996, Goel & Sheoran 2003). Em nossos estudos, visamos verificar essa afirmação utilizando sementes de feijão caupi. Observamos em nossos estudos que, a germinação das sementes da cultivar Pérola decresceu progressivamente com o envelhecimento artificial (Capítulo 2, figura 2.7.). Uma possível explicação para a deterioração de sementes é a peroxidação de lipídios, quando as membranas são “perturbadas” (Ponquett *et al.* 1992, Chang and Sung 1998). Essas alterações nas membranas de sementes envelhecidas podem levar ao vazamento de eletrólitos durante a embebição das sementes. Em nossos estudos, o decréscimo na germinabilidade foi correlacionado ao aumento no vazamento de eletrólitos, refletindo desse modo, a perda da integridade da membrana (Capítulo 2, figura 2.7.). Esse fenômeno pode ser um indicativo de uma inabilidade para uma manutenção coerente das membranas, resultando em perda da germinabilidade (Chang and Sung 1998).

A determinação do MDA é um método adequado da quantificação da extensão da peroxidação de lipídios, especialmente em sementes ricas em óleos (Sung and Jeng 1994, Chang and Sung 1998). O aumento do nível de MDA e de peróxidos, em sementes artificialmente envelhecidas, reflete indiretamente o aumento na peroxidação de lipídios (Chang and Sung, 1998, McDonald 1999).

No presente estudo, o nível de MDA e conteúdo de peróxido aumentaram com o envelhecimento artificial de sementes de Pérola (Figura 3.1.). Esse resultado, em conjunção com a redução da germinabilidade e aumento de vazamento de eletrólitos, indica que, o aumento na peroxidação de lipídios é um excelente indicativo da perda do vigor e da viabilidade nessa cultivar.

Proteínas são um dos maiores alvos de radicais livres derivados do oxigênio e outras espécies reativas. Alterações oxidativas de proteínas resultam em modificações de cadeias laterais de metionina, histidina, e tirosina assim como forma pontes dissulfeto de cisteína. A modificação oxidativa de proteínas pode alterar características bioquímicas das proteínas como a sua atividade

enzimática. Uma relação entre oxidação de proteínas e o envelhecimento tem sido constantemente sugerida (Shacter,2000).

Em nossos estudos, determinamos o nível de oxidação de proteínas por quantificação de carbonilação e detecção de proteínas modificadas pelo teste de imunoenensaio. A vantagem do imunoenensaio é que, as proteínas oxidadas são separadas e identificadas a partir de uma mistura complexa por PAGE-SDS. Dessa forma, o estatus oxidativo de cada proteína pode ser analisado quantitativamente por comparação do sinal de intensidade de muitas proteínas em diferentes poços do mesmo gel.

A utilização de grupos carbonila (CO) como marcadores tem suas vantagens em comparação com produtos de peroxidação de lipídios, pois, a formação de proteína ligada a grupos CO parece ser um fenômeno comum da oxidação de proteínas devido à relativa estabilidade e relativa formação precoce de proteínas oxidadas. É bem conhecido que células degradam proteínas oxidadas durante horas e dias (Grune *et al.* 1995), enquanto os produtos da peroxidação de lipídios são detoxificados em minutos (Siems *et al.*, 1996).

Eventualmente o processo de carbonilação durante o envelhecimento é substancial (Levine, 2002) levando a modificações na molécula da proteína (Stadtman and Levine,2000). Interessantemente, existem organismos que em determinados estágios do seu desenvolvimento, utilizam proteínas de manutenção para minimizar danos, podendo estar equipados com sistemas que retiram esses danos priorizando a reprodução. Isso ocorre na planta *A. thaliana* que é munida de um mecanismo de defesa desenvolvido para esse fim (Johansson *et al.*, 2004).Sabe-se que a carbonilação aumenta no início do envelhecimento da planta, similarmente aos animais, mas declina abruptamente para priorizar a fase vegetativa (Johansson *et al.*, 2004).

Em nossos estudos, a mensuração do teor de oxidação de proteínas revelou que, houve um aumento crescente no teor de grupos carbonila em sementes envelhecidas artificialmente da cultivar Pérola, sendo mais significativo às 72 h de tratamento (figura 3.3.). Esse fato foi corroborado pela imunodeteção de um sinal mais forte da subunidade protéica de aproximadamente 66kDa revelado em 72 h de tratamento em amostras de sementes dessa cultivar (figura 3.3.B). Além disso, o progresso do dano oxidativo em proteínas de sementes artificialmente envelhecidas de Pérola foi tão significativo quanto os danos oxidativos em

lipídios. Por outro lado, a verificação da combinação do baixo teor de oxidação de proteínas e de lipídios em sementes tratadas de Pitiúba é um importante indicativo que essa variedade de feijão caupi deve possuir um eficiente sistema antioxidante contra danos provindos do tratamento por envelhecimento acelerado.

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing,v.,p.93, 1983.

BEWLEY,J.D.; BLACK,M. **Seeds**: physiology of development and germination, v.,p.445,1994.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO,P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização do controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29,p.1340-1344, 2006.

BRADFORD, M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein - Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254, 1976.

BYRD,H.W.; DELOUCHE,J.C. Deterioration of soyben sees in storage. PROC. Assoc. Official Seed Anal, v.61,p.41-57, 1971.

CARVALHO,N.M.; NAKAGAWA,J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**, v., p.588, 2000.

CHANG, S.M.; SUNG, J.M. Deteriorative changes in primed sweet Corn seeds during storage.**Seed Sci Technol**, v. 26, p. 613-626,1998.

DIAS, D.C.F.S.; MARCOS-FILHO,J. Testes de vigor baseados na permeabilidade das membranas celulares: I.Condutividade elétrica. **Informativo Abrates**,v.5,n.1,p.26-36,1995.

GOEL, A.; SHEORANI, S. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biol Plant** ,v.46, p.429-434, 2003.

GRUNE,T.; REINHECKEL,T.; JOS, M.; DAVIES,K.J.A. Proteolysis incultured liver epithelial cells during oxidative stress – role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. **J Biol Chem**, v. 270, p.2344-51,1995.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, v.,p.,2000.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. *SeedScience Research*, Wallingford, v. 3, p. 141-153, 1993.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION –ISTA. **Handbook of vigour test methods**, v.p.117, 1995.

JOHANSSON, E., OLSSON, O., AND NYSTRÖM, T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. **Journal Biol. Chem.**,v. 279,p. 22204–22208, 2004.

KRISTENSEN, B. K., ASKERLUND, P., BYKOVA, N. V., EGSGAARD, H., AND MOLLER, I. M. Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**,v, 65,p. 1839–185, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*,v.p. 227:680, 1970.

LEVINE, R.L., GARLAND, D., OLIVER, C.N., AMICI, A., CLIMENT, I., LENZ, A.G.,AHN, B.W., SHALTIEL, S., STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, v. 186, p.464–478, 1990.

LEVINE,R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation,aging, and disease. *Free Radic Biol Med*,v. 32, p. 790–796, 2002.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Vieira, R.D. & Carvalho, N.M. Testes de vigor em sementes. **FUNEP**, v., p.164,1994.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França Neto, J.B. Vigor de sementes: conceitos e testes. **ABRATES**, v., p.1-24, 1999.

MARCOS FILHO, J.; Novembre, A.D.C.; Chama, M.C.P. **Testes de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para a avaliação do vigor de sementes de soja**, v.58, n.2, p.421-426, 2001.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration:physiology,repair and assessment. **Seed Sci Technol**, v. 27, p. 177-237,1999.

NYSTRO,T.M.N. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The embo journal**,v. 24, p.1311–1317, 2005.

PARADIES, G., PETROSILLO, G., PISTOLESE, M., AND RUGGIERO, F. M. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. **FEBS Lett.** 466: 323–326, 2000.

PARRISH, D.J.; LEOPOLD, A.C.; On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiology*,v.61,p.365-369,1978.

PONQUETT, R.T.; SMITH, M.T.; ROSS,G. Lipid autooxidation and seed ageing:putative relation ships between seed longevity and lipid stability. **Seed Sci Res**, v. 2., p. 51- 54, 1992.

QUEIROGA, V.P. Efeito do peso da semente de girassol sobre o índice de condutividade elétrica e a predição de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.15,n.1,p.130-137,1993.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism reviews**, v.32, p.307-326, 2000.

SHEWFELT,R.L.; PURVIS,A.C. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. **Hort. Science**,v.30,p.213-218,1995.

SIEMS,W.G.;ZOLLNER,H.;GRUNE,T; ESTERBAUER,H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes:1,4-dihydroxynonene is not main product. **J Lipid Res**, v.38, p.612-22, 1997.

SMINORFF,N. Antioxidant systems andplant response to the environmnt.**Bios Scientific publishers**,Oxford,v.,p.217-243,1995.

STADTMAN, E.R.; LEVINE,R.L.Protein oxidation. **Ann NY Acad Sci.** ,v. 899, p. 191–208, 2000.

SUNG, J. M.; JENG,T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiol Plant**, v. 91, p. 51-55,1994.

SUNG, J. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soy-bean seeds during ageing. **Physiol Plant** , v. 97, p. 85- 89,1996.

TAEICHEVSKII,I.A. Regulatory role of degradation ofbiopolymers and lipids. **Fiziol. Rastenii**,v.39,p.1215-1223,1992.

TBARS, aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quimica Nova**, v.,28, p. 655-663, 2005.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T. & GORDON, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gell to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 76: 4350-4354, 1979.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. de. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: **FUNEP**, v.,p.164,1994.

WINGER, A. M., MILLAR, A. H., AND DAY, D. A. Sensitivity of plant mitochondrial terminal oxidases to the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). **Biochemistry Journal**,v.,p. 387: 865–870, 2005.

## **CAPÍTULO 4**

**ALTERAÇÕES NAS ATIVIDADES DE CATALASE, PEROXIDASE DE  
ASCOBATO E DISMUTASE DE SUPERÓXIDO EM SEMENTES DE DUAS  
CULTIVARES DE FEIJÃO CAUPI ENVELHECIDAS ARTIFICIALMENTE**

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A importância do oxigênio reativo e radicais livres em injúrias celulares e o processo de envelhecimento tem atraído o aumento das atenções nos últimos vinte anos (Kim *et al.*,2006). As respostas das plantas ao estresse ambiental têm sido associadas com espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ),oxigênio singlete, superóxidos e radicais hidroxila. Radicais livres e ROS são formadas pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, oxidases associadas a membranas, fotorespiração e, por produtos provenientes da cadeia transportadora de oxigênio. As ROS são benéficas ou danosas, dependendo da quantidade, tipo e localização da sua produção e ainda, do estatus dos sistemas de defesa. Sua produção descontrolada pode inativar biomoléculas ou iniciar uma cadeia de reações destruindo estrutura e função das membranas. Funções benéficas das ROS incluem polimerização de parede celular e geração de mensageiros secundários como vias de transdução de sinais (Anderson,2002).

As espécies reativas de oxigênio têm sido estudadas largamente no campo da fisiologia de sementes, sendo particularmente ressaltado o estudo da sua relação com a perda do vigor e da viabilidade de sementes durante prolongado armazenamento. A perda de viabilidade ou o envelhecimento de sementes é, muitas vezes, associado com a peroxidação de ácidos graxos polinsaturados, na presença de oxigênio (Hendry, 1993). Tem sido veementemente citado que a peroxidação de lipídios induzida pela deterioração é a maior responsável pelo envelhecimento de sementes (Priestley, 1986; McDonald, 1999). A peroxidação de lipídios é consequência da reação de lipídios que compõem a membrana celular, principalmente os polinsaturados, com o  $O_2^-$ , resultando em radicais livres e peróxidos instáveis (Vieira & Carvalho, 1994). No entanto, as plantas possuem sistemas removedores de radicais livres e moléculas antioxidantes como a vitamina E, o  $\beta$ -caroteno e o ácido ascórbico dentre outros que auxiliam no controle da oxidação dos ácidos graxos, ligando-se ao oxigênio ativado adquirido quando as sementes apresentam baixos teores de água. Em função disso, o pré-tratamento de sementes com compostos diversos como ácido ascórbico, hormônios e vitaminas, antes do envelhecimento natural e acelerado, vem sendo testado (Chhetri *et al.*,1993; Powell *et al.*,2000). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de aumentar o vigor e prolongar a armazenabilidade

das sementes pela “remoção” de radicais livres com o tratamento prévio das sementes com aplicação de antioxidantes como o ácido ascórbico (Raghuramulu & Purushotham, 1991; Chhetri *et al.*, 1993; Basu, 1994; Maity *et al.*, 2000;).

