

Prof. Dr. Fernando Broetto
Dr. Edilson Ramos Gomes
MSc Thais Arruda Costa Joca
(Orgs.)

O Estresse das Plantas *Teoria & Prática*



O ESTRESSE DAS PLANTAS

TEORIA & PRÁTICA



CONSELHO EDITORIAL ACADÊMICO

RESPONSÁVEL PELA PUBLICAÇÃO DESTA OBRA

Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

Prof. Dr. GUSTAVO DA ROCHA DE CASTRO

© 2017 Editora UNESP
Cultura Acadêmica
Praça da Sé, 108.
01001- 900 - São Paulo, SP
Tel.: (0xx11) 3242-7171
Fax: (0xx11) 3242-7172
www.editoraunesp.com.br
feu@editora.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

O estresse das plantas [recurso eletrônico]: teoria & prática /
Organizadores Fernando Broetto, Edilson Ramos Gomes, Thais
Arruda Costa Joca. – São Paulo: Cultura Acadêmica, 2017

ePUB

ISBN: 978-85-7983-888-0 (recurso eletrônico)

1. Plantas - Metabolismo. 2. Plantas - Análise. 3. Estresse vegetal.
4. Análise foliar. 5. Botânica - Morfologia. 6. Desidratação (Hídrica).
I. Título. II. Broetto, Fernando. III. Gomes, Edilson Ramos. IV. Joca,
Thais Arruda Costa.

CDD 581.13

SUMÁRIO

SEÇÃO 1	10
PRINCIPAIS ESTRESSES EM PLANTAS	10
CAPÍTULO 1	11
A DEFICIÊNCIA HÍDRICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS PARA OS CULTIVOS AGRÍCOLAS	11
Roberta Daniela da Silva Santos; Marcela Caetano Lopes; Jéssica Maiara de Souza Ferrari; Josiane Turato da Silva Pereira; Ricardo de Lima Vasconcelos; Fernando Broetto.	11
1. Introdução.....	11
2. Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos de Plantas cultivadas sob Deficiência Hídrica	12
3. Deficiência Hídrica nas Culturas: Estudo de Casos	15
4. Deficiência Hídrica na Agricultura: Cenários Futuros	19
5. Referências Bibliográficas	20
CAPÍTULO 2	25
ESTRESSE MINERAL (MACRONUTRIENTES)	25
Breno Kennedy Lima Bezerra; Dávilla Alessandra da Silva Alves; Gabriel Henrique Germino; Jéssica de Lima; Leandro Bianchi; Fernando Broetto.....	25
1. Introdução.....	25
2. Nitrogênio (N).....	26
3. Fósforo (P).....	30
4. Potássio (K).....	31
5. Cálcio (Ca).....	35
6. Magnésio (Mg).....	37
7. Enxofre (S).....	39
8. Referências Bibliográficas	41
CAPÍTULO 3	47
ESTRESSE MINERAL (MICRONUTRIENTES)	47
Enrique Alonso Zuñiga; Renan Lima de Sousa; Luis Gomes; Adolfo Bergamo Arlanch; Fernando Broetto.	47
1. Introdução.....	47
2. Ferro (Fe).....	48
3. Cobre (Cu).....	50
4. Silício (Si).....	52
5. Molibdênio (Mo).....	54
6. Manganês (Mn).....	55
7. Boro (B)	57
8. Cloro (Cl).....	58
9. Referências Bibliográficas	59

CAPÍTULO 4	64
MECANISMOS MORFOLÓGICOS E METABÓLICOS EM VEGETAIS PARA ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE SALINO	64
Carla Verônica Corrêa; Thais Arruda Costa Joca; Michely da Silva Alves; Maria Vitória Barros Sifuentes; Angélica Lino Rodrigues; Fernando Broetto.....	64
1. Introdução.....	64
2. Decorrências das Elevadas Concentrações de Sais	65
3. Resistência à Salinidade e Mecanismos de Sobrevivência em Solos Salinos.....	67
4. Essencialidade do Sódio.....	72
5. Conclusões.....	73
6. Referências Bibliográficas	73
CAPÍTULO 5	78
ESTRESSE BIÓTICO EM PLANTAS	78
Dany Roberta Marques Caldeira; Tatiane Bortoletto Gomes da Silva; Túlio Barroso Queiroz; Antonio Higo Moreira de Sousa; Luz María Ruíz Machuca; Rafael dos Santos Lima; Fernando Broetto.....	78
1. Introdução.....	78
2. Mecanismos de Defesa das Plantas	79
3. Mecanismos Bioquímicos de Defesa (Enzimas Antioxidantes).....	81
4. Mecanismo de Defesa (Metabolismo Secundário).....	82
5. Considerações Finais.....	83
6. Referências Bibliográficas	83
CAPÍTULO 6	89
METABOLISMO ESPECIALIZADO	89
José Abramo Marchese; Adriano Suchoronczek; Eliane Carneiro; Cleiton Nicareta; José Carlos Cazarotto Madalóz; Marisa de Cacia Oliveira; Fernando Broetto.	89
1. Introdução.....	89
2. Fenóis.....	91
3. Terpenos.....	96
4. Alcalóides	104
5. Glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos	109
6. Referências Bibliográficas	114
SEÇÃO 2	123
PRINCIPAIS METODOLOGIAS PARA ESTUDO DE ESTRESSES EM PLANTAS ..	123
CAPÍTULO 7	124
DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS	124
Antonio Higo Moreira de Sousa; Dany Roberta Marques Caldeira; Luz María Ruíz Machuca; Rafael dos Santos Lima; Tatiane Bortoletto Gomes da Silva; Túlio Barroso Queiroz; Maria Vitória Barros Sifuentes; Fernando Broetto.	124
1. Introdução.....	124

2. Materiais Utilizados e Preparo das Soluções.....	126
3. Obtenção do Extrato.....	127
4. Obtenção da Curva Padrão.....	129
5. Análise dos Dados.....	130
6. Referências Bibliográficas	131
CAPÍTULO 8.....	133
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE HÍDRICO..	133
Edhielle Vanessa de Lima Soares; Jaqueline Pinheiro da Silva; Jéssica Karine Burim Cardoso; Renata Bruna dos Santos Coscolin; Fernando Broetto.....	133
1. Introdução.....	133
2. Referencial Teórico	134
3. Referências Bibliográficas	141
CAPÍTULO 9.....	146
COLETA DE MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO.....	146
Ricardo de Lima Vasconcelos; Roberta Daniela da Silva Santos; Marcela Caetano Lopes; Josiane Turato da Silva Pereira; Jéssica Maiara de Souza Ferrari; Dávilla Alessandra da Silva Alves; Fernando Broetto.....	146
1. Introdução.....	146
2. Preparo de Tampões.....	149
3. Métodos para Coleta de Amostras Vegetais (Folhas e outros Órgãos).....	150
4. Procedimentos e Extração de Enzimas em Tecidos Vegetais	152
5. Preparo de Soluções	154
6. Referências Bibliográficas	156
CAPÍTULO 10.....	157
ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE	157
Breno Kennedy; Gabriel Henrique Germino; Leandro Bianchi; Edilson Ramos Gomes; Dayanne Fabrício Bressan; Fernando Broetto.....	157
1. Introdução.....	157
2. Extração da Enzima Nitrato Redutase	158
3. Teste Enzimático.....	161
.....	163
4. Ensaio Enzimático	163
5. Detectando Possíveis Erros Durante a Análise.....	165
6. Curva Padrão de Nitrito (NO ₂).....	166
7. Referências Bibliográficas	167
CAPÍTULO 11.....	169
EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE PIGMENTOS FOLIARES.....	169
Renan Lima de Sousa; Adolfo Bergamo Arlanch; Edhielle Soares; Jéssica Karine Burim Cardoso; Jaqueline Pinheiro; Fernando Broetto.....	169

1. Introdução.....	169
3. Revisão Bibliográfica.....	170
4. Métodos de Extração de Pigmentos Foliares.....	173
4. Referências Bibliográficas	176
CAPÍTULO 12.....	177
CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA (CRA) E PERDA DE ELETRÓLITOS	177
Enrique Alonso Zuñiga; Luis Gomes; Jéssica de Lima; Edilson Ramos Gomes; Renata Bruna dos Santos Coscolin; Fernando Broetto.....	177
1. Introdução.....	177
2. Revisão Bibliográfica.....	178
3. Avaliação do Conteúdo Relativo de Água	180
4. Avaliação da Perda de Eletrólitos	182
5. Referências Bibliográficas	185
CAPÍTULO 13.....	187
UTILIZAÇÃO DO IRGA - ANALISADOR DE GASES POR INFRAVERMELHO PARA AVALIAÇÃO DE TROCAS GASOSAS EM PLANTAS: CHECK LIST DE PREPARAÇÃO.....	187
Diogo Capelin; Gabriel Silva Daneluzzi; Ricardo Ferraz de Oliveira; Dayanne Fabrício Bressan; Carla Verônica Corrêa; Thais Arruda Costa Joca; Michely da Silva Alves; Fernando Broetto.....	187
1. Introdução.....	187
2. Check List de Preparação do IRGA (Modelo LI-6400XT – Versão 6.3.2, Li-COR)....	189
3. Referências Bibliográficas	194

Prefácio

Esta obra é fruto da participação de alunos da disciplina *Fisiologia e Bioquímica do Estresse em Plantas*, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Ciências Agronômicas - FCA/UNESP – Campus de Botucatu. Houve ainda importante participação do Grupo de Pesquisa do Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira (ESALQ/USP – Campus de Piracicaba) que contribuiu com o Capítulo sobre trocas gasosas e análise de atividade fotossintética. Por fim, introduzimos um Capítulo sobre Metabolismo Especializado, organizado pelo Grupo do Prof. Dr. José Abramo Marchese, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus de Pato Branco. O livro foi dividido em duas partes, com referencial teórico na primeira Seção e concluindo com aspectos práticos do estudo de estresse. Buscou-se enfatizar técnicas para avaliação do impacto de diferentes modalidades de estresse sobre parâmetros metabólicos das plantas. Espera-se que este livro possa auxiliar alunos de diferentes níveis acadêmicos e outros profissionais em seus trabalhos que envolvam estudos em estresse vegetal.