Estudos em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), cultivar HS6 e cultivar H1098 (Goel *et al.*, 2003), foram realizados para tentar elucidar o mecanismo de deterioração de sementes. Nesse trabalho, as sementes foram artificialmente envelhecidas a 40°C e 100% de U.R. durante 4 dias. Como resultado desse tratamento, a germinação nessas cultivares decresceu e houve deterioração das membranas por ensaio de condutividade elétrica enquanto ocorria o envelhecimento artificial progressivamente. O decréscimo na germinação mostrou alta correlação com o decréscimo na atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e glutathione redutase. Esses resultados sugerem que a deterioração de sementes de algodão durante o envelhecimento acelerado está intimamente relacionado com o decréscimo da atividade de várias enzimas “removedoras” de peróxido como também a peroxidação de lipídios. Adicionalmente, foi observado que a atividade de várias enzimas antioxidantes decresceu durante o tratamento de envelhecimento sendo parcialmente restaurado por 12 horas de hidratação por tratamento com ácido ascórbico comparado com as condições do controle. A presença de antioxidantes como o ácido ascórbico protegeu a peroxidação de lipídios e a formação de radicais livres (McDonald, 1999). O resultado desse pré-tratamento suporta claramente a hipótese que a deterioração de sementes ocorre devido a peroxidação de lipídios de membrana causado pelo desequilíbrio no sistema de remoção de espécies reativas de oxigênio.

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com aqueles substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa. Estas substâncias antioxidantes podem ser de natureza enzimática ou não-enzimática (Halliwell & Gutteridge, 1989). Os antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico, glutathione,  $\alpha$ -tocoferóis e carotenóides ocorrem em altas concentrações nos vegetais. A vitamina C (ácido ascórbico) é hidrossolúvel e também age contra os radicais livres e o oxigênio singleto. O ácido ascórbico é necessário *in vivo* como cofator de várias enzimas, sendo a mais impressionante propriedade química do

ascorbato, a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons), participando ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E. A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), um importante antioxidante não-enzimático, é considerado o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares atuando na proteção contra a lipoperoxidação. A vitamina A tem pouca ação antioxidante e é incapaz de agir sobre o oxigênio singlete, mas seu precursor, o  $\beta$ -caroteno, é o mais eficiente ligante desta forma reativa de oxigênio encontrada na natureza e pode agir como antioxidante. Existe ainda, uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reativas do oxigênio nos sistemas biológicos como, por exemplo, a ubiquinona, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal. Além destes, há vários nutrientes essenciais de origem mineral, que participam do processo antioxidante em associação com enzimas como, zinco, cobre, manganês, selênio e ferro (Halliwell & Gutteridge, 1989).

O mecanismo mais funcional que retira as ROS em plantas inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), a peroxidase de ascorbato (APX) e a catalase (CAT) (Willekens, *et al.*, 1997; Bowler *et al.*, 1992). O balanço entre a atividade da SOD e da APX ou da CAT nas células, é crucial para determinar o nível do “estado de equilíbrio” de radicais superóxidos e peróxidos de hidrogênio (Bowler *et al.*, 1992). Esse balanço, juntamente com o seqüestro de íons metálicos, é extremamente importante na prevenção da formação do aumento de radicais tóxicos via metal dependente da reação de Haber-Weiss ou reações de Fenton.

A diferente afinidade da APX (faixa de  $\mu\text{M}$ ) e da CAT (faixa de mM) para  $\text{H}_2\text{O}_2$  sugere que estas enzimas pertencem a duas classes distintas. No que concerne à retirada de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , APX pode ser responsável pela modulação fina da sinalização para ROS, enquanto CAT pode ser responsável pela remoção do excesso de ROS durante o estresse. Os modos de ação dessas enzimas são essencialmente diferentes. A catalase catalisa a dismutação de duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até água e oxigênio molecular, enquanto a APX usa substratos para reduzir  $\text{H}_2\text{O}_2$  até água. A enzima APX tem maior afinidade por  $\text{H}_2\text{O}_2$  do que a catalase, porém, a catalase tem um  $V_{\text{máx}}$  mais elevado (Asada, 1992).

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) tem papel fundamental na defesa do organismo contra as espécies reativas de oxigênio, pois atua na remoção do radical superóxido. A SOD dependente do cobre-zinco (SOD Cu/Zn )

é muito estável e parece estar presente em praticamente todas as células eucarióticas (plantas ou animais) (Halliwell & Gutteridge, 1989). A SOD Cu/Zn presente nos eucariotos tem massa molecular de 32.000 Da e é constituída de duas subunidades protéicas idênticas, com um átomo de cobre e um de zinco em cada uma delas. O cobre sofre oxidações e reduções alternadas durante a dismutação do superóxido, enquanto o zinco atua na estabilização da proteína. A SOD Cu/Zn, a forma citoplasmática da SOD, tem sido localizada, também, em cloroplastos e suas propriedades têm sido marcadamente resistentes às pressões seletivas, podendo-se distinguir a enzima obtida de fungos, plantas, aves e mamíferos com facilidade (Fridovich, 1977). As SODs Fe são tipos de SODs encontradas em cloroplastos de plantas e algas, podendo formar dímeros ou tetrâmeros. Os átomos de ferro e manganês atuam de forma semelhante ao átomo de cobre, na ciclagem redox para a dismutação do  $O_2^{\bullet -}$ . As superóxido dismutases dependente do manganês (SODs Mn), são proteínas mitocondriais, presentes tanto em animais como em plantas. Elas formam homotetrâmeros cuja massa molecular é de 40.000 Da contendo manganês nos seus sítios ativos (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Com relação à inibição das diferentes formas de SOD, pode-se afirmar que as isoformas dependentes de Cu/Zn são inibidas pelo cianeto e por  $H_2O_2$  em concentrações acima de  $10 \mu M$  (Fridovich, 1977), enquanto a SODs Mn não são inibidas nas mesmas condições, sendo resistentes ao KCN e ao  $H_2O_2$ . As SODs dependentes de Fe são resistentes a cianeto, porém, são inibidas por  $H_2O_2$  (Droillard *et al.* 1990). Por dados bioquímicos e imunológicos, localizações subcelulares alternativas foram propostas para algumas SODs. Atividades de SOD Mn e SOD Cu/Zn foram demonstradas em peroxissomos de ervilha e melancia, respectivamente (Scandalios, 1993).

Enquanto a maioria dos organismos possui apenas uma isoforma de cada classe, as SODs de plantas são codificadas por pequenas famílias gênicas. Em *Arabidopsis*, um cDNA foi identificado para SOD Mn (*MSD1*), três para SOD Fe (*FSD1 A FSD3*) e mais três para SOD Cu/Zn cloroplástica (*CSD1 a CSD3*). Em tabaco, dois genes (*Sod A1* e *Sod A2*) codificam isoformas mitocondriais, porém, apenas um gene foi isolado para SOD Fe (*SodB*), um para SOD Cu/Zn cloroplástica (*SodCp*) e um terceiro para SOD Cu/Zn citossólica (*SodCc*) (Khanna-Chopra *et al.*, 2004). Em milho, nove genes distintos codificam SODs:

*Sod1*, *Sod2*, *Sod3*, *Sod4* e *Sod5* codificam isoformas dependentes de Cu/Zn, sendo SOD-1 de localização cloroplástica e as outras, isoformas citosólicas. Em arroz, cinco genes ou cDNAs foram identificados e estudados (Khanna-Chopra *et al.*, 2004). Em *Chenopodium murale*, seis isoformas de SOD foram identificadas (SOD I a SOD VI) sendo que a SOD V demonstrou estabilidade após uma extração por dez minutos em temperatura de ebulição e foi identificada como uma SOD Cu/Zn cloroplástica. Nesse mesmo trabalho, acima da temperatura de 60 °C ocorreu o aparecimento de uma nova isoforma de SOD com alta mobilidade eletroforética (Khanna-Chopra *et al.*, 2004).

Tecidos de eixos embrionários parecem ser inábeis para sintetizar (ou ativar) a superóxido dismutase após a embebição, e a cadeia de reações de radicais livres poderá ser descontrolada e os danos do envelhecimento serão complexos. O aumento da superóxido dismutase pode representar um método de recuperação de efeitos deletérios de armazenamento: a recuperação pode não ser possível se as sementes forem excessivamente envelhecidas (Villiers and Edgcumbe, 1975).

Uma das mais importantes enzimas antioxidantes é a catalase (oxirredutase  $H_2O_2:H_2O_2$ , CAT, EC 1.11.1.6), uma enzima tetramérica presente em todos os organismos aeróbicos, protegendo esses organismos contra os efeitos tóxicos do  $H_2O_2$  e outras espécies reativas do oxigênio (Scandalios, 1969). A enzima, como um todo, apresenta quatro subunidades idênticas, cada uma com massa molecular aproximadamente de 56-60 kDa (Guan & Scandalios, 1993). A atividade catalítica desta enzima pode ser inibida por superóxido, azida, cianeto de hidrogênio (HCN), não sendo, entretanto, inibida por outros íons cianetos (CN<sup>-</sup>). No entanto, o inibidor mais usado é o aminotriazol. Com relação ao pH, pode-se observar uma diminuição da atividade da enzima abaixo de pH 4,0. Na faixa de pH 4,0 a 8,5, a atividade da catalase permanece constante (Halliwell & Gutteridge, 1989).

As catalases (CATs) são proteínas amplamente distribuídas nos organismos vivos, estando presentes em bactérias, alguns eucariotos inferiores, fungos, animais e vegetais (Orendi *et al.*, 2001). A principal localização subcelular destas proteínas são os peroxissomos. As CATs de plantas (contrastando com os animais, que possuem apenas uma isoforma de CAT), são constituídas por uma família gênica pequena de três membros, fato esse inicialmente demonstrado em milho e, posteriormente, em tabaco (Havir e McHale, 1989; Willekens *et al.*, 1997),

algodão (Ni *et al.*, 1991), *Arabidopsis* (Frugoli *et al.*, 1996; McClung *et al.*, 1987) e arroz (Iwamoto *et al.*, 1998). As CATs foram estudadas mais extensivamente em milho (Scandalios, 2002), onde três genes, *Cat1*, *Cat2* e *Cat3*, codificam três isoformas distintas CAT-1, CAT-2 e CAT-3. As CAT-1 e CAT-2 foram localizadas no citosol, em glioxissomos e peroxissomos, enquanto CAT-3 possui localização mitocondrial. Dentro do glioxissomo, CAT catalisa a decomposição tóxica do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido como resultado da oxidação de ácidos graxos (Beevers, 1979).

O efeito da atividade de catalase glioxissomal em eixo embrionário e endosperma na germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L., cv. Hale) foi examinado. Nesse estudo com sementes de mamona, a remoção do eixo embrionário levou ao decréscimo máximo da atividade da catalase em estrato de células livres do endosperma (Mullen *et al.*, 1995). No escutelo de sementes de milho, a expressão gênica da catalase foi caracterizada, como escutelo crescendo á temperatura normal (25 °C) e em elevadas temperaturas (35 e 40 °C). Temperaturas altas reduziram a atividade da enzima catalase nesse tecido e ocorreu a expressão de três isoenzimas da CAT. A drástica redução da germinação e altura das plântulas crescendo em temperatura elevada sugere que o impedimento do desenvolvimento e o excessivo estresse oxidativo podem ter sido causados pela inibição do produto gênico *Car 1* que regula os níveis de transcrição do gene *Cat 2* que codifica para a isoforma CAT-2. Nesse experimento, Scandalios e seus colaboradores observaram que o decréscimo na atividade da enzima CAT-2 foi atribuído ao decréscimo da atividade da isoenzima CAT-2. A expressão de cada gene de catalase em milho ocorre em tecidos e estágios específicos do desenvolvimento. O gene *Cat1* é expresso durante o início da germinação e desenvolvimento da semente e somente uma isoenzima é expressa no pólen. O gene *Cat2* é expresso em sementes maduras e no início do desenvolvimento esporofítico. A isoenzima CAT-2 é detectada na semente seca e aumenta dramaticamente durante os primeiros 3 dias no escutelo de sementes na pós-germinação. Por outro lado, a isoenzima CAT-1 decresce gradualmente sua atividade depois do início da germinação enquanto os níveis de CAT-3 são extremamente baixos (Scandalios *et al.*, 1997; Scandalios *et al.*, 2002).

Em girassol, por manipulação da germinabilidade das sementes com tratamento de envelhecimento acelerado e controle de embebição, foi observado que a germinação está estritamente relacionada com a atividade da catalase

(Bailly *et al.*, 1998, 2000, 2001, 2002). Adicionalmente, observou-se que esta enzima realiza um papel durante a dessecação da semente pela prevenção de danos oxidativos relacionados à desidratação, e que o  $H_2O_2$  pode realizar um papel de regulação da expressão gênica da CAT e da via de transdução de sinal de desidratação. Outras enzimas antioxidativas como a SOD e a redutase da glutaciona também estão presentes em sementes de girassol, porém, elas não têm papel importante na germinação (Bailly *et al.*, 2000, 2002).

Além da catalase, os seres vivos possuem vias adicionais de remoção de  $H_2O_2$  – as peroxidases. As peroxidases reduzem peróxidos celulares a partir de substratos redutores. As plantas possuem dois tipos de heme-peroxidases: as não específicas, secretadas no espaço extracelular (POX, EC 1.11.1.7) e as ascorbato peroxidases (Foyer & Noctor, 2000). Ascorbato peroxidase (APX), que catalisa o primeiro passo do ciclo da ascorbato-glutaciona (Foyer & Noctor, 2000), é a mais importante peroxidase que detoxifica  $H_2O_2$  em plantas. Essa enzima tem sido encontrada em cloroplastos (Asada, 1992), mitocôndrias e peroxissomos (Mittova *et al.*, 2003). Estas enzimas são heme-peroxidases cujo grupo prostético é a protoporfirina. Elas possuem alta especificidade para o ascorbato como substrato redutor, sendo inibidas por cianeto e azida. As APXs catalisam a redução de  $H_2O_2$  a água e, juntamente com as CATs, são responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio a água. As APXs foram imunolocalizadas no citosol, membranas de peroxissomos e glioxissomos e nos cloroplastos (Foyer & Noctor, 2000; Foyer e Noctor, 2003). O nível de atividade da APX foi investigado em plântulas de arroz (*Oriza sativa* L.) tratadas a 42 °C por 24 horas. Nesse trabalho, resultados revelaram que a atividade da APX foi alta, enquanto que a atividade da catalase nessas mesmas condições decresceu, revelando que a APX nessas condições exerce o papel de proteção antioxidativa em detrimento do declínio da atividade da catalase (Sato *et al.*, 2001).

Em sementes de algodão envelhecidas artificialmente, a atividade de várias enzimas como as peroxidases de ascorbato, dismutases de superóxidos e catalase decresceram progressivamente durante o curso do envelhecimento (Goel *et al.*, 2003). O estudo do efeito do envelhecimento acelerado na germinabilidade em sementes de duas cultivares de amendoim foi relatado. O envelhecimento acelerado foi promovido pela incubação das sementes a 45 °C e 79% de umidade em câmara fechada por 3, 6 e 9 dias. Os resultados indicaram

que o envelhecimento acelerado inibiu a germinação e o estabelecimento de plântulas. Ocorreu um aumento na peroxidação de lipídios e decréscimo na atividade da SOD e da CAT (Sung & Jeng, 1994).

Nossos objetivos nesse trabalho são: (1) Determinar a relação entre os sistemas antioxidantes enzimáticos SOD, CAT e APX e a perda de vigor de sementes de feijão caupi; (2) Avaliar se esses sistemas enzimáticos antioxidantes são eficientes contra danos que possam induzir a perda de vigor.

É importante citar que há poucos relatos na literatura sobre a relação entre perda de vigor e sistemas antioxidantes em sementes de feijão caupi. Dessa forma, objetivamos também que nossos resultados sejam eleitos colaboradores adicionais no esclarecimento dessas relações.

## **4.2.MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1.Material Vegetal**

Nesse trabalho foram utilizadas sementes de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.),Walp.], cultivar Pitiúba e cultivar Pérola, disponíveis no Banco de Germoplasma do Departamento de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

### **4.2.2.Envelhecimento Artificial**

Sementes previamente selecionadas e desinfetadas foram distribuídas e incubadas em caixas “gerbox” em câmara de envelhecimento acelerado por 72 h. Uma parcela dessas sementes não foi incubada na câmara, estabelecendo-se o controle, ou seja, 0 h de envelhecimento artificial.

A câmara de envelhecimento artificial utilizada em nosso experimento é da marca ELO'S; 220V e apresenta duas divisões: uma interna superior e outra externa inferior, as quais foram preenchidas respectivamente com 3L e 7L de água destilada. Uma combinação de 45 °C com 99% de U.R., no escuro (que foi regulada 24 h antes do início do experimento), foi preestabelecida na câmara para o processo de envelhecimento artificial das sementes (Delouche & Baskin, 1973). Foram coletadas porções de sementes em 24 h, 48 h e 72 h de

envelhecimento. Uma parte dessas sementes foi imediatamente utilizada em testes e análises e outra parte foi congelada em nitrogênio líquido e mantida a -83 °C.

#### **4.2.3.Extração das enzimas do estresse oxidativo**

Sementes do controle e sementes envelhecidas artificialmente por 24, 48 e 72 h de ambas as cultivares (Pitiúba e Pérola) foram utilizadas para extração de enzimas do estresse oxidativo. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e a cada 1 g de massa fresca macerado nessas condições, foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM pH 7,0 adicionado de 1,0 mM de EDTA, 1,0 mM de ácido ascórbico (Beauchamp & Fridovich, 1971). Os extratos foram imediatamente centrifugados a 13 000 x g, a 4 °C por 15 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado imediatamente para análises ou foi armazenado em freezer -83 °C.

#### **4.2.4.Dosagem de Proteínas**

A quantificação de proteínas foi avaliada segundo o método de Bradford (1976). A concentração de proteínas foi estimada em relação a uma curva padrão de albumina sérica bovina.

#### **4.2.5.Atividade total de peroxidases de ascorbato (APXs)**

A atividade de APX foi determinada de acordo com o método de Nakano & Asada (1981), modificado por Koshiha (1993). O método consiste na diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio do meio pela APX do extrato bruto, com a redução de ácido ascórbico fornecido. Alíquotas de 100 µL dos extratos diluídos foram transferidas para tubos de ensaio. Ao meio de reação, 2,7 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,8 mM de ácido L-ascórbico P.A. foi adicionado. O experimento foi iniciado no momento da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de reação, observando o decréscimo da leitura, no intervalo de 0-120 segundos (realizados a cada 30 segundos), da absorbância de 290 nm em

espectrofotômetro. Adicionalmente, leituras de tubos controles, com e sem a amostra, na ausência de peróxido de hidrogênio, foram realizadas. Para efeito de cálculo, foi considerado que o decréscimo de 1 unidade de absorvância equivale a 1 unidade de atividade (UA). As atividades do extrato total foram determinadas pelo cálculo da quantidade de extrato que reduzirá a leitura de absorvância em 1 UA e expressos em UA g<sup>-1</sup> MS min<sup>-1</sup>.

#### **4.2.6. Atividade total de dismutase de superóxidos (SODs)**

A atividade enzimática da SOD foi determinada segundo metodologia adaptada de Peixoto (1999) a partir de Del Longo *et al.* (1993) e Gianopolitis & Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (p-nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD é considerada como a quantidade de enzima necessária para obter 50 % de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático. Para tanto, os extratos de sementes controle e tratadas foram descongelados em banho de gelo ( $\pm 4$  °C) e após liquefação, diluídos (conforme necessidade) no próprio tampão de extração. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram transferidos para tubos de ensaios, protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 0,075 mM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 0,002 mM de Riboflavina e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada por uma lâmpada fluorescente circular de 30 Watts, durante um período de 15 minutos. Em seguida, leituras de absorvância a 560 nm foram obtidas em espectrofotômetro. Foram considerados como brancos da reação, os tubos sem extrato, expostos e não expostos à luz. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50% da redução de NBT e expressa em UA g<sup>-1</sup> MS min<sup>-1</sup>.

#### **4.2.7. Atividade total da Catalase (CAT)**

A atividade da catalase foi determinada em extratos de sementes controle e tratadas pela adição de 100  $\mu$ L do extrato enzimático a 2,9 mL de uma solução

contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e pela medição da diminuição da absorvância a 240nm, a 30 °C (Havir & Mchale, 1987). A atividade da enzima foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### **4.2.8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (PAGE-SDS)**

Para eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS), uma alíquota de 20 µL de cada amostra controle e derivatizada foi adicionada a 20 µL do tampão da amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6.8 adicionado de glicerol, SDS 10% e B. Blue). Um sistema de dois géis foi usado nas seguintes condições: concentração: 12,5% (main gel) e 5% (stacking gel); Programa: 250V, 40 mA, 20 W; durante 1h e trinta minutos, usando o tampão de corrida Tris 0,025 M/ Glicina 0,192M, pH 8,3 com SDS 10%. Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas em uma solução contendo metanol 50% e ácido acético 10% por 30 minutos e, em seguida, foram coradas com *Comassie brilliant blue* R-250 0,025% em ácido acético 10%: metanol 40% em água por 2 h. O descoramento foi feito por 2 h numa solução de ácido acético 10%: metanol 40% em água (Laemmli, 1970).

#### **4.2.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições nativa**

Para eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência de SDS, uma alíquota de 20 µL de cada amostra controle e derivatizada foi adicionada a 20 µL do tampão da amostra (Tris/HCl 0,5M pH 6.8 adicionado de glicerol, SDS 10% e B. Blue). Um sistema de dois géis foi usado nas seguintes condições: concentração: 12,5% (main gel) e 5% (stacking gel); Programa: 250 V, 40 mA, 20 W; durante 1h e trinta minutos, usando o tampão de corrida Tris 0,025M/ Glicina 0,192M, pH 8,3 adicionando água em substituição ao SDS. Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas em uma solução contendo metanol 50% e ácido acético 10% por 30 minutos e, em seguida, foram coradas com *Comassie brilliant blue* R-250 0,025% em ácido acético 10%: metanol 40% em água por 2 h. O

descoloramento foi feito por 2 h numa solução de ácido acético 10%: metanol 40% em água (Laemmli,1970).

#### **4.2.10.Géis de atividade enzimática**

Para a visualização de isoformas de SOD, CAT e APX, proteínas das amostras foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida a 10%, 7,5% e 7,5%, respectivamente, com o tampão Tris-glicina (Tris 25 mM glicina 192 mM pH 8,3).

Para a visualização de isoformas de CAT (Scandalios,1997), os géis foram incubados por 30 minutos numa solução aquosa contendo 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O excesso de peróxido foi removido por lavagens sucessivas em água. A seguir, o gel foi incubado em solução de revelação (FeCl<sub>3</sub> 1%, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 1%). As bandas acromáticas de atividade catalásica foram rapidamente visualizadas em um fundo verde-azul escuro.