Prof. Dr. Fernando Broetto

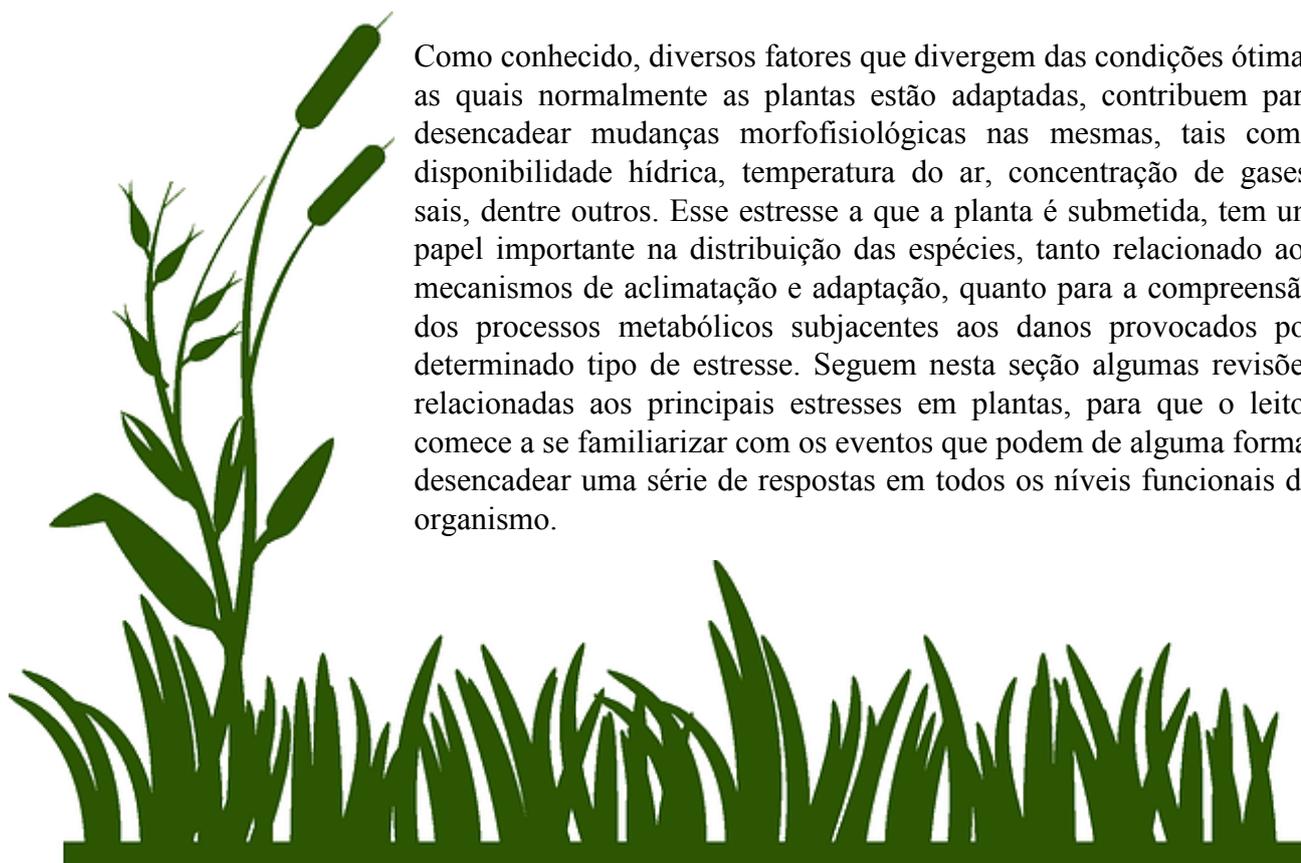
Dr. Edilson Ramos Gomes

MSc. Thais Arruda Costa Joca

(Orgs.)

SEÇÃO 1

PRINCIPAIS ESTRESSES EM PLANTAS



Como conhecido, diversos fatores que divergem das condições ótimas as quais normalmente as plantas estão adaptadas, contribuem para desencadear mudanças morfofisiológicas nas mesmas, tais como disponibilidade hídrica, temperatura do ar, concentração de gases, sais, dentre outros. Esse estresse a que a planta é submetida, tem um papel importante na distribuição das espécies, tanto relacionado aos mecanismos de aclimação e adaptação, quanto para a compreensão dos processos metabólicos subjacentes aos danos provocados por determinado tipo de estresse. Seguem nesta seção algumas revisões relacionadas aos principais estresses em plantas, para que o leitor comece a se familiarizar com os eventos que podem de alguma forma, desencadear uma série de respostas em todos os níveis funcionais do organismo.

CAPÍTULO 1

A DEFICIÊNCIA HÍDRICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS PARA OS CULTIVOS AGRÍCOLAS

ROBERTA DANIELA DA SILVA SANTOS; MARCELA CAETANO LOPES; JÉSSICA MAIARA DE SOUZA FERRARI; JOSIANE TURATO DA SILVA PEREIRA; RICARDO DE LIMA VASCONCELOS; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

A água é o recurso natural de maior presença na constituição das células vegetais, perfazendo entre 80 a 95% do peso, dependendo da espécie (KERBAUY, 2013). Assim suas propriedades tornam-se de caráter fundamental nos processos físicos, biológicos e químicos da planta. Contribui diretamente para a difusão de solutos, no desenvolvimento e sustentação dos tecidos vegetais. A quantidade de água pode variar de acordo com a fisiologia e tipo de célula de cada planta.

A transpiração está diretamente ligada à perda de água na planta para a atmosfera, através de partes que se encontram acima do solo, com maior contribuição das folhas, onde há presença de estômatos. A transpiração em excesso pode prejudicar o crescimento das plantas levando-as à desidratação. Assim como a baixa taxa fotossintética pode retardar o desenvolvimento celular (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

O fechamento estomático não previne somente a perda de água pelas folhas, mas também impede a entrada de dióxido de carbono, em casos de aumento na concentração do mesmo. A magnitude desta resposta varia muito de espécie para espécie, pois, a planta também produz uma fração de dióxido de carbono para manutenção da fotossíntese, ainda que os estômatos estejam fechados (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Fatores abióticos também contribuem para a esse processo, como a luz incidente nas folhas, que estimula a realização de fotossíntese e reduz a concentração de CO₂, o uso das estruturas estomáticas (abertura e fechamento) serve de proteção para plantas, contudo, sem suprimento mínimo de água, há antecipação da senescência, devido ao murchamento.

Os mesmos autores comentam que, um dos mais importantes condicionantes ambientais para respostas estomáticas é a temperatura, onde um aumento de 10°C pode duplicar a taxa de evapotranspiração, no entanto, a temperatura da superfície foliar não aumenta tão rapidamente assim, pois a evaporação resfria a folha, a densidade estomática – número de estômatos por milímetro quadrado – pode ser muito alta e é diferente entre partes da folha considerando as faces adaxial e abaxial da epiderme.

Além disso, há outras condições que refletem nos mecanismos de abertura e fechamento estomático, como intensidade da radiação solar, vento, umidade relativa do ar, deve-se ressaltar o equilíbrio entre potencial hídrico de entrada e saída pela absorção/transpiração.

Os atuais cenários climáticos requerem o cultivo de plantas tolerantes às condições de aquecimento global, que resultam em redução de precipitação pluviométrica, conseqüentemente menor teor de água disponível para as culturas. Nesse contexto, o emprego de ferramentas genéticas, é capaz de subsidiar a produção de plantas menos susceptíveis a deficiência hídrica.

2. Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos de Plantas cultivadas sob Deficiência Hídrica

Dentre aglomerados recursos essenciais para as plantas, a água acaba sendo o mais restritivo para a produtividade agrícola, devido sua importância a distintos processos metabólicos das plantas, sobretudo no período inicial de desenvolvimento (FERNANDES; CAIRO; NOVAES, 2015).

O aumento constante de períodos de seca, agregados a temperaturas elevadas, é relacionado às mudanças climáticas, acarretando perdas substanciais em áreas de produção agrícola (ARRUDA *et al.*, 2015).