Para a visualização de isoformas de SOD (Beauchamp e Fridovich, 1971), os géis foram incubados no escuro, a 37 °C, por 20 minutos, na solução de revelação (riboflavina 0,04 mg/mL, NBT (p-nitro-blue-tetrazólio) 0,1 mg/mL, EDTA 0,2 mM em tampão Tris/HCl 0,05 M pH 8,3). As bandas de atividade da superóxido dismutásica no fundo azul-violeta escuro foram reveladas por exposição à luz intensa. A reação é baseada na redução de NBT por radicais superóxido gerados pela foto-oxidação da riboflavina.

Para a visualização de isoformas de APX, os géis foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,4 adicionado de ascorbato 4 mM e peróxido de hidrogênio 4 mM. As bandas foram reveladas em uma solução de ferrocianeto [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] 0,1% e cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) 0,1% em 0,125 N de HCl (Scandalios, 1997).

#### **4.2.11.Diferenciação de isoformas da SOD**

Os tipos de SOD foram diferenciados pela suas atividades em géis nativos, previamente incubados por 20 minutos, a 25 °C, em tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7, 8, contendo 3 mM de KCN ou 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Salin & Lyon, 1983).

Após a incubação, a revelação foi feita segundo Beauchamp & Fridovic (1971). (Ver item 4.2.8.).

#### 4.2.12. Desenho de peptídeo da catalase

O desenho do peptídeo da catalase teve como estratégia fundamental à identificação de uma região de aminoácidos conservada em catalases de planta para a produção de um anticorpo capaz de reconhecer diferentes isoformas da catalase em *V. unguiculata*.

Nesse contexto, foi feito um alinhamento de várias isoformas da catalase usando espécies mono e dicotiledôneas (Figura A). Esse alinhamento revelou a região conservada de 13 resíduos de aminoácidos NH<sub>2</sub>-RGFAVKFYTREGN-COOH obedecendo as seguintes características:

- 1- Apenas 3 aminoácidos hidrofóbicos: 2 resíduos de F (fenilalanina) e 1 resíduo de V (valina);
- 2- A análise do peptídeo através do BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) não revelou homologia com outras proteínas, bem como apresentou divergência com as catalases de origem animal;
- 3- A análise de perfil de antígeno através do programa “antigen profiler” (<http://www.openbiosystems.com/antibodies>) indicou que esse peptídeo apresentava excelente antigenicidade.

Arabidopsis Cat3	IRGFAVKFYTREGNFDLVGNNTPVFFIRDGIQFPDVVHALKPNPKTNIQEYWRILDYMSH 178
Tomate Cat1	IRGFAVKFYTREGNFDLVGNVPPVFFNRDAKSPDTIRALKPNPKSHIQENWRILDFFSF 178
Soja Cat4	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFVRDGMKFPDMVHALKPNPKNHIQENWRILDFFSH 178
V. radiata Cat	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFVRDGMKFPDMVHALKPNPKNHIQENWRILDFFSH 178
Ervilha	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFVHDGMNFPDMVHALKPNPKQTHIQENWRILDFFSH 178
Soja Cat1	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFVRDGLKFPDMVHALKPNPKSHIQENWRILDFFSH 178
Soja Cat3	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFVRDGLKFPDMVHALKPNPKSHIQENWRILDFFSH 178
Arabidopsis Cat2	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFIRDGMKFPDMVHALKPNPKSHIQENWRILDFFSH 178
Tomate Cat2	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFIRDGMKFPDMVHALKPNPKSHIQENWRVLDFFSH 178
Arabidopsis Cat1	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFVRDGMKFPDMVHALKPNPKSHIQENWRILDFFSH 178
Milho Cat1	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFIRDGMKFPDMVHVFKPNPKTNLQENWRIVDFFSH 178
Milho Cat2	PRGFAVKFYTREGNFDLVGNLNPVFFIRDGIKFPDMVHALKPNPKRTHIQENWRILDFFSH 177
Milho Cat3	PRGFAVKFYTREGNFDLLGNLNPVFFIRDGIKFPDVIHAFKPNPKRSHVQEYWRVDFLSH 180
	*****:***:*** ***** :* . *** ::*:****::*: **:*:*

**Figura A-** Alinhamento das seqüências de aminoácidos de isoformas da catalase de Arabidopsis (Cat1 - Q96528; Cat2 - P25819; Cat3 - Q42547), Tomate (Cat1 - M93719; Cat2 - AF112368), Soja (Cat1 - P29756; Cat3 - O48560; Cat4 - O48561), *V. radiata* (Cat - P32290), Ervilha (Cat - X60169) e Milho (Cat1- X60135; Cat2 - X54819; Cat3 - P18123). Em azul esta representada a região conservada utilizada para síntese do peptídeo sintético.

(O peptídeo foi produzido pela Invitrogen numa escala de síntese de 5 mg e pureza de 70%.)

#### 4.2.13. Preparação de Anticorpos

Para a produção de anticorpos, foi utilizado um coelho albino da raça Nova Zelândia de 4 meses de idade. A quantidade de 7mg do peptídeo sintético de catalase foram dissolvidos numa mistura com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 7,0 e 1,5 mL de adjuvante completo de Freud. A solução foi homogeneizada até que, uma emulsão que não se dispersava quando uma gota dela era colocada na superfície de uma solução salina, foi formada. Esta emulsão foi dividida em duas partes iguais que foram aplicadas via intramuscular na região interna das coxas do coelho. Após 15 dias, uma outra injeção nessas mesmas condições foi aplicada no coelho, sendo feita, instantes antes da aplicação, uma coleta do sangue. Após mais duas semanas procedeu-se outra coleta de sangue. Após as coletas, o sangue foi incubado a 37 °C por 30 minutos, para permitir a coagulação. O soro foi separado do coágulo por centrifugação a 1000 x g por 20 minutos. Após sua preparação o soro foi estocado a -20 °C.

#### 4.2.14. Western Blot

A transferência eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi feita de acordo com o método descrito originalmente por Towbin *et al.* (1979), utilizando uma unidade de transferência Techwave fabricado pelo Sigma-Aldrich. O sistema de tampão utilizado na transferência (Tris 25 mM/glicina 192 mM/ metanol 20%, pH 8,3) também foi aquele descrito por Towbin *et al.* (1979). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose (Hybond™ - ECL™ fabricado pela Amersham Biosciences), foi mergulhada numa solução de Ponceau S, para corar as proteínas ligadas na membrana. Esta solução foi preparada (diluição 1:10) a partir de uma solução estoque com a seguinte composição: 2 g de Ponceau S, 30 g de ácido tricloroacético, 30 gramas de ácido sulfossalicílico em um volume final de 100 ml com água destilada. Após identificação e marcação com caneta das posições dos padrões de pesos moleculares, os sítios de ligação para as imunoglobulinas na membrana de nitrocelulose foram bloqueados. Isto foi feito mergulhando-se as membranas numa solução a 10% (em tampão fosfato 0,1 M/NaCl 0,13M, pH 7,4) de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) sob agitação "over night". Decorrido este tempo, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana incubada com o anticorpo específico contra a proteína de interesse. O anticorpo foi utilizado na diluição de 1:500 com a solução bloqueadora a 5%. A incubação foi feita à temperatura ambiente sob agitação lenta por 1h. Após cinco lavagens sucessivas com 50 ml de tampão fosfato 0,1 M/NaCl 0,13 M pH 7,4, cada uma com cinco minutos de duração e, sob agitação lenta, a membrana foi incubada por 1h, sob agitação lenta, com IgG anti-cabra diluída 1:5000 numa solução bloqueadora produzida em coelho, conjugada com a enzima fosfatase alcalina. Finalmente, após 5 lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a membrana foi submetida a um coramento, utilizando uma pastilha do substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT). Este substrato é convertido pela fosfatase alcalina num composto de cor azul escuro. A membrana de nitrocelulose coberta com a solução do substrato, deixada sob agitação lenta e monitorada até que as bandas alcançassem a intensidade desejada (usualmente

menos de 2 minutos), quando então a membrana foi transferida para água destilada para parar a reação.

#### **4.12.15. Extração de RNA Total**

As extrações de RNA total serão realizadas com o reagente Concert® Plant RNA (Invitrogen Inc.). Esse reagente fornece amostras de RNA total altamente purificadas, livres de interferentes como compostos fenólicos e carboidratos, ideal para reações de RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction). Para isso 100 mg de sementes envelhecidas artificialmente serão macerados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo e adicionados a tubos de microcentrífuga contendo 0,5 mL do referido reagente. Os tubos serão homogeneizados e deixados deitados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, uma centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos será realizada. Ao sobrenadante serão adicionados 0,1 mL de NaCl 5M e 0,3 mL de clorofórmio. Após uma nova centrifugação a 12.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C, a fase aquosa (fase superior) será transferida para um novo tubo, precipitada com um volume igual de isopropanol e deixada em repouso por 10 minutos. Após uma nova centrifugação (12.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C) o sobrenadante será descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. O precipitado será então dissolvido em um volume de 30 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato, inibidor de RNAses). Para estimar a concentração das amostras de RNA total, uma alíquota do extrato total será diluída em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC e será realizada a leitura da absorbância a 260 nm. O cálculo utilizado para estimar a concentração de RNA será o seguinte: [RNA] = 40 µg/mL x Fator de Diluição x Leitura da Absorbância a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989; Romano, 1998).

#### **4.12.16. Eletroforese de RNA em condições não-desnaturantes**

Para verificar a integridade e qualidade do RNA extraído, uma eletroforese em gel de agarose a 1% em condições não-desnaturantes será realizada. Neste tipo de eletroforese, é observada a presença dos RNA ribossômicos **26S** e **18S**, além de alguns RNA mensageiros de maior tamanho. Pela observação das bandas correspondentes a estes rRNAs se tem uma idéia da qualidade do RNA

extraído. No entanto, essa verificação é apenas qualitativa, com o único objetivo de avaliar a extração realizada. As eletroforeses de RNA em gel de agarose serão realizadas segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Em resumo, a quantidade de agarose 0,5 g será adicionada a 50 mL de tampão TBE (Tris-Ácido Bórico 0,045 M, EDTA 0,001 M). Após ser completamente fundida, a mistura será resfriada a 50°C e o brometo de etídio adicionado, a partir de uma solução estoque de 10 mg/mL, em água, de maneira que sua concentração final seja de 0,25 µg/mL. O gel permanecerá em repouso a temperatura ambiente até a sua completa solidificação (15 a 20 minutos). As amostras a serem submetidas à corrida eletroforética serão previamente diluídas em uma solução de azul de bromofenol 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v), preparada em tampão TE (Tris-HCl 1 M / EDTA 0,5 M, pH 8,0), nas concentrações anteriormente citadas. O gel será submerso em tampão TBE, com o brometo de etídio na concentração final anteriormente citada. As amostras serão, então, aplicadas ao gel e a corrida eletroforética será realizada a uma voltagem constante de 100V. Encerra-se a corrida quando o azul de bromofenol visualizado percorrer mais de 2/3 do comprimento do gel. O gel será visualizado em um transluminador de raios ultravioleta – UV e o RNA observado pela fluorescência do brometo de etídio quando exposto aos raios UV.

#### **4.12.17. Síntese da primeira fita de cDNA**

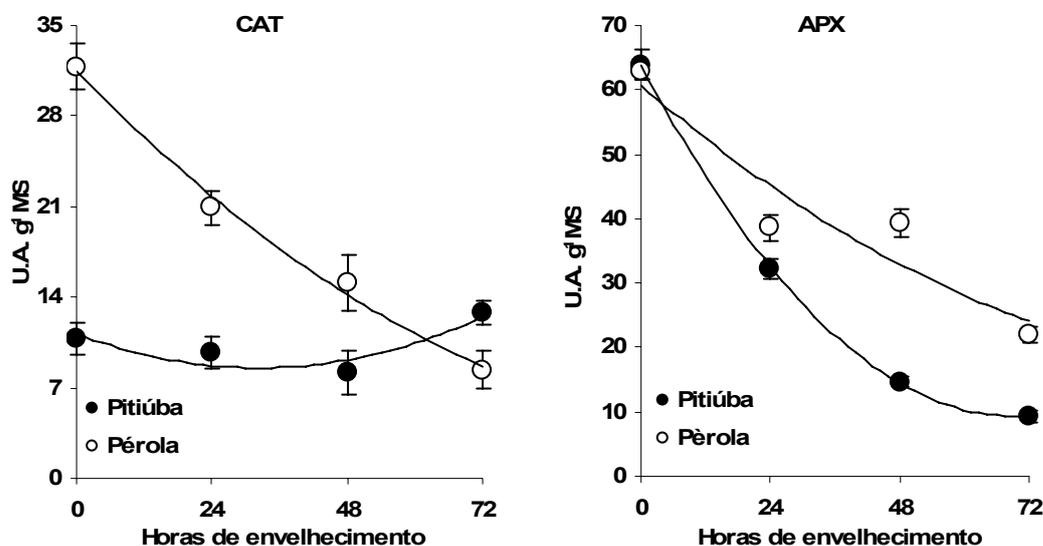
Para a síntese da primeira fita de cDNA, uma alíquota das amostras de RNA total, contendo aproximadamente 10 µg serão transferidas para microtubos de 200 µL. Posteriormente, as alíquotas serão incubadas a 70 °C por 10 minutos e transferidas para o gelo. Ao RNA desnaturado será adicionado o tampão RT 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM e DTT 10 mM – fornecido junto com a transcriptase reversa de MMLV), 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 µM dos iniciadores não específicos Oligodeoxirribonucleotídeo T (Oligo-dT, 18 mer.) e em seguida, os tubos serão deixados à temperatura ambiente, durante 5 minutos, para a etapa de anelamento dos iniciadores. 200 U da enzima transcriptase reversa MMLV e as amostras serão colocados em um termociclador por 37 °C durante uma hora (Masmoudi *et al.*, 2001; Baier *et al.*, 2000). Em seguida, as amostras de cDNA serão colocadas a -80 °C e

posteriormente analisadas por eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente.

#### **4.12.18. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos**

A expressão de diferentes genes da catalase e ascorbato peroxidase identificados em *Vigna unguiculata* será em seguida avaliada pela amplificação do cDNA obtido como substrato e oligonucleotídeos específicos determinados para cada gene identificado. As misturas dos reagentes para a PCR serão realizadas em tubos de 0,2 ml, específicos para PCR, da Axygen Scientific (USA). As reações de amplificação serão realizadas em um volume de 25 µl contendo Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dATP, dCTP, dGTP e dTTP 100 µM cada um, Oligonucleotídeo 5 µmoles e 1,25 U Taq DNA polimerase. A cada tubo será acrescentada uma quantidade de 250 a 500 ng de cDNA e acrescido um volume de água estéril para se obter um volume final de 50 µl por reação. Será acrescentado, além das amostras testadas, um tubo que continha todos os elementos citados com exceção do cDNA, para fins de controle negativo do experimento. As amostras serão colocadas em um termociclador, com programação de temperaturas de desnaturação (94 °C), anelamento (entre 45 e 55 °C, dependente do tamanho e conteúdo G+C do iniciador utilizado) e uma etapa de extensão final a 72 °C. Uma otimização das reações será realizada para cada par de iniciadores. Para confirmar a amplificação do cDNA das referidas enzimas, uma eletroforese em gel de agarose a 1% será realizada como descrito no item anterior, onde se poderá realizar uma análise qualitativa da expressão dos mRNA das referidas enzimas.

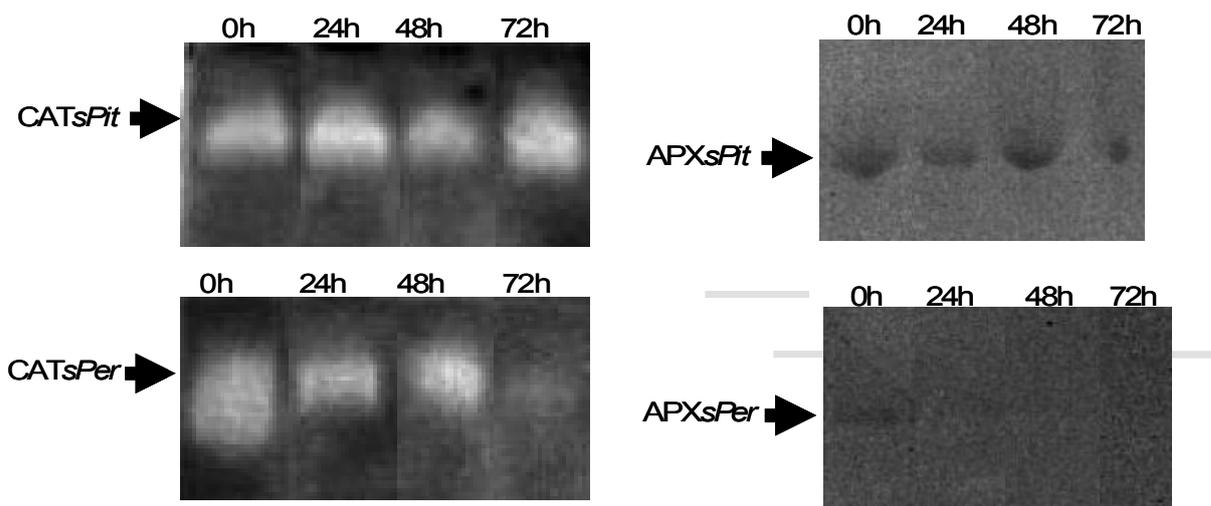
### 4.3. RESULTADOS



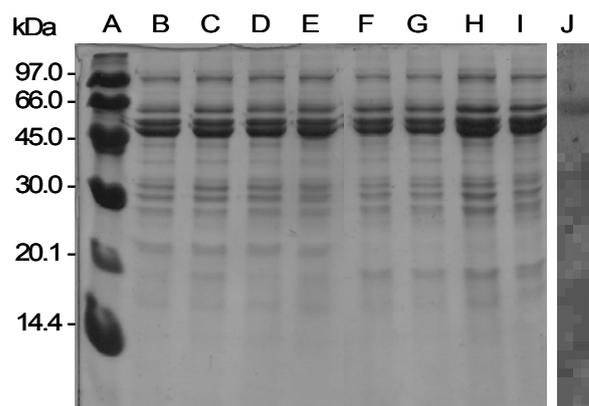
**Figura 4.1.** Atividade de catalase (CAT) e peroxidase de ascorbato (APX) em sementes de feijão caupi (cv. Pitiúba e cv. Pérola) envelhecidas artificialmente por 72 h.

Houve um decréscimo significativo na atividade total da CAT em sementes da de Pérola envelhecidas artificialmente, enquanto que, em sementes de Pitiúba, a atividade da catalase durante o tratamento manteve-se próximo ao nível do controle (Figura 4.1.). Interessantemente, a atividade total da APX decresceu significativamente em sementes de Pitiúba acompanhando a curva do decréscimo de sua atividade em sementes de Pérola (Figura 4.1.). Esses resultados foram corroborados satisfatoriamente pelos da análise de zimograma de APX e CAT (Figura 4.2.). O zimograma de catalase de sementes de Pitiúba envelhecidas artificialmente revelou uma isoforma dessa enzima que aumentou sua atividade discretamente em 24 h, diminuiu discretamente em 48 h e aumentou significativamente em 72 h de tratamento. A análise de zimograma de catalase de sementes de Pérola também revelou uma isoforma dessa enzima. No entanto, nessa cultivar, a atividade dessa isoforma de CAT decresceu significativamente ao longo do tratamento, caindo drasticamente em 72 h. Adicionalmente, a análise de zimograma de peroxidase de ascorbato em sementes de Pitiúba revelou uma isoforma que teve sua atividade diminuída em 24 h, aumentada discretamente em

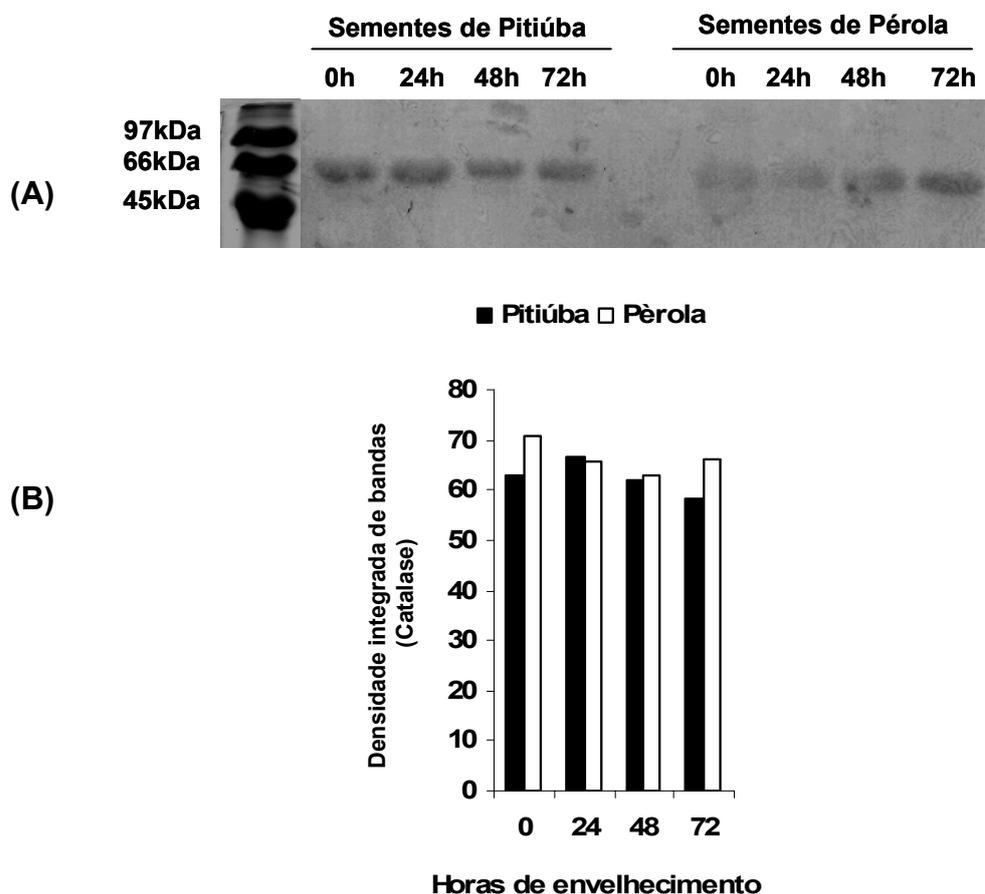
48 h, e reduzida significativamente em 72 h de tratamento. Também em sementes tratadas de Pérola, análise de zimograma de APX revelou uma única isoforma cuja atividade caiu drasticamente a partir de 24 h de tratamento. (Figura 4.2.).



**Figura 4.2.** Zimogramas de catalase e peroxidase de ascorbato de sementes de feijão caupi envelhecidas artificialmente. Isoforma de catalase de sementes da cv. Pitiúba (CATsPit) e da cultivar Pérola (CATsPer); Isoforma de peroxidase de ascorbato de sementes da cv. Pitiúba (APXsPit) e de sementes da cv. Pérola (APXsPer).