Carneiro *et al.* (2011) relata que as plantas em condições adversas podem sofrer alterações fisiológicas e bioquímicas, refletindo em alguns parâmetros como: crescimento, fotossíntese, abertura e fechamento estomático, expansão foliar, estresse oxidativo (UPADHYAY *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012; DUARTE; MELO FILHO; SANTOS, 2013), mudanças nas propriedades de membrana, aumento da respiração, matéria seca reduzida, senescência acelerada e produção reduzida.

As plantas respondem de maneiras distintas a deficiência hídrica, pois existem as tolerantes que através de modificações nas características morfofisiológicas e bioquímicas superam o estresse e as suscetíveis que desenvolvem sintomas, acarretando queda na produção (CHAKRABORTY *et al.*, 2015).

A fotossíntese torna-se um dos parâmetros mais prejudicados dentro do processo de estresse hídrico, devido à existência de alguns cofatores que diminuem a fotossíntese das plantas, como, mudanças qualitativas e quantitativas no conjunto de pigmentos fotossintéticos, as taxas de assimilação deficiente em folhas, que ocorrem devido a redução do metabolismo fotossintético e da atividade das enzimas, juntamente com baixa eficiência de carboxilação e redução na absorção de CO₂ devido ao fechamento e resistência estomática (LISAR, 2012).

Outros fatores fisiológicos relatados por Oliveira, Alencar e Gomes-Filho (2013), referem-se a uma desidratação celular, causando reduções do turgor celular (Ψ_p) e do volume celular, associado também com o potencial de água (Ψ_w) do apoplasto tornar-se mais negativo que o do simplasto, o que poderia causar uma desidratação celular ocasionando altos níveis de concentração de íons, sendo eles citotóxicos.

Xu, Zhou e Shimizu (2010), descrevem que o aparato fotossintético pode ser lesado sob seca severa ou extrema, levando a declínios na eficiência fotoquímica do PSII, potencializando a peroxidação. A taxa de crescimento das plantas diminuirá gradualmente com o *deficit* hídrico e após a re-irrigação, as alterações de gás e o crescimento da planta podem ser reconstruídos, para os quais a extensão depende obviamente da magnitude do estresse. Segundo o mesmo autor, plantas sujeitas a estresse hídrico apresentam elevada atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), que é adequada para desempenhar uma função importante no metabolismo em minimizar os efeitos deletérios, através da regulação de suas expressões gênicas e suas atividades. A **Figura 1.1** mostra algumas das possíveis rotas de respostas das plantas a deficiência hídrica e seguinte normalização da irrigação.

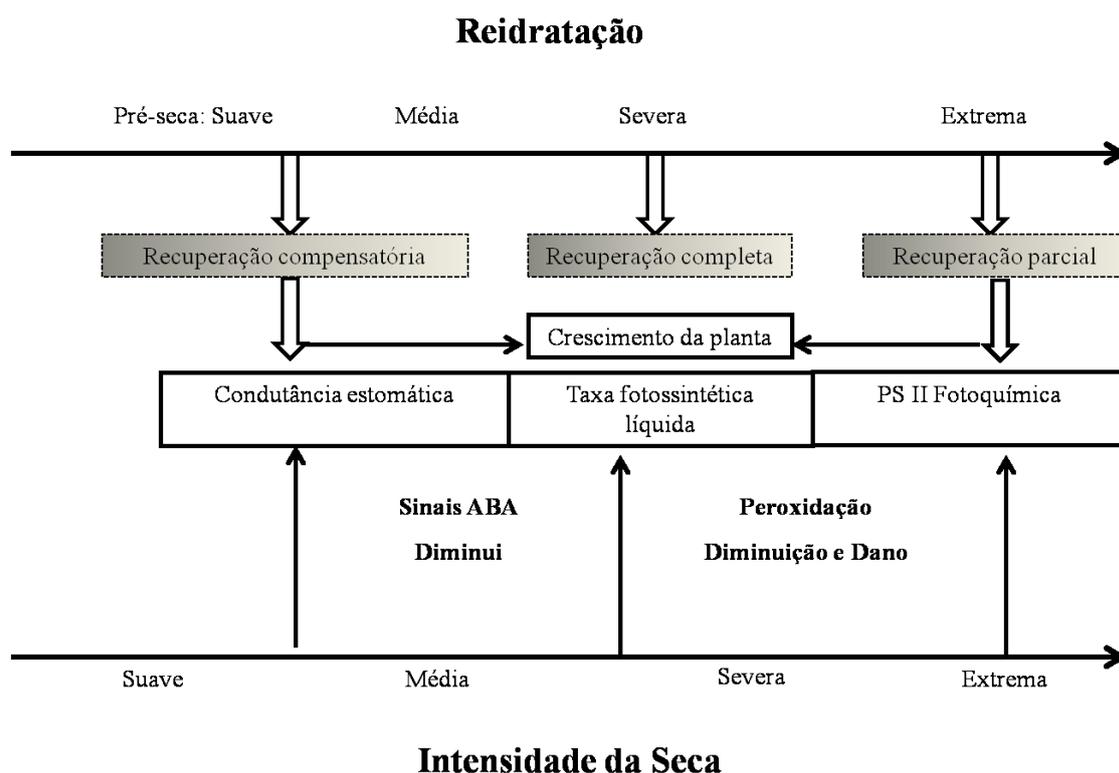


Figura 1.1. Rotas de respostas em plantas submetidas à deficiência hídrica e subsequente irrigação.
Fonte: Adaptado de Xu, Zhou e Shimizu (2010).

Segundo Akcay (2010), as enzimas fundamentais do metabolismo do enxofre e as proteínas integradas à estrutura da raiz (tubulina) foram relatadas como sendo reguladas negativamente pelo estresse hídrico, sobretudo as enzimas associadas à morfologia das raízes (actina) foram expressas como sendo reguladas positivamente.

A análise do proteoma em diferentes estádios do estresse hídrico mostrou-se em nível de raiz que as proteínas integradas à sinalização celular (lectinas e oxidoreductases) foram expressivamente reguladas durante o estresse (SENGUPTA; REDDY, 2011). Para Akcay (2010), as proteínas que degradam ou desintoxicam espécies reativas de oxigênio (ERO) exercem funções importantes na proteção dos papéis essenciais das plantas contra estragos oxidativos induzidos pela seca; conservando a homeostase redox intracelular ou regulando a sinalização redox para indução de respostas de estresse específicas (FOYER; NOCTOR 2005). A **Figura 1.2** representa os efeitos e respostas das plantas mantidas sob deficiência hídrica.

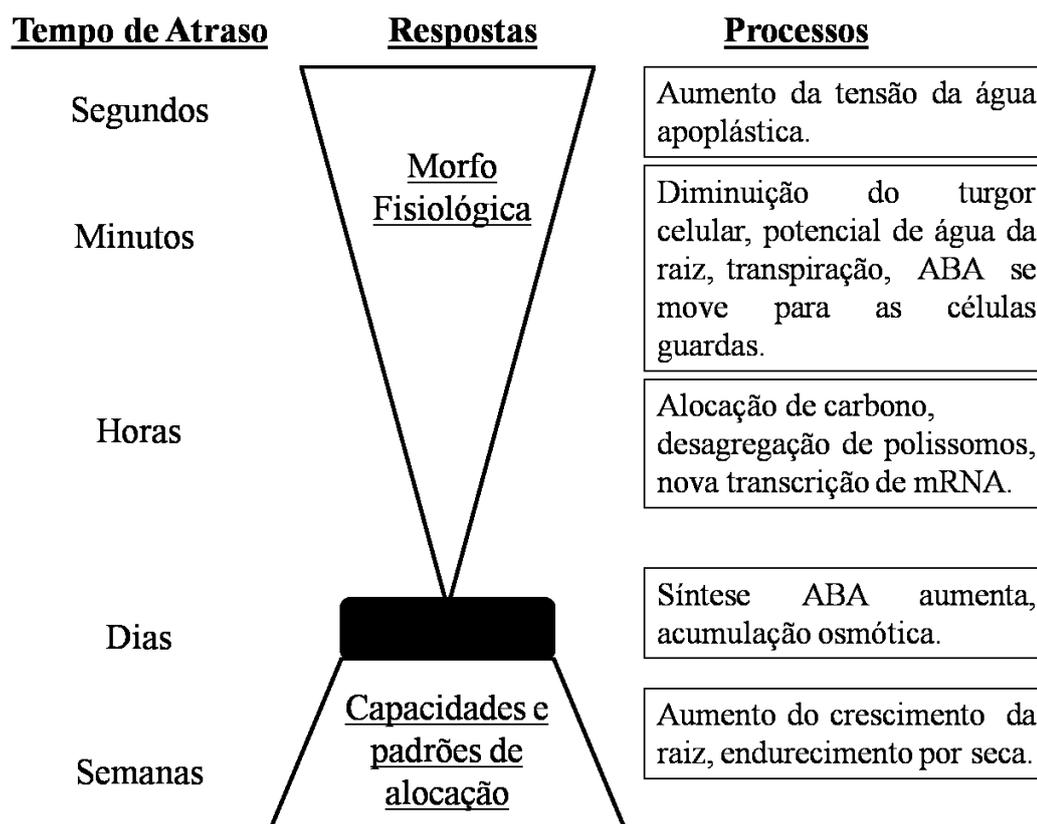


Figura 1.2. Escala temporal das respostas da planta ao estresse hídrico. *Fonte:* Adaptado de Misra *et al.* (2002).