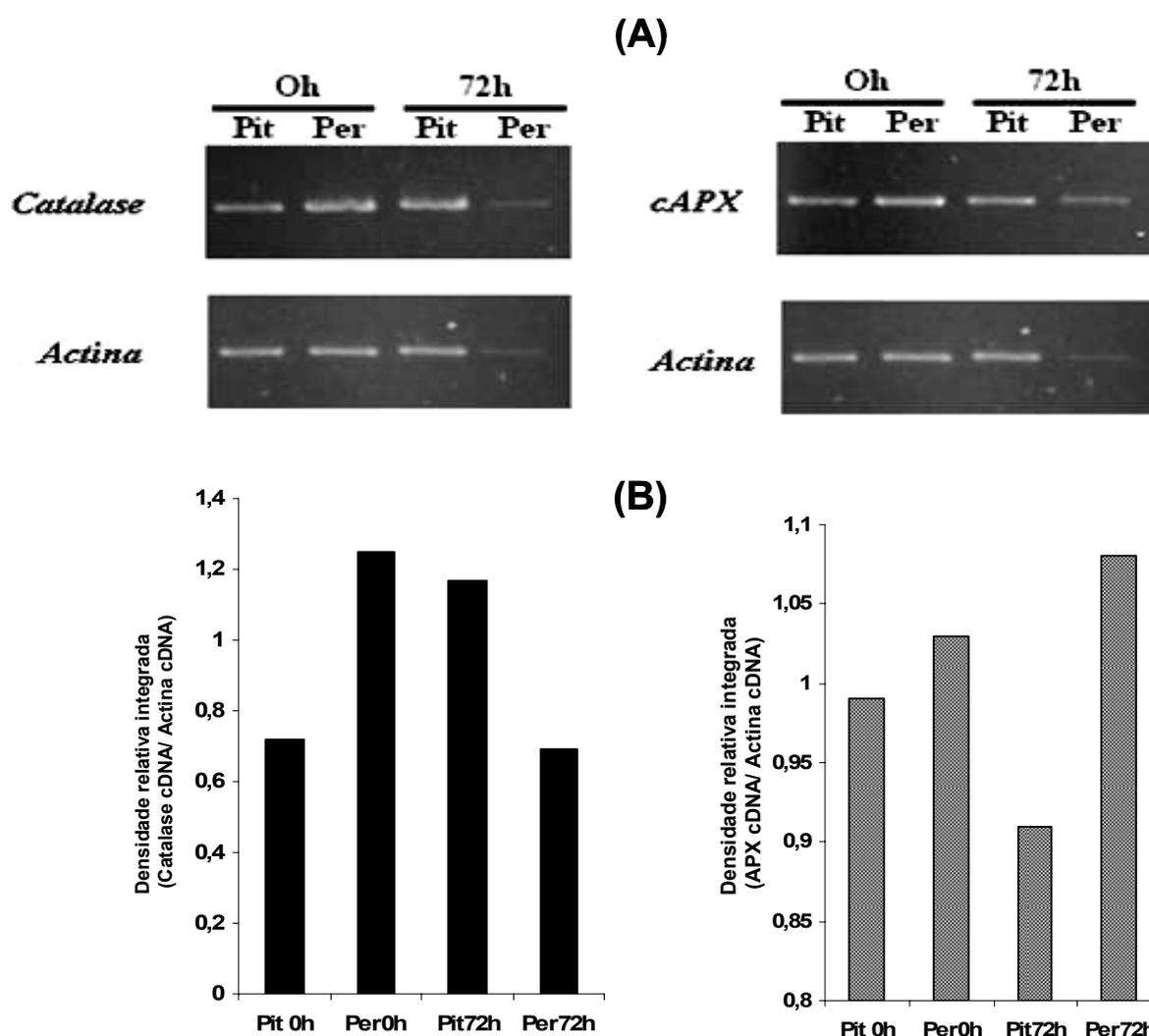
**Figura 4.3.** SDS-PAGE (A- I) e imunoblot (J) de catalase de proteínas de sementes de feijão caupi envelhecidas artificialmente por 72 h. Amostras de sementes da cv. Pitiúba: B- controle; C- 24 h; D-48 h; E- 72 h de tratamento. Amostras de sementes da cv. Pérola: F- controle;G-24 h; H-48 h; I -72 h de tratamento.



**Figura 4.4.** Análise de imunoblot de catalase de sementes de duas cultivares de feijão caupi envelhecidas artificialmente por 72 h. (A) Gel de imunoblot. Foram aplicados 20  $\mu$ L de proteína total de sementes de Pitiúba e Pérola em cada um dos poços. (B) Medida da

intensidade de bandas de catalase usando a *Scion Image-Release beta 3b software* (Scion Corporation, USA). (Costa et al., 2006).

Em teste de imunoensaio, uma única subunidade de catalase de aproximadamente 66 kDa foi revelada por western blot, tanto em sementes da cv. Pérola quanto em sementes da cv. Pitiúba em todos os tempos de exposição de envelhecimento artificial. A densidade integrada das bandas de CAT foi determinada usando a *Scion Image-Release beta 3b software* (Scion Corporation, USA). (Figuras 4.3. e 4.4.). (COSTA et al., 2006).

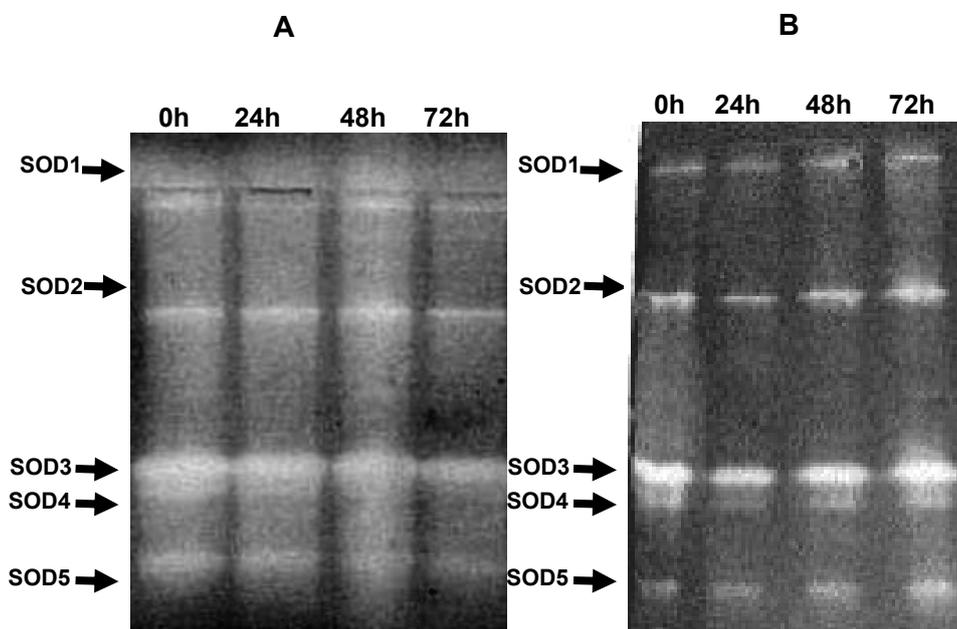


**Figura 4.5.** Análise de transcritos de CAT e APX em sementes de duas cultivares de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), Pitiúba e Pérola, após 72 h de envelhecimento artificial. **(A)** Produtos de RT-PCR de CAT, APX e actina em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. **(B)** Quantidade relativa de transcritos de CAT e APX obtida da

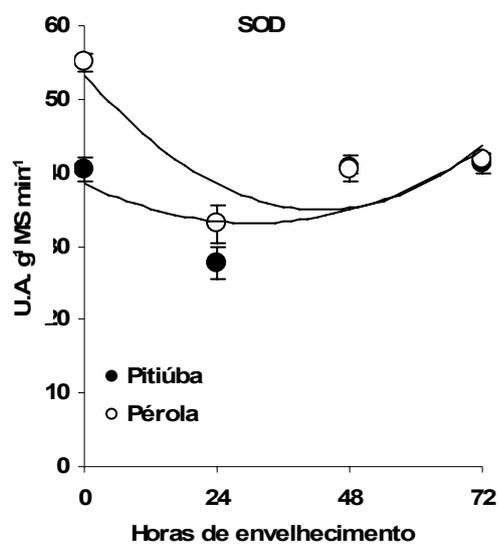
densidade relativa integrada de bandas de cDNA de catalase, cDNA de peroxidase de ascorbato e cDNA de actina.

Adicionalmente, análise de RT-PCR de CAT e APX em sementes envelhecidas artificialmente de ambas as cultivares (Pitúba e Pérola) foi realizada, utilizando sementes do controle e sementes coletadas após 72 h de tratamento. A quantidade relativa de transcritos de CAT e APX foi obtida pela densidade relativa integrada de bandas de cDNA de catalase, cDNA de peroxidase de ascorbato e cDNA de actina (Costa et al.,2006).

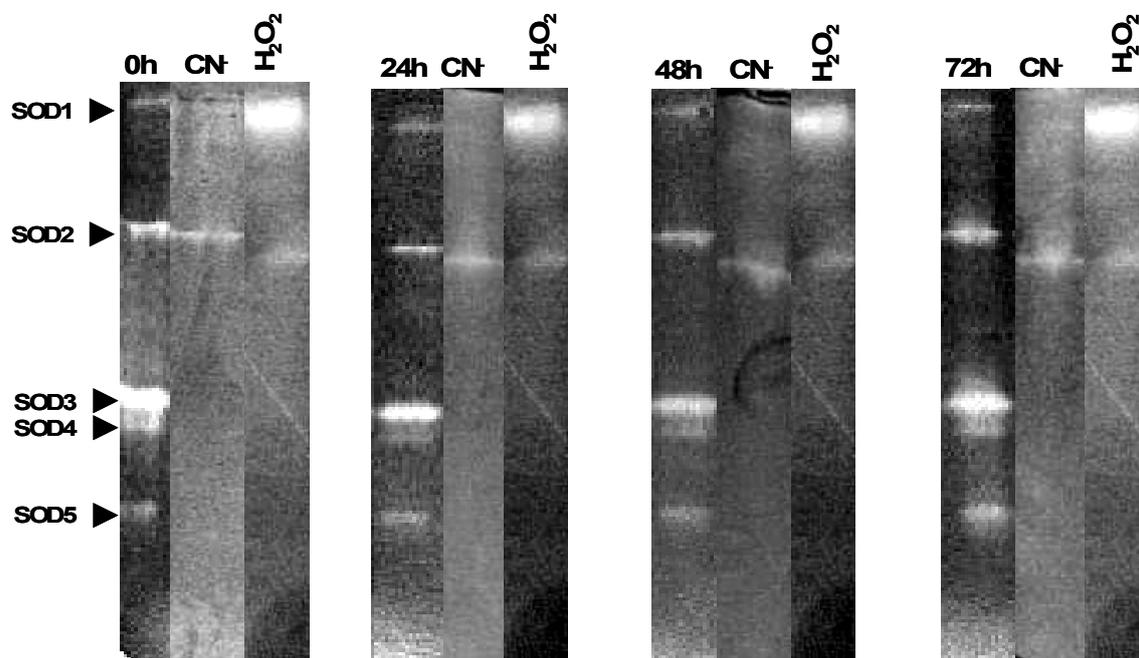
Não houve alteração significativa na atividade total da SOD em sementes das cultivares Pérola e Pitiúba ao longo do tratamento de envelhecimento artificial. Esses resultados corroboram com os de análise de zimograma de SOD em sementes envelhecidas de ambas as cultivares, onde não houve diferença significativa no padrão isoenzimático da SOD ao longo do tratamento. A análise de zimograma revelou cinco isoformas (SOD1, SOD2, SOD3, SOD4 e SOD5) em sementes de ambas as cultivares. Interessantemente, tanto em sementes da cv. Pérola, quanto em sementes da cv. Pitiúba, uma banda maior de SOD (SOD3) foi detectada durante todos os tempos de tratamento. (Figuras 4.6 e 4.7).