3. Deficiência Hídrica nas Culturas: Estudo de Casos

As plantas cultivadas sob deficiência hídrica podem desenvolver diferentes respostas adaptativas, em função da espécie, cultivar, duração e intensidade do *deficit* hídrico (LEVITT, 1980). Nesse tópico, serão apresentados estudos avaliando as consequências da deficiência hídrica nas culturas de cana-de-açúcar, soja, feijão, milho, banana, beterraba e uva.

Em cana-de-açúcar vários autores têm relatado resultados promissores de tolerância à deficiência hídrica (QUEIROZ *et al.*, 2011; CIA *et al.*, 2012; CHA-UM *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2015). Ao analisar respostas bioquímicas e fisiológicas em cultivares de cana-de-açúcar tolerantes a seca, Queiroz *et al.* (2011) constataram que pode ocorrer variações nas respostas das plantas quando submetidas a tais condições, citando que a cultivar cv. IAC91-5155 apresenta tolerância relativa à seca, e quando

submetida a estresse hídrico severo, ocorreram alterações no crescimento e na alocação de biomassa.

Indicadores bioquímicos que sinalizam condições de deficiência hídrica em cana-de-açúcar são ferramentas relevantes na determinação de sensibilidade da cultura, em especial, pode-se citar que a quantificação e observação de peroxidação lipídica e o acúmulo precoce de prolina, são parâmetros capazes de refletir tais cenários (CIA *et al.*, 2012).

Na soja, a perda de produtividade em função da deficiência hídrica depende diretamente do estágio fenológico, duração e intensidade da escassez de água (DOSS; THURLOW, 1974; DESCLAUX; HUYNH; ROUMET, 2000), sendo os estágios de enchimento e floração, os mais exigentes em termos de necessidade hídrica (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER., 2007; EMBRAPA, 2011). Do ponto de vista morfológico, Santos e Carlesso (1998) citam em soja, diminuição na área foliar e aceleração da senescência e abscisão das folhas. Catuchi *et al.* (2011), estudando duas cultivares de soja, cv. CD 220 e cv. CD 226RR sob *deficit* hídricos induzidos na fase V4, constataram reduções de 40% da área foliar e 50% de massa seca da parte aérea.

A deficiência hídrica comprometeu significativamente o alongamento da raiz e expansão da área foliar em plantas de soja (AKÝNCI; LÖSEL, 2012). De acordo com Neumaier, Nepomuceno e Farias (2000), a redução dos parâmetros de biomassa em condições de *deficit* hídrico, está correlacionada, com a redução das taxas de translocação, fotossíntese e acumulação de biomassa.

No feijão, a redução do potencial osmótico (-0,3 MPa) afetou mais o vigor das sementes do que a protusão da raiz primária (CABRAL *et al.*, 2014), e de acordo com os mesmos autores, a redução do potencial osmótico até -0,3 MPa afetou o desempenho de todos os genótipos de feijão testados (FORT 07, FORT 08, SERRANO E IAPAR 81), sendo as cultivares IAPAR 81 e FORT 07, as mais tolerantes ao estresse por deficiência hídrica. Moraes, Menezes e Pasqualli (2005), comentam que o efeito do potencial osmótico nas sementes e mudas de feijão, quando submetidos às mesmas condições de *deficit* hídrico, depende dos atributos de qualidade da semente e das características do soluto utilizado.

Para a cultura do milho, Anjum *et al.* (2016) estudando as respostas de duas cultivares (Rung Nong 35 e Dong Dan 80) submetidas a estresse por deficiência hídrica, constataram que o estresse, mesmo por um curto período de tempo, dificultou o crescimento, o rendimento e outros atributos fisiológicos e bioquímicos em ambas as

cultivares de milho. Os autores concluíram que a variedade Dong Dan 80 é mais resistente ao estresse por deficiência hídrica; apresentou maior atividade fotossintética e antioxidante; acumulou maiores teores de osmólitos; proporcionou menor peroxidação lipídica e superou em 23,53 % o rendimento da variedade Run Nong 35.

A cultura da banana (*Musa spp.*) é muito sensível às mudanças ambientais, sendo a deficiência hídrica uma das maiores restrições à sua produtividade (SURENDAR *et al.*, 2013). A taxa de emergência de folhas jovens consiste no indicador mais sensível a deficiência hídrica (KALLARACKAL; MILBURN; BAKER, 1990; TURNER; THOMAS, 1998). A deficiência hídrica durante a fase de frutificação inibe a translocação de assimilados para os cachos, e em situações de deficiência hídrica severa, pode haver queda dos mesmos, comprometendo a produtividade (SURENDAR *et al.*, 2013).

Em estudos sobre o desenvolvimento da beterraba submetida a níveis variados de tensão da água no solo, Silva, Silva e Bassoi (2015), observaram que tanto o *deficit* hídrico quanto o excesso de água podem reduzir a produtividade da cultura. Os mesmos autores constataram que uma tensão de 45 kPa, pode ser o ponto crítico na queda de rendimento das plantas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Topak, Süheri e Acar (2011) em estudos sobre diferentes regimes de irrigação por gotejamento na cultura da beterraba, com redução na produção de raiz de 36,4% nos tratamentos submetidos a *deficit* hídrico. Da mesma forma, Ghamarnia *et al.* (2012), constataram uma redução no peso das raízes das beterrabas que receberam menores lâminas de irrigação.

Para a cultura da uva, Marinho *et al.* (2011) em estudo na região do Submédio São Francisco, para avaliar o crescimento da baga da uva sob diferentes lâminas e épocas de *deficit* de irrigação na fase de maturação, constataram que a restrição hídrica (lâminas de 0, 50 e 100% da ETc) nessa fase, não limitou o crescimento das bagas de uva. A redução no consumo de água na vitivinicultura do semiárido nordestino, não afeta significativamente o metabolismo de proteínas e açúcares (SANTOS; MOREIRA; RODRIGUES, 2013).

Em adição, a irrigação com *deficit* controlado em uvas para produção de vinhos, pode influenciar positivamente na qualidade do vinho (ROBY *et al.*, 2004; RUIZ-SANCHEZ; DOMINGO; CASTEL, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Bassoi *et al.* (2011), onde a deficiência hídrica favoreceu o acúmulo de açúcares e reduziu a acidez nos frutos, proporcionando melhoria na qualidade das uvas destinadas

a vinificação. Deve-se atentar que avaliações de plantas submetidas à deficiência hídrica, exigem estudos a longo e curto prazo (RUIZ-SANCHEZ; DOMINGO; CASTEL, 2010). A resposta das culturas à deficiência hídrica está intrinsecamente relacionada aos fatores climáticos.

Sob condições atmosféricas normais, a deficiência hídrica é um fator de risco já conhecido em intensidade e distribuição, contudo, nos atuais cenários de mudanças climáticas, esse fenômeno pode se apresentar de forma irregular, acentuando essa redução na produtividade das culturas.

Estudos recentes como os de Cai *et al.* (2015), demonstram que os parâmetros climáticos, principalmente o aumento da temperatura, afetam significativamente os rendimentos do milho e trigo. Segundo Lobell, Schlenker e Costa-Roberts (2011), a produção global dessas culturas pode sofrer um decréscimo de 3,8 e 5,5%, respectivamente.

De acordo com Nelson *et al.* (2009), as mudanças climáticas adversas podem provocar maiores perdas de produtividade das culturas (milho, arroz e trigo) irrigadas, em países em desenvolvimento, conforme **Tabela 1.1**.

Tabela 1.1. Impactos das mudanças climáticas no rendimento das culturas irrigadas (%), comparativo entre os anos 2000 e 2050.

Culturas Irrigadas	Região	CSIRO (SFCO₂)	CSIRO (CFCO₂)	NCAR (SFCO₂)	NCAR (CFCO₂)
Milho	D	-1,2	-1,2	-8,7	-8,6
Milho	ED	-2,0	-1,4	-2,8	-2,1
Arroz	D	-3,5	10,5	-5,5	9,0
Arroz	ED	-14,4	2,4	-18,5	-0,5
Trigo	D	-5,7	-1,3	-4,9	-0,1
Trigo	ED	-28,3	-20,8	-34,3	-27,2

CSIRO: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization - Australia; NCAR: National Centre for Atmospheric Research - US; SFCO₂: sem fertilização com CO₂; CFCO₂: com fertilização com CO₂; D: desenvolvida; ED: em desenvolvimento. *Fonte:* Adaptado de Nelson *et al.* (2009).

4. Deficiência Hídrica na Agricultura: Cenários Futuros

Diversos estudos estão sendo realizados no intuito de aprimorar estratégias adaptativas para as culturas sob condição de deficiência hídrica, com o uso principalmente de técnicas de melhoramento genético. O efeito do estresse hídrico nas plantas pode ser avaliado através de variáveis fisiológicas, como por exemplo, potencial hídrico foliar, condutância estomática e transpiração (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Em relação ao melhoramento genético, Vale *et al.* (2012), avaliando o desempenho de nove variedades de feijão submetidas a deficiência hídrica, constataram que as respostas morfológicas são capazes de auxiliar na escolha de variedades tolerantes ao estresse hídrico, sendo o genótipo Pérola, durante o estágio de florescimento, considerado tolerante.

Em estudo de quatro variedades de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica, Pincelli e Silva (2012) verificaram que as variedades SP81-3250 e SP83-2847 apresentaram maior número de folhas; coloração mais escura; maior área foliar; aumento da densidade estomática nas superfícies adaxial; e maior produção de massa e matéria seca, indicando resultados superiores, que corroboram para efeito de seleção de material.

A avaliação de oito genótipos de citros, em relação ao crescimento e produtividade sob deficiência hídrica, demonstrou que o enxerto com genótipo 15 (TSKC x CTARG – 019) foi superior aos demais e o limoeiro cravo apresentou a menor produtividade (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Avaliando a produtividade em cultivares de arroz de ciclo curto e médio em condições de deficiência hídrica, Heinemann (2010), concluiu que mesmo submetidas à esta condição em épocas favoráveis a cultura, não ocorreu influência negativa na produtividade da cultura.

5. Referências Bibliográficas

- AKCAY, U.C.; EERCAN, O.; KAVAS, M.; YILDIZ, L.; YILMAZ, C.; OCTEM, H. A.; YUCEL, M. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 1, n. 61, p.21–28, 2010.
- AKÝNCI, S.; LÖSEL, D.M. Plant Water-Stress Response Mechanisms. In: RAHMAN, I.M.M.; HASEGAWA, H. Water Stress, InTech, Croatia, p. 15-42, 2012.
- ANJUM, S.A.; TANVEER, M.; ASHRAF, U.; HUSSAIN, S.; SHAHZAD, B.; KHAN, I.; WANG, L. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2016.
- ARRUDA, I.M.; CIRINO-MODA, A.; BURATTO, J.S.; FERREIRA, J.M. Crescimento e produtividade de cultivares e linhagens de amendoim submetidas à déficit hídrico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 2, p. 146-154, 2015.
- BASSOI, L.H.; GONÇALVES, S.O.; SANTOS, A.R.L.; SILVA, J.A.; LIMA, A.C.M. Influência de manejos de irrigação sobre aspectos de ecofisiologia e de produção da videira cv. Syrah/Paulsen 1103. **Irriga**, v. 16, n. 4, p. 395, 2011.
- CABRAL, P.D.S.; SANTOS, L.N.; VIEIRA, H.D.; SOARES, T.C.B.; BREMENKAMP, C.A.; RODRIGUES, W.P. Effect of Osmotic Stress on the Initial Development of Bean Seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1973-1982, 2014.
- CAI, X.; ZHANG, X.; NOËL, P. H.; SHAFIEE-JOOD, M. Impacts of climate change on agricultural water management: a review. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Water**, v. 2, n. 5, p. 439-455, 2015.
- CARNEIRO, M.M L. C.; DEUNER, S; OLIVEIRA, P.V; TEIXEIRA, S.B; SOUSA, C.P; BACARIN, M.A; MORAES, D.M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4 p. 752-761, 2011.
- CATUCHI, T.A.; VÍTOLO, H.F.; BERTOLLI, S.S.; SOUZA, G.M. Tolerance to water deficiency between two soybean cultivars: transgenic versus conventional. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 373-378, 2011.
- CHAKRABORTY, K; SINGH, A; KALARIYA, K.A; GOSWAMI, N; ZALA, P.V. Physiological responses of peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars to water deficit stress: status of oxidative stress and antioxidant enzyme activities. **Acta Botanica Croatica**, v. 74, n. 1, p. 123–142, 2015.
- CHA-UM, S.; WANGMOON, S.; MONGKOLSIRIWATANA, C.; ASHRAF, M.; KIRDMANEE, C. Evaluating sugarcane (*Saccharum* sp.) cultivars for water

- deficit tolerance using some key physiological markers. **Plant Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 431-439, 2012.
- CIA, M.C.; GUIMARÃES, A.C.R.; MEDICI, L.O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, n. 3, p. 313-324, 2012.
- DESCLAUX, D.; HUYNH, T.; ROUMET, P. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. **Crop Science**, v. 40, p. 716-722, 2000.
- DOSS, B.D.; THULOW; D.L. Irrigation, row width and plant population in relation to growth characteristics of two soybean varieties. **Agronomy Journal**, v. 65. p. 620-623, 1974.
- DUARTE, E. A.A; MELO FILHO, P.A; SANTOS, R.C. Características agronômicas e índice de colheita de diferentes genótipos de amendoim submetidos a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 8, p. 843-847, 2013.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de Produção 15. Exigências Climáticas. In: **Tecnologia de produção de soja** - Região central do Brasil – 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, p. 11-12. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/SP15-VE.pdf>>. Acesso em 10 de novembro de 2016.
- FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da soja. Londrina: **EMBRAPA-CNPSO, Circular técnica** v.48, 9 p., 2007.
- FERNANDES, E.T; CAIRO, P.A.R; NOVAES, A.B. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. **Revista Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 29-34, 2015.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v. 1, n. 17, p. 1866–1875, 2005.
- GHAMARNIA, H.; ARJI I.; SEPEHRI, S.; NOROZPOUR, S.; KHODAEI, E. Evaluation and comparison of drip and conventional irrigation methods on sugar beets in semiarid region. **Journal of Irrigation and Drainage Engineering**, v.138, p. 90-97, 2012.
- HEINEMANN, A.B. Caracterização dos padrões de estresse hídrico para cultura do arroz (ciclo curto e médio) no estado de Goiás e suas consequências para o melhoramento genético. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 29-36, 2010.
- KALLARACKAL, J.; MILBURN, J.A.; BAKER, D.A. Water Relations of the Banana. III. Effects of Controlled Water Stress on Water Potential, Transpiration, Photosynthesis and Leaf Growth. **Functional Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 79-90, 1990.

- KERBAUY, G.B. Fisiologia Vegetal, 2° ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431 p., 2013.
- LEVITT J. Response of plants to environmental stress. II: Water radiation, salt and other stress. Academic Press, Salt Lake City, 606p, 1980.
- LISAR, Y.S.S; MOTAFAKKERAZAD, R; HOSSAIN, M.M; RAHMAN, I.M.M. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses, **Annual Review of Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 519-570, 2012.
- LOBELL, D.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS J. Climate trends and global crop production since 1980. **Science**, v. 333, p. 616–620, 2011.
- MARINHO, L.B.; RODRIGUES, J.J.; SOARES, J.M.; SANTOS, I.S.; BRANDÃO, E.O.; FILHO, J.M.L. Potencial de água no solo e na folha da videira “Sugar One” sob *deficit* hídrico. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 15, n. 11, p. 1115-1122, 2011.
- MISRA, A.N; BISWAL, A.K; MISRA, M. Physiological, biochemical and molecular aspects of water stress responses in plants, and the biotechnological applications. National Academy of Sciences, India, vol LXXII, Section-b, part II, 2002.
- MORAES, G.A.F.; MENEZES, N.L.; PASQUALLI, L.L. Bean Seed Performance under Different Osmotic Potentials. **Ciência Rural**, v. 35, p. 776-780, 2005.
- NASCIMENTO, A.K.S.; FERNANDES, P.D.; SUASSUNA, J.F.; OLIVEIRA, A.C. M.; SOUSA, M.S.S.; MELO, C.A.C. Tolerância de genótipos de citros ao estresse hídrico na fase de porta-enxerto. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 6, nº. 1, p. 14- 22, 2012.
- NELSON, G.C.; ROSEGRANT, M.W.; KOO, J.; ROBERTSON, R.; SULSER, T.; ZHU, T.; RINGLER, C.; MSANGI, S.; PALAZZO, A.; BATKA, M. Climate Change Impacts on Agriculture and Costs of Adaptation. Washington, DC: International Food Policy Research Institute; 2009.
- NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L.; FARIAS, J.R.B. Estresses de ordem ecofisiológica. In: BONATO, E. R. (ed.). Estresses em soja. Passo Fundo: **EMBRAPA Trigo**, 254 p, 2000.
- OLIVEIRA, A.B; ALENCAR, N.L.M; GOMES-FILHO, E. Comparison Between the Water and Salt Stress Effectson Plant Growth and Development, Chapter from the book Responses of Organisms to Water Stress, Croatia, p. 67-94, 2013.
- PEREIRA, J.W.L; MELO FILHO, P.A; ALBUQUERQUE, M.B; NOGUEIRA, R.J.M.C; SANTOS, R.C. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a *deficit* hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 766-773, 2012.