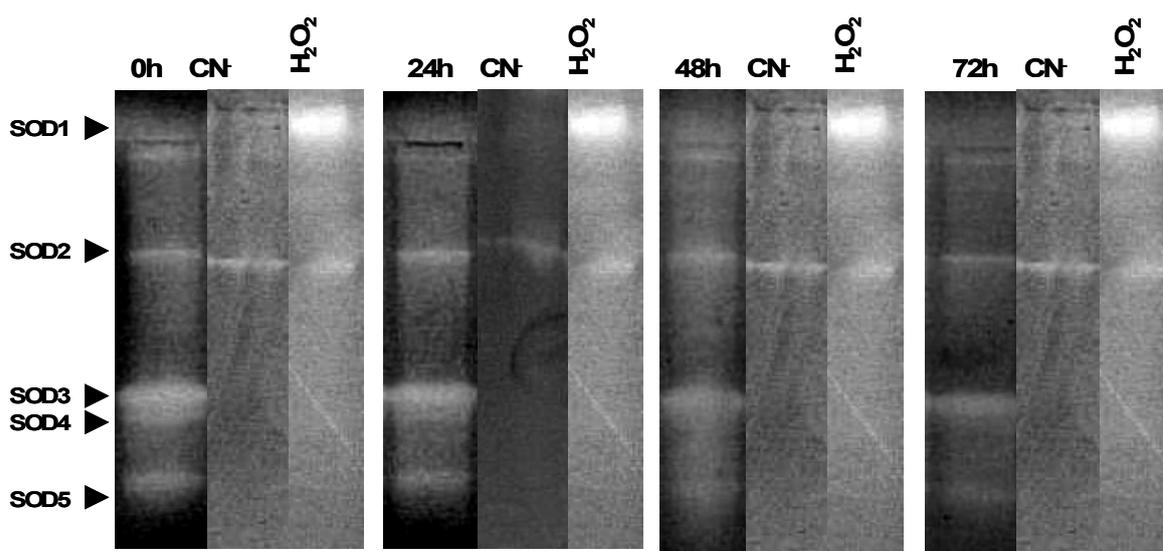
**Figura 4.6.** Isoformas de SODs de sementes da cv. Pérola (A) e da cv. Pitiúba (B) envelhecidas artificialmente por 72 h. As isoformas foram numeradas de acordo com a migração eletroforética (SOD1, SOD2, SOD3, SOD4 e SOD5). A SOD3 revela uma maior atividade no controle e em todos os tempos do tratamento.



**Figura 4.7.** Atividade de SOD de sementes de feijão caupi (cv. Pérola e cv Pitiúba) envelhecidas artificialmente por 72h.



**Figura 4.8.** Diferenciação de isoformas de SOD de sementes de Pitiúba envelhecidas artificialmente por 72 h. SOD1 e SOD2 – SOD Mn; SOD3, SOD4 e SOD5 – SOD Cu/Zn.



**Figura 4.9.** Diferenciação de isoformas de SOD de sementes de Pérola envelhecidas artificialmente por 72 h. SOD1 e SOD2 – SOD Mn; SOD3, SOD4 e SOD5 – SOD Cu/Zn.

Estudos de inibição de isoformas de SOD em sementes envelhecidas artificialmente de ambas as cultivares, usando KCN 3mM ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM foram realizados. Em sementes de Pérola e Pitiúba submetidas ao tratamento, em todos os tempos de exposição, dentre essas cinco isoformas verificadas, as que não foram afetadas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram identificadas como SOD Mn (SOD1 e SOD2) e as sensíveis ao KCN (cianeto) como SOD Cu/Zn (SOD3, SOD4 e SOD5). (Figuras 4.8.e 4.9.).

#### 4.6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O vigor de um lote de sementes não é determinado por uma característica em particular, mas por um conjunto delas associados ao desempenho das sementes (Perry,1981). Dessa forma, vários testes de vigor têm sido propostos e relatados (Woodstock,1973; McDonald,1975; Vieira *et al.*,1994). Adicionalmente, parece ser pouco provável que um único teste: germinativo, fisiológico ou bioquímico, seja apropriado sob todas as condições, mesmo para uma única espécie (Hampton & Coolbear,1990; Marcos Filho,1994; Marcos Filho *et al.*,1990).

A indústria de sementes exige decisões rápidas, referentes ao manejo durante a colheita, recepção, processamento, armazenamento e comercialização, de modo que a necessidade de redução do período destinado à avaliação fisiológica das sementes, é considerada uma prioridade para a pesquisa (Custódio 2005).

Adicionalmente, é sabido que um número de processos metabólicos acompanha a perda da viabilidade durante o envelhecimento. Dessa forma, o uso do envelhecimento acelerado de sementes como modelo biológico experimental tem sido adequadamente adaptado para a determinação da potencial adequação de lotes de sementes para longos períodos de armazenamento. O estresse pela combinação de alta temperatura e umidade que causam efeitos deletérios em biomoléculas levando ao aumento gradual da perda de viabilidade e conseqüente morte de sementes, tem sido relacionado a radicais livres, levando a hipótese que a atividade de enzimas removedoras de radicais livres, SOD, CAT e APX tem

uma relação direta com a germinabilidade de sementes envelhecidas. Na ausência ou estado de inativação de enzimas removedoras de radicais livres e antioxidantes, produtos de degradação de peroxidação de lipídios acumulam na senescência de sementes, resultando finalmente na completa perda de vigor e da viabilidade das sementes (Kalpana and Madhava Rao, 1994; Sung and Jeng, 1994; Bailly et al., 1996; Rao et al., 2006).

Em nosso estudo, analisamos a relação entre a perda de vigor e viabilidade de sementes envelhecidas com a eficiência da atividade antioxidante de sistemas enzimáticos SOD, CAT e APX em duas cultivares contrastantes de feijão caupi. Nossos resultados revelaram que, somente uma das cultivares usada em nossos estudos (Pitiúba) mostrou boa germinabilidade após o tratamento de envelhecimento artificial. Até as 72 h de tratamento, não houve efeito perceptível sobre a percentagem de germinação na cultivar Pitiúba, como também não houve resultados significativos no vazamento de eletrólitos, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas. Por outro lado, o tratamento de envelhecimento artificial induziu uma queda drástica no percentual de germinação, um aumento significativo na condutividade elétrica, na peroxidação de lipídios e na oxidação de proteínas em sementes de Pérola submetidas ao envelhecimento (capítulo 2, figuras 2.4, 2.5 e 2.7; capítulo 3, figuras 3.1. e 3.3.).

SOD é considerada uma enzima chave na regulação intracelular da concentração de radicais superóxidos e peróxidos. Ela remove superóxidos, resultando em conseqüente decréscimo do perigo da formação de radical hidroxila via reação Haber-Weiss (Gutteridge and Halliwell, 1990). Estudos relatam que o aumento da atividade de superóxido dismutase pode representar um método de recuperação de efeitos deletérios do armazenamento de sementes, porém, essa recuperação não é possível se as sementes forem excessivamente envelhecidas (Villiers, 1975). No presente trabalho, não houve alteração da atividade da SOD em sementes de ambas as cultivares submetidas ao envelhecimento artificial (figura 4.6.). Adicionalmente, por análise de zimograma, foram reveladas cinco isoformas de SOD (SOD1 a SOD5) em sementes de ambas as cultivares submetidas ao tratamento de envelhecimento artificial (figura 4.7.). Essas bandas de atividade foram designadas de SOD1 a SOD5, correspondendo à migração das cinco isoformas do anodo ao catodo. Uma

isoforma com maior intensidade tanto no controle, como em todos os tempos de envelhecimento artificial, denominada SOD3 foi revelada em sementes de ambas as cultivares. Em sementes de Pitiúba, a isoforma SOD3 revelou uma maior intensidade a 72 h de tratamento. Estudos de inibição com KCN 3mM ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM em sementes expostas ao envelhecimento artificial de ambas as cultivares revelaram que SOD1 e SOD2 são SOD Mn e SOD3, SOD4 e SOD5 são SOD Cu/Zn. Em plantas superiores, SOD Cu/Zn é considerada a mais abundante SOD que ocorre nos cloroplastos, citosol, peroxissomos e glioxissomos e, SODMn em mitocôndrias e peroxissomos (Alscher *et al.*, 2002).(Figuras 4.8. e 4.9.). O aumento da atividade da SOD3 a 72 h de pode estar relacionado ao aumento da CAT em de sementes de Pitiúba a 72 h de exposição ao envelhecimento artificial (figuras 4.2. e 4.6.). O efeito combinado do aumento de SOD e CAT pode ter levado a diminuição do estresse oxidativo e a manutenção do vigor de sementes da cv. Pitiúba.

Estudo de atividade enzimática revelou que, em sementes da cv. Pérola envelhecidas artificialmente, a atividade total de APX e de CAT diminuiu significativamente ao longo do tratamento (Figura 4.1.). Contrariamente, em sementes da cv. Pitiúba, não houve mudanças significativas na atividade total da CAT, ocorrendo, no entanto, um aumento significativo de sua atividade em 72 h. Por outro lado, a atividade da APX em 72 h de tratamento decresce significativamente. Resultados similares foram reportados em estudo do envelhecimento artificial de sementes de amendoim (Sung and Jeng, 1994), ervilha (Kalpana and Madhav Rao 1994), girassol (Bailly *et al.*, 1996), milho doce (Chang and Sung 1998) e algodão (Goel, 2003). Adicionalmente, os resultados de análise de zimograma mostraram que as enzimas APX e CAT estabeleceram um “cross-talk” em sementes da cv. Pitiúba durante o processo de envelhecimento artificial (Figura 4.2.). A conjunção desses resultados sugere que o sistema antioxidante em sementes da cv. Pitiúba é eficiente, podendo ser eleito como uma das prováveis justificativas da resistência da cv. Pitiúba as condições estabelecidas para o envelhecimento artificial nesse trabalho. Contrariamente, em sementes da cv. Pérola, esse sistema antioxidante revelou-se ineficiente, sendo apontado como uma provável causa ou conseqüência da perda da viabilidade nessa cultivar.

Análise de imunoblot em sementes artificialmente envelhecidas de ambas cultivares revelou uma subunidade de aproximadamente 66 kDa, presente no controle e em todos os tempos de exposição ao envelhecimento, sem alterações significativas em sua intensidade ao longo do tratamento (Figuras 4.4.). Em ensaio de detecção de oxidação de proteínas (oxyblot), foi revelada em sementes de Pérola, uma banda com sinal mais intenso com massa aproximada de 66 kDa a 72 h de exposição ao envelhecimento artificial (capítulo 3, figura 3.3.). Essa verificação conjunta nos leva a sugerir que, a subunidade protéica oxidada pode ser da catalase.

Relacionando nossos resultados de germinabilidade, condutividade elétrica, oxidação de lipídios e proteínas e atividade de catalase, sugerimos que, deve haver uma estreita relação entre a estrutura do tegumento da semente, o conteúdo de água, danos de membranas e a atividade da catalase em um ambiente que combina alta temperatura e umidade relativa. Guan *et al.*, (2000) reportaram que o gene Cat 1 de milho responde ao estresse osmótico e Bailly *et al.* (2001) também mostraram que a atividade da catalase aumenta durante o estresse hídrico de sementes de feijão. Adicionalmente, foi deduzido ao longo de nossos experimentos que, o tegumento de sementes da cv. Pérola parece ser muito mais sensível a meio úmido do que o tegumento de sementes da cv. Pitiúba, pois, sementes da cv. Pérola têm uma velocidade de embebição significativamente mais alta do que a velocidade de embebição de sementes da cv. Pitiúba (resultados de trabalhos que estão sendo desenvolvidos com sementes de feijão caupi no LABPLANT, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará). Dessa forma, a combinação de alta temperatura e umidade relativa deve induzir mais facilmente danos de membranas em sementes da cv. Pérola do que em sementes da cv. Pitiúba. Essa hipótese é corroborada com os resultados de percentual de germinação, vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios citados e discutidos nos capítulos 2 e 3 desse trabalho. As conseqüências bioquímicas de deterioração de membranas são profundas. Ocorre perda do controle de soluto, alta desordem do sistema de membranas e dispersão de enzimas (Stewart and Bewley, 1980).