- PINCELLI, R.P.; SILVA, M.A.; Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 546-556, 2012.
- QUEIROZ, R.J.B.; SANTOS, D.M.M.D.; FERRAUDO, A.S.; CARLIN, S.D.; SILVA, M.D.A. Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 4, p. 469-476, 2011.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 876 p., 2014.
- ROBY, G.; HARBERTSON, J.F.; ADAMS, D.A.; MATTHEWS, M.A. Berry size and vine water deficits as factors in wine grape composition: anthocyanins and tannins. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, p. 100-107, 2004.
- RUIZ-SANCHEZ, M.C.; DOMINGO, R.; CASTEL, J.R. Review: Deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 2, p. 5-20, 2010.
- SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. *Deficit* hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.
- SANTOS, C.M.G.; MOREIRA, M.M.; RODRIGUES, J.D. Metabolismo da videira 'syrah' no semiárido nordestino sob três estratégias hídricas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 3611-3624, 2013.
- SANTOS, C.M.; ALMEIDA S.M.; LIMA, G.P.P.; BORTOLHEIRO, F.P.D.A.P.; BRUNELLI, M.C.; HOLANDA, L.A.; OLIVER, R. Physiological changes associated with antioxidant enzymes in response to sugarcane tolerance to water deficit and rehydration. **Sugar Tech**, v. 17, n. 3, p. 291-304, 2015.
- SENGUPTA, D.; REDDY, A.R. Water deficit as a regulatory switch for legume root responses. **Plant Signaling & Behavior**, v. 1, n. 6, p. 914-917, 2011.
- SILVA, A.O.; SILVA, E.F.F.; BASSOI, L.H.; KLAR, A.E. Desenvolvimento de cultivares de beterraba sob diferentes tensões da água no solo. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 12-18, 2015.
- SURENDAR, K.K.; DEVI, D.D.; RAVI, I.; KRISHNAKUMAR, S.; KUMAR, S.R.; VELAYUDHAM, K. Water stress in banana-A review. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, Agra, v. 2, n. 6, p. 1-18, 2013.
- TOPAK, R.; SÜHERI S.; ACAR, B. Effect of different drip irrigation regimes on sugar beet (*Beta vulgaris*) yield, quality and water use efficiency in Middle Anatolian, Turkey. **Irrigation Science**, v. 29, p. 79-89, 2011.

- TURNER, D.W.; THOMAS, D.S. Measurements of plant and soil water status and their association with leaf gas exchange in banana (*Musa* spp.): a laticiferous plant. **Scientia Horticulturae**, v. 77, n. 3, p. 177-193, 1998.
- UPADHYAYA, H.D; SHARMA, S; SINGH, S; SINGH, M. Inheritance of drought resistance related traits in two crosses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.), **Euphytica**, v. 1, n. 177, p. 55–66, 2011.
- VALE, M.N.; BARILI, L.D.; ROZZETO, D.S.; STINGHIN, J.C., COIMBRA, J.L. M., GUIDOLIN, A.F., KÖOP, M.M. Avaliação para tolerância ao estresse hídrico em feijão. **Revista Biotemas**, v. 25, n. 3, 2012.
- XU, Z; ZHOU, G; SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering, **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 649-654, 2010.

CAPÍTULO 2

ESTRESSE MINERAL (MACRONUTRIENTES)

BRENO KENNEDY LIMA BEZERRA; DÁVILLA ALESSANDRA DA SILVA ALVES; GABRIEL HENRIQUE GERMINO; JÉSSICA DE LIMA; LEANDRO BIANCHI; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

A nutrição de plantas apresenta-se com singular importância no âmbito da vida em diferentes biomas terrestres, considerando-se a composição química de todos os seres vivos. Esses elementos são provenientes de reservatórios básicos, como rochas, oceanos e atmosfera. O carbono, nitrogênio, potássio, fósforo e outros nutrientes essenciais são inicialmente separados do ambiente inorgânico e incorporados à célula pelas plantas, sendo que toda a biosfera depende dessa habilidade (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

A planta é o espelho do solo que habita. Em situações de estresse nutricional, as consequências incidirão na forma de distúrbios metabólicos que serão refletidos sob o desenvolvimento e em suas funções vitais. Para tanto, os minerais essenciais são classificados de acordo com a necessidade de concentração no metabolismo vegetal, sendo então definidos como macronutrientes aqueles exigidos em maior quantidade nos órgãos e tecidos vegetais.

Para se determinar a importância dos nutrientes para a planta, utilizam-se alguns critérios de essencialidade (ARNON; STOUT, 1939):

- A deficiência de determinado nutriente impede que a planta complete seu ciclo vital;
- O elemento não pode ser substituído por outro com propriedades similares;
- O elemento deve participar diretamente do metabolismo da planta e que seu benefício não esteja somente relacionado ao fato de melhorar as características do solo, melhorando o crescimento da microflora ou algum efeito similar. A concentração dos minerais nos tecidos vegetais é variável por alguns fatores, como o tipo de planta, das condições climáticas durante o período de crescimento, da composição química do meio

e da idade do tecido (FERNANDES, 2006). Os elementos minerais essenciais segundo EPSTEIN e BLOOM (2006), são classificados em macronutrientes (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg e Si) apresentando aproximadamente 99,5% da massa seca e em micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn) constituindo 0,5% da massa seca.

2. Nitrogênio (N)

2.1. Nitrogênio no solo

No solo, é rara a presença do Nitrogênio (N) em quantidade compatível as necessidades das plantas, uma vez que em rochas ígneas sua concentração se apresenta insignificante. Desta forma, o N presente no mesmo encontra-se na forma orgânica, compondo a matéria orgânica (M.O.), ou como parte de organismos vivos, podendo representar cerca de 99% deste nutriente combinado no solo (TROEH; THOMPSON, 2007). Conforme Malavolta *et al.* (1997) preferencialmente, pode-se destacar duas formas de nitrogênio inorgânico que são absorvidos pelo sistema radicular, o íon nitrato (NO_3^-) e o íon amônio (NH_4^+), e estes podem compor até 5% do N total no solo (KEENEY, 1982).

A atmosfera é rica em N, segundo Troeh e Thompson (2007), esta apresenta em sua composição cerca de 78% deste nutriente na forma de N_2 . Esta forma só poderá ser utilizada pelas plantas após ser quimicamente combinado com hidrogênio, oxigênio ou carbono, fenômeno este denominado fixação do N. Na natureza, para que esta fixação venha a ocorrer existem duas vias: A primeira é pelo relâmpago (descargas elétricas), onde há conversão de vapor de água e oxigênio em radicais livres que reagem com o N_2 atmosférico. A segunda via é realizada por fixação por certos microrganismos de vida livre no solo. No entanto estas formas de fixação não conseguem fornecer para as plantas, quantidade necessária para seu ótimo desenvolvimento (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

O N orgânico presente no solo é resultante de dejetos ou carcaças de animais, assim como da matéria fresca das culturas que permanece no campo após a colheita, compondo desta forma a matéria orgânica do solo (M.O.). Este mesmo é convertido para N inorgânico no processo de mineralização. Neste processo, as bactérias degradam

matéria orgânica e liberam amônio (NH_4^+). A formação de NH_4^+ aumenta à medida que aumenta a atividade microbiana (LAMB *et al.*, 2014). Conforme Calegari *et al.* (1998) o fenômeno de mineralização do N é um processo extremamente dinâmico e ocorre com maior intensidade em regiões tropicais. Todavia este processo é regido pelas condições edafoclimáticas de cada ambiente, uma vez que fatores como temperatura, umidade, pH e granulometria do solo unidos a relação C/N da M.O. serão os fatores preponderantes para sua ocorrência e intensidade.

2.2. Nitrogênio na planta

Macronutriente primário, o nitrogênio é absorvido em grandes quantidades pelas plantas, uma vez que pode representar de 1 a 6% da sua matéria seca (HAVLIN *et al.*, 2005). Sua incorporação no solo ocorre por meio de fertilizantes, através do ar mediante deposições atmosféricas de formas combinadas de N (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-), e fixação biológica de N_2 , tanto em sistemas não simbióticos quanto simbióticos, por meio de bactérias formadoras de nódulos nas raízes de plantas leguminosas (STEVENSON, 1982).

O transporte de N no interior nas plantas está fortemente ligado tanto ao metabolismo do sistema radicular, assim como as formas NH_4^+ ou NO_3^- . Uma vez que o íon NH_4^+ seja absorvido este comumente é assimilado nas células do sistema radicular, por sua vez quando da absorção do NO_3^- este será metabolizado pelas células do sistema radicular ou transportado para a parte aérea (MENGEL; KIRKBY, 1987; WILLIAMS; MILLER, 2001) podendo também ser armazenado no vacúolo das células radiculares. Quando a assimilação ocorre nas raízes será em plastídios, e na folha ocorrem nos cloroplastos. Conforme Delu Filho *et al.* (1998) e Bredemeier e Mundstock (2000), após a absorção do NO_3^- pelas células radiculares, este pode ser metabolizado pela via da redução do nitrato, devido a enzima nitrato redutase se concentrar nas células das raízes, desta forma pode-se observar o acúmulo de NH_4^+ nas mesmas, sendo após isso o N transportado para a parte aérea em sua forma amoniacal, sendo nas folhas incorporado em esqueletos carbônicos, pelas enzimas GS e GOGAT, na forma de N-aminoácidos.

Conforme Taiz e Zaiger (2013), quando assimilado, o N desempenha funções vitais para as plantas, favorecendo principalmente fatores relacionados ao seu desenvolvimento vegetativo. Sendo encontrado nas células na composição das proteínas estruturais e enzimáticas, clorofilas, ácidos nucleicos, coenzimas, além de

fitormônios e vitaminas. Demonstrando a íntima necessidade deste nutriente para a vida no planeta.

Entre a assimilação do NH_4^+ e do NO_3^- faz-se necessário destacar que existe uma distinção em matéria de gasto de energia para desenvolver a redução de ambos, cerca de dois e 12 ATPs, respectivamente (BRITTO *et al.*, 2001), todavia apenas um número limitado de espécies apresenta desenvolvimento satisfatório quando o NH_4^+ é a fonte predominante de N. Entre essas, destacam-se as plantas que vivem em ambientes alagados, onde há formação de NH_4^+ (BRITTO; KRONZUCKER, 2005).

2.3. Condições restritivas - Excesso e deficiência de Nitrogênio no tecido vegetal

As plantas em condições naturais enfrentam mudanças ambientais em que as concentrações de N variam e limitam o crescimento das mesmas, devido ao intemperismo, lixiviações pluviais e perdas por volatilização (PRADO, 2008). No tocante a fisiologia da produção, o estresse gerado pelo excesso ou déficit afetará não apenas o desenvolvimento, como também o crescimento das plantas por influenciar tanto na formação de órgãos de absorção de nutrientes, aparato fotossintético e órgãos florais, como a produção, translocação e acúmulo de assimilados.

Segundo Anderson (1993), nos pomares de *Citrus sinensis* a deficiência de nitrogênio é a mais comumente observada. Neste caso, as plantas apresentam sintomas característicos como coloração verde-clara à verde-amarelada nas folhas, podendo ser corrigido via suplementação, quando observado em fase inicial. Conforme Rodriguez (1991), em casos mais agudos de deficiência, é observada a redução podendo chegar à paralisação do crescimento das plantas, exibindo folhas pequenas e copa esparsa, amarelecimento generalizado da folhagem, atingindo também as nervuras, diminuição do tamanho e número dos frutos, casca delgada, verde-pálida, e maturação precoce, assim como secamento dos ponteiros.

Sua deficiência frequentemente limita o crescimento vegetal, devido o N apresentar alta mobilidade dentro da planta, os sintomas a clorose gradual é observado nas folhas mais velhas, estimulando a produção de etileno proporcionando a abscisão e a redução do crescimento da planta (PALLARDY, 2008; LI; WANG; STEWAR, 2013). Gruber *et al.* (2013) observaram que baixas concentrações de N (275 e 550 μM) proporcionam diminuição no desenvolvimento da raiz principal e por outro lado induziram o das raízes laterais.

Outros efeitos da deficiência é o menor ângulo de inserção nas folhas, visando maior assimilação de radiação para a ativação da enzima nitrato redutase e produção de carboidrato para a assimilação do N. Aumento no abortamento de flores, diminuição no tamanho dos cloroplastos, baixa produção de proteínas, clorofila e aumento da pressão osmótica (PRADO, 2008). Conforme Marschner (1995) e Malavolta *et al.* (1997), a clorose nas folhas velhas, é fruto da hidrólise da clorofila e da Rubisco, uma vez que 70% do N nas plantas, enquanto 50% da proteína foliar é nitrogênio, assim como da menor produção de clorofila.

Quando nos referimos ao excesso de N, podemos primeiramente referir ao efeito do NH_4^+ nas plantas, onde se encontram plantas mais tolerantes a altas concentrações do mesmo (ex. arroz), assim como aquelas mais sensíveis (ex. cevada). Todavia, clorose e a redução no crescimento da parte aérea das plantas são sintomas de toxidez que podem ser observados até mesmo em espécies reconhecidamente tolerantes (GERENDAS *et al.*, 1997); alteração na relação parte aérea/raiz (WANG; BELOW, 1996; PRADO, 2008) podendo culminar na morte das plantas (GIGON; RORISON, 1972; PRADO, 2008). Este efeito tóxico do NH_4^+ é fruto da grande despolarização do potencial de membrana nas células, afetando diretamente nas relações hídricas das plantas, diminuindo o fluxo hídrico dos vasos xilemáticos das raízes até a parte aérea (FERNANDES, 2006).

Os principais efeitos do excesso deste nutriente em frutíferas é a menor produção de frutos ou grãos, assim como o menor acúmulo de açúcares, afetando diretamente a produtividade, a causa para isso é o desvio dos carboidratos para a produção constituintes de tecido vegetal como as proteínas, promovendo desta forma o desenvolvimento da parte aérea das plantas (PRADO, 2008). Também é observada maior succulência nas folhas, tornando-as mais susceptíveis a ataques de insetos como a ação da geada (TROEH; THOMPSON, 2007). Segundo Fagotti (1998), embora provoque efeito indesejável de esverdeamento dos frutos, o aumento nos teores de nitrogênio das folhas de *Citrus sinensis* diminui a queda dos frutos e os tornam maiores.

Conforme Prado (2008), o excesso de N devido maior produção de folhas aumenta o alto sombreamento e desta forma reduzindo a taxa fotossintética líquida das plantas, assim como menor desenvolvimento do sistema radicular, acamamento e atraso na maturação.

3. Fósforo (P)

O fósforo (P) é um dos três macronutrientes que a planta exige em pequenas quantidades. No entanto, é o nutriente mais utilizado em adubação no Brasil, pois há certa carência do mesmo nos solos brasileiros e também é um elemento de alta interação com o solo, assim têm-se uma forte fixação. Por sua vez, ele possui baixa mobilidade no solo, sendo assim, quando se for aplicá-lo precisa ser incorporado ao solo e perto das raízes (RAIJ, 1991).

Para Taiz e Zeiger (2004), o fósforo é importante para o metabolismo das plantas, por executar um papel fundamental na transferência de energia nas células, durante a respiração e a fotossíntese e por ser um componente de nucleotídeos usados no ganho de energia das plantas (como ATP) e no DNA e RNA.

3.1. O Fósforo na planta

As plantas absorvem o fósforo na forma de fosfato inorgânico (P_i). A matéria orgânica dos solos liberta P_i no processo chamado mineralização. Devido ao fosfato ser facilmente lixiviado, a quantidade disponível para as plantas é limitado, precipitado e adsorvido por materiais orgânicos e minerais. Os coeficientes de difusão do P_i , em comparação com outros nutrientes, são baixos. Para se obter o fósforo do solo, as raízes alteram a sua estrutura e função, ou até mesmo, modificam a química do solo (JONES *et al.*, 2013).

3.2. Condições de excesso de fósforo

Os efeitos de excesso aparecem normalmente por sintomas relacionados com deficiências de outros elementos, tais como o zinco, o cobre, o ferro ou o manganês. Dessa maneira, há indícios de manchas vermelho - escuras em folhas velhas. Existem hipóteses que existe efeito de dissolução do micronutriente, com alto crescimento da planta, devido à aplicação do fósforo, podendo assim, causar deficiência na planta. O uso de P em excesso provoca sintomas de deficiências desses micronutrientes e também pode reduzir a fixação de CO_2 e a síntese de amido (MARSCHNER, 1986).

3.3. Condições de deficiência de fósforo

As restrições na disponibilidade de fósforo no começo do ciclo vegetativo são capazes de ocasionar danos no crescimento da planta, podendo eles ser irreversíveis.

Na deficiência de P os sintomas de modo geral são, as plantas mostrarem acúmulo de açúcares (energia química em potencial), e simultaneamente, perdem energia através do ATP. Com esta perda de energia, os processos de biossíntese das plantas acabam sendo comprometidos. Assim, as folhas novas exibem tonalidade verde - escura, com tons arroxeados; quando comparadas as folhas mais velhas, as folhas novas são mais estreitas, longas e de cor verde mais escura. As extremidades das folhas se mostram mais escuras do que a parte central. As folhas mais velhas ressecam a partir das margens, apresentando as pontas secas de cor marrom – alaranjada, estrias transversais marrons e bordas amareladas começando da ponta. Plantas de porte ereto tem uma redução no seu desenvolvimento quando a quantidade de fósforo aplicada é insuficiente. As raízes ficam mais coloridas e menos ramificadas e há atraso no amadurecimento dos grãos. A deficiência quando muito severa pode ocasionar a não formação do fruto e apresentar um amarelecimento acentuado nas folhas mais velhas. Com a deficiência de fósforo também pode haver formação de frutos pequenos, de coloração avermelhada ou arroxeada (MANICA, 1999; SOUZA, 1999).

4. Potássio (K)

No solo a maior parte do Potássio (K) está retido em minerais primários ou associado a minerais argilosos secundários, e sua disponibilidade depende da intemperização de minerais que contenham potássio, sendo a sua taxa de liberação uma função da composição química do material de origem (MENGEL; KIRKBY, 2000).

O Potássio pode ser encontrado no solo por meio de três formas, sendo elas K_{fixo} , o $K_{\text{trocável}}$, e o $K_{\text{solúvel}}$, e estas formas podem ser trocáveis entre si conforme a interação do nutriente com o solo. O $K_{\text{trocável}}$ é desorvido das partículas do solo por meio de troca de prótons (H^+) da solução do solo. O Potássio é absorvido em grandes quantidades pelas raízes das plantas, sendo este nutriente o cátion mais abundante na planta, e ele é absorvido na forma iônica (K^+), com a ajuda de canais e transportadores.

Ao contrário do Nitrogênio e do Fósforo, que constituem ácidos nucleicos, proteínas, ATP e fosfolipídeos, o Potássio não participa na composição de nenhuma estrutura ou molécula orgânica da planta, porém tem importante função na translocação e no armazenamento de assimilados, assim como atua na manutenção da água nos tecidos e no estado energético da planta.

O íon K^+ pode ser deslocado facilmente das células ou dos tecidos da planta por ser predominantemente encontrado como cátion adsorvido ou como cátion livre no solo (LINDHAUER, 1985). A grande mobilidade do Potássio fundamenta as principais características e funções deste nutriente na planta, conferindo-o como o mais ativo e importante componente inorgânico osmótico e como o principal cátion atuante na neutralização de cargas (CLARKSON; HANSON, 1980).

A manutenção das células e dos tecidos se dá pela grande concentração de K nos cloroplastos e no citoplasma. O Potássio participa de grande parte dos processos fisiológicos no vegetal (MARSCHNER, 1995):

- Ativador de mais de 60 enzimas, como exemplo, as desidrogenases, cinases, oxidoredutases, transferases e sintetases.
- Conserva o Turgor das células.
- Favorece o transporte e armazenamento de carboidratos.
- Contribui na síntese de amido nas folhas.
- Facilita a absorção de água.
- Atua regulando a abertura e o fechamento estomático.
- Regula a translocação de nutrientes na planta.
- Propicia um elevado estado energético, necessário para a síntese de ATP.
- Impulsiona a absorção do Nitrogênio e a produção de proteínas.

4.1. Nutrição na Planta

Para que a absorção do Potássio de fato ocorra, é indispensável que haja um íntimo contato com a superfície da raiz. Os primordiais mecanismos de transporte do Potássio, da solução do solo para a superfície radicular, são a difusão e o fluxo de massa (BARBER, 1995).

Dentre os dois mecanismos de transporte anteriormente citados, a difusão é a principal, e advém em resposta a gradiente que resulta das diferenças entre a

concentração do Potássio na superfície da raiz e da concentração do Potássio na rizosfera. Já o suprimento para o fluxo de massa depende do teor de K na solução do solo e da quantidade de água transpirada pela planta.

Segundo Leonard (1985), a hipótese de absorção do K conta com a ajuda de uma proteína carregadora específica que é localizada na membrana celular. Essa proteína fornece um canal aquoso, o qual atravessa a camada lipídica do plasmalema, fazendo com que esse mecanismo esteja de acordo com o modelo de cinética enzimática, explicando a competição por íons semelhantes ao K^+ na absorção. A absorção do K também é realizada pela atividade da *ATPase* da membrana celular, e o transporte a longa distância ocorre via xilema e floema. Todo o K da planta está em forma solúvel em água, o que explica a relativa facilidade da sua redistribuição dos órgãos mais velhos para os mais novos.

A ativação de enzimas pelo Potássio está relacionada com a mudança na conformação da molécula, fazendo com que aumente exteriorização dos sítios ativos para a associação com o substrato (WALLINFORD, 1980). A necessidade de elevadas concentrações no citoplasma para manter uma ótima atividade enzimática, faz com que a planta tenha uma alta exigência de K.

Na fotossíntese o K atua primeiramente no funcionamento dos estômatos e continuando age na fixação do CO_2 em presença de luz. O potencial osmótico é definido pela diferença na concentração entre os dois lados da membrana celular e é tanto menor quanto maior a diferença (MALAVOLTA, 2006). O Potássio é o principal cátion que atua no potencial osmótico, e isto se deve ao fato dele estar presente na célula como íon livre, resultando em uma resposta diretamente proporcional, ou seja, o aumento da concentração de K na célula propicia o aumento da capacidade da célula em absorver água. O controle do movimento estomático (abertura e fechamento) é dado pela variação na pressão de Turgor das células guarda, e o acúmulo de K nessas células ocorre através da energia do ATP oriundo da fotossíntese ou da respiração.

O Potássio é um nutriente essencial para o crescimento, desenvolvimento e maturação dos frutos e grãos, com isso, as plantas respondem à adubação potássica quando os solos apresentam baixos teores do nutriente (FERNANDES, 2006).

4.2. Condição de Estresse - Excesso e deficiência

Muitos autores afirmam que não há conhecimento de toxidez causada pelo excesso de Potássio em plantas, e quando o K é absorvido em quantidades superiores às necessárias é considerado como *consumo de luxo*. Porém, a alta concentração de K pode causar efeitos indiretos, interferindo positiva ou negativamente na absorção de outros cátions pelas plantas, por apresentarem o mesmo sítio no carregador, como exemplo o Cálcio e o Magnésio. O excesso de K também pode contribuir para a deficiência de alguns micronutrientes, causando a inibição na absorção de Zinco, Boro, Amônio e Manganês.

Em contrapartida, Accorsi e Haag (1959) identificaram, na cultura do cafeeiro, sintomas visuais e alterações anatômicas em plantas com excesso de K na solução nutritiva, sendo que as plantas apresentaram crescimento paralisado por completo, não havendo formação de novas folhas. O sistema radicular apresentou uma coloração marrom escuro e aspecto de atrofiado. O mesófilo foliar apresentou menor quantidade de cloroplastos, estes possuindo cor amarelada e com alterações no formato, em comparação com a testemunha.

A deficiência de K é a terceira mais encontrada nos diferentes ecossistemas (MARENCO; LOPES, 2005). O Potássio é redistribuído facilmente para os órgãos novos da planta, todavia a sua deficiência aparece primeiramente nas folhas mais velhas. Nas dicotiledôneas, as folhas velhas desenvolvem clorose inicialmente, que depois evolui para lesões necróticas, devido ao acúmulo de putrescina. Já nas monocotiledôneas, os sintomas aparecem primeiramente com a morte das células dos ápices e das margens das folhas, e posteriormente a necrose aumenta estendendo-se ao longo das margens para a base da folha.

A deficiência de K diminui a fotossíntese e aumenta a respiração, fazendo com que diminua o suprimento de carboidratos e por consequência o crescimento da planta. Segundo Malavolta (2006), em diversas culturas foi possível observar que a deficiência de K está associada à deficiência de Ferro (Fe), isso é causado pelo fato do Fe ser acumulado na região dos internos, gerando dificuldades para o transporte.

A queda excessiva das folhas e a falta de firmeza nos frutos também podem ser sintomas ocasionados pela deficiência de K. O Potássio, acompanhado do Nitrogênio, foram os nutrientes que mais limitaram a produção de massa seca das folhas (LIMA, 2009).

5. Cálcio (Ca)

O Cálcio (Ca) desempenha papel vital nas plantas, assim como todos os outros macronutrientes. Entretanto, sua finalidade não é específica para atender uma demanda nutricional da planta e sim fisiológica, sendo então considerado como macronutriente secundário. O suprimento de Cálcio às plantas provém da existência nativa em solos originados de rochas com este elemento em sua composição, ou por meio do fornecimento da calagem.

Absorvido na forma de Ca^{2+} via fluxo de massa, na planta, o cálcio é transportado via xilema e depositado para os pontos de crescimento ativo, como folhas e brotos, não havendo redistribuição, e se encontrando imóvel por toda a vida da célula. De acordo com Naiff (2007), está presente nos tecidos vegetais, sendo que boa parte se encontra em formas insolúveis em água nos vacúolos de células especializadas, na forma de carbonatos, malato, fosfatos, oxalatos e sulfatos.

A presença do Cálcio na célula desempenha um importante em diversos processos metabólicos que atuam no desenvolvimento adequado da planta e dos órgãos reprodutivos. Dentre suas principais funções, está a formação do Pectato de cálcio, que está presente na lamela média da parede celular vegetal e confere estruturação, resistência e perfeita funcionalidade da membrana celular, além da ativação de sistemas enzimáticos que atuam na germinação dos grãos de pólen e na expansão do tubo polínico (MENGEL e KIRKBY, 2000). É coadjuvante sobre diversas de reações químicas, das quais incluem reações de troca, precipitação e fixação de íons nos sítios de troca do sistema coloidal do solo (MELO *et al.*, 2000).

Dessa forma, o fornecimento adequado de cálcio nas plantas, promove resistência a efeitos deletérios de elementos metálicos, como alumínio, cobre e manganês, conferindo também a manutenção do equilíbrio entre a alcalinidade e acidez do meio, protegendo a célula dos efeitos nocivos que prejudicam as funções da membrana, provocados por íons de hidrogênio H^+ (BENINNI; TAKAHASHI; NEVES, 2003).

5.1. Deficiência de Cálcio no tecido vegetal

Quando se trata do manejo nutricional, quaisquer distúrbios que incidem no comportamento fisiológico, na anatomia da planta e na produtividade, conferem situações de estresse. Algumas condições abióticas também podem provocar baixa disponibilidade do Ca na planta, a exemplo de solos ácidos, característicos de solos tropicais e muito intemperizados. O excesso de umidade promove a baixa transpiração dos órgãos