Análise de transcritos por RT-PCR em sementes tratadas por 72h revelou que a expressão de CAT foi aumentada em Pitiúba e diminuiu em Pérola, ocorrendo o oposto em relação à expressão de APX (figura 4.5.). Estes resultados corroboram os obtidos para as atividades destas enzimas, indicando fortemente que a expressão em nível de RNAm e a atividade diferencial de CAT e APX nas cultivares analisadas está envolvida com o processo de envelhecimento. Enquanto CAT é induzida durante o envelhecimento de sementes de Pitiúba, parecendo exercer um papel protetor, APX é mantida em sementes de Pérola e pode cumprir papel similar, pelo menos até 24 h de tratamento. Curiosamente, não houve modificação drástica da expressão de CAT e APX em nível de proteína, mostrando que a renovação das populações destas enzimas não necessariamente sincroniza a síntese dos RNAm com a síntese e a degradação das respectivas proteínas.

Em conclusão, danos oxidativos em lipídios e proteínas estão estreitamente relacionados com o envelhecimento das sementes de feijão caupi. As sementes de Pitiúba se mostraram mais resistentes aos danos oxidativos induzidos por envelhecimento que as de Pérola. A resistência de sementes de Pitiúba frente ao envelhecimento está relacionada à expressão e à atividade de catalase, indicando que esta enzima exerce algum papel protetor contra os danos oxidativos nessa cultivar.

#### 4.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDERSON,J.A.Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. **Scientia Horticulturae**, v.95, p.277-284, 2002.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase – scavenging enzyme in plants. **Physiology Plantarum**, v.85, p. 235-241, 1992.

BAILLY,C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU,F.; COÛME,D. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p.646±652,1988.

BAILLY,C.; BENAMAR,A.; CORBINEAU,F.; COĂME,D. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed Science Research**, v.10, p. 35±42, 2000.

BAILLY,C.; AUDIGIER, C.; LADONNE,F.; WAGNER, M.H; COSTE, F.; CORBINEAU, F.; COĂME, D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, v. 357, p.701±708, 2001.

BAILLY, C.; BOGATEK-LESZCZYNSKA, R.; COĂME, D.; CORBINEAU, F. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. **Seed Science Research**,v. 12, p.47±55, 2002.

BAIER, M.; NOCTOR, G.; FOYER, C. H. & DIETZ, K. J. Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. **Plant Physiol**, v.124, p. 823-832, 2000.

BEZERRA, I. C. Análise de RNA pela Técnica de Northern Blot, In: Brasileiro, A. C. M. & Carneiro, V. T. C. (eds): **Manual de Transformação Genética de Plantas**, chap 15. Brasília, v., p. 223-238,1998.

BASU, R.N. An appraisal of research on wet and dry physiological seed treatments and their applicability with special reference to tropical and sub-tropical countries. **Seed Sci Technol**, v. 22, p. 107–126,1994.

BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p.276-287,1971.

BEEVERS, H. Microbodies in higher plants. **Annu. Rev Plant Physiol**, v.30, p. 159-193.1979

BIEKMANN S.; FEIERABEND, J. Subcellular distribution, multiple forms and development of glutamate-pyruvate (glyoxylate) aminotransferase in plant tissues. **Biochim Biophys Acta**, v.,p. 721: 268-279,1982.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 43, p. 83–116,1992.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p. 248–254, 1976.

CHANG, S.M.; SUNG, J.M. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. **Seed Sci Technol**, v.26, p. 613-626,1998.

CHHETRI, D. R.; RAI, A. S.; BHATTACHARJEE, A. Chemical manipulation of seed longevity of four crop species in an unfavourable storage environment. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, n. 2, p. 269-300,1993.

COSTA,J.H.; JOLIVET,Y.; MARIE-PAULE HASENFRATZ-SAUDER; ORELLANO,E.G.; LIMA,M.G.S.; DIZENGREMEL,P.; MELO,D.F. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance,**Journal of Plant Physiology**,v.,p.,2006.

DELOUCHE, J.C., BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Sci Technol** v.1, p. 427±452, 1973.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, C. A.; PASTORI, G. M. & TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought, **Plant Cell Physiology**, v. 4, p.1023-1028,1993.

DROILLARD, M. J., PAULIN, A. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and in peroxisomes isolated from petals of carnation during senescence. **Plant Physiol**, v.94, p. 1187-1192,1990.

FOYER,C.,H.; NOCTOR,G. Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. **Review New Phytol**, v.146, p.359±388, 2000.

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

FRIDOVICH. Superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** v. 44, p. 147–159, 1977.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, T.L. M.A.; THOMAS, C.R. MCCLUNG.Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, **Plant Physiol** v.112, p327–336,1996.

GIANNOPOLITIS, C. N. & RIES, S. K. Superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314,1977.

GOEL, A; AJAY GOEL, K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton( *Gossypium hirsutum*L.) seeds. **J Plant Physiol**, v.160, p. 1093–1100, 2003.

GUAN,L.; SCANDALIOS, J.G. Characterization of the Catalase antioxidant defense gene *Cat1* of maize, and its developmentally regulated expression in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, v.3, p. 537-536, 1993.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**, v.,p. 543,1989.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, v.,p.,2000.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO<sub>2</sub>. **Plant Physiol**, v. 89, p. 952–957, 1989.

HAVIR, E.A.; MCHALE,N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves, **Plant Physiol**, v.84, p. 450-455,1987.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v.3, p. 141-153, 1993.

HUANG, A.H.C.; TRELEASE, R.N.; MOORE, T.S. Plant Peroxisomes. **Academic Press**, New York,v.p., 1983.

IWAMOTO, M.; MAEKAWA, M.; SAITO, H. ; HIGO, H.; HIGO, K. Evolutionary relationship of plant catalase genes inferred from exon-intron structures: isozyme divergence after the separation of monocots and dicots, **Theor. Appl. Genet**, v.97, p.9 –19, 1998.

KALPANA, R.; MADHAVARAO, K.V. Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seeds of pigeon pea( *Cajanas cajan* (L.) Millsp.) cultivars.**Seed Sci Technol**, v.22, p.253-260,1994.

KIM,So-Y; JEONG,Se-M; PARK,Woo-P; NAM,K.C.;AHN,D.U.;LEE,Seung-C. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extractes.**Food Chemistry**,v.97,p.472-479, 2006.

KHANNA- CHOPRA, R., SABARINATH, S. Heat-stable chloroplastic Cu /Zn superoxide dismutase in *Chenopodium murale*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 1187–1192, 2004.

KLAPHECK,S.; ZIMMER, I.; COSSE, H. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. **Plant Cell Physiol**, v.31,, p.1005-1037,1990.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant cell physiology**. Kyoto, v. 32, n.5, p.713-721, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*,v.p. 227:680,1970.

MAITY, S.; BANERJEE, G.; ROY, M.; PAL, C.; PAL, B.; CHAKRABARTI, D.; BHATTACHARJEE, A. Chemical induced prolongation of seed viability and stress tolerance capacity of mung bean seedlings. **Seed Sci Technol**, v. 28, p. 155–162, 2000.

MASMOUDI, K.; BRINI, F.; HASSAIRI, A. & ELLOUZ, R. Isolation and characterization of a differentially expressed sequence tag from *Triticum durum* salt-stressed roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.971-979, 2001.

MCCLUNG, C.R. Regulation of catalases in Arabidopsis. **Free Radical Biol. Med**, v.23, p. 489–496,1997.

MCDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Sci Technol**, v. 27, p. 177–237,1999.

MITTOVA, V., TAL, M. VOLOKITA, M. OUY, A. M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato specie *Lycopersicon pennellii*. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p. 845-856,2003.

MORI, H., HIGO, K.; HIGO, H.; MINOBE, Y.; MATSUI, H.; CHIBA, S. Nucleotide and derived amino acid sequence of a catalase cDNA isolated from rice immature seeds. **Plant Molecular Biology**,v.,p. 18: 973-976,1992.

MULLEN, R. T.;GIFFORD, D.J. Effect of the embryo axis on catalase in the endosperm of erminating castor bean seeds. **Plant Science**, v. 107, p. 177-187,1995.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant cell physiology**. Kyoto, v.22, n.5, p.867-880, 1981.

NI, W.;TRELEASE, R.N. Post-transcriptional regulation of catalase isozyme expression in cotton seeds. **Plant Cell**, v. 3, p. 737-744,1991.

ORENDI,G.; ZIMMERMANN,P. BAAR,C.;ZENTGRAF,U. Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. **Plant Science**, v.161,p.301-314, 2001.

PEIXOTO, P. H. P. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

POWELL, A. A.; YULE, L.J.; JING, H.C.; GROOT, S.P.C.; BINO, R.J.; PRITCHARD, H.W.The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. **J. Exp Botany**, v. 51, p. 2031–2043, 2000.

PRIESTLEY, D.A. Seed aging. Implications of seed storage and persistence in the soil. Ithaca: **Cornell University Press**,v.p.,1986.

RAGHURAMULU,Y.; PURUSHOTHAM, K. Effect of pre-storage and mid-storage treatments on the germinationof coffee seeds. **Journal of Coffee Research**, v. 21, n. 1, p. 42-51,1991.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. (eds.). EMBRAPA. Brasília, DF. **Manual de transformação genética de plantas**. v., p. 163 – 177,1998.

SALIN, M.L.;LYON, D.S. Iron containing superoxide dismutase in eukaryotes: localization in chloroplasts from water lily. **Oxy Radicals and their Scavenger System**, v. p. 344–347,1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.

SATO, Y., MURAKAMI,T. Heat -shock mediat APX gene expression and protection against chilling injury rice seedlings. **J. Exp Botany**, v. 151, p.52145,2001.

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in maize; a review. **Biochem. Genet.**,v.3,p. 37-79,1969.

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

SCANDALIOS, J.G.; Regulation and properties of plant catalases. In: Foyer Ch H, Mullineaux Ph M (eds) Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of **Defence Systems in Plants**, v.,p. 275-315,1994.

SCANDALIOS, J.G; GUA,N.L.; POLIDOROS, A.N. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. In:Scandalios JG, ed. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**. v.,p.,1997.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**.1997.

SCANDALIOS, J.G. ACEVEDO, A. RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Sci**, v. 156, p. 103–110,2002.

SCHMIDT,M.; FEIERABEND,J; Characterization of cDNA Nucleotide Sequences Encoding Two Differentially Expressed Catalase Isozyme Polypeptides from Winter Rye. *Plant Physiology*, v.,p.122: 1457, 2000.

STEWART, R.R.C.; BEWLEY, J.D. Lipid Peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes. *Plant Physiol.*, v.65,p.245-248,1980.

SUNG, J.M.; JENG, T.L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia Plantarum**, v. 91, p. 51-55,1994.

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; ARRIGONI, O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. **Physiol Plant**, v.105, p.193-198, 1999.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gell to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 76: 4350-4354, 1979.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C. VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. **EMBOJ**, v.16, p. 4806–4816, 1997.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. Testes de vigor em sementes. **FUNEP**, v., p. 164, 1994.

VILLIERS, T.A.; EDGCUMBE, D.J. On the cause of seed deterioration in dry storage. **Seed Sci Technol**, v.3, p.761-764, 1975.

#### 4.8. CONCLUSÕES GERAIS

- O envelhecimento de sementes está relacionado ao estresse oxidativo.
- No envelhecimento de sementes de feijão caupi há uma relação entre a estrutura do tegumento da semente, o conteúdo de água, danos em lipídios e proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes, CAT, SOD e APX.
- As atividades de enzimas removedoras de radicais livres, SOD, CAT e APX têm uma relação direta com a germinabilidade de sementes envelhecidas de feijão caupi.
- O estresse oxidativo está relacionado à perda do vigor e da viabilidade de sementes de Pérola.
- As sementes de Pitiúba se mostraram mais resistentes aos danos oxidativos induzidos por envelhecimento que as de Pérola.
- A expressão em nível de RNAm e a atividade diferencial de CAT e APX estão envolvidas com o processo de envelhecimento do feijão caupi.
- A resistência de sementes de Pitiúba frente ao envelhecimento está relacionada à expressão e à atividade de catalase, indicando que esta enzima exerce algum papel protetor contra os danos oxidativos nessa cultivar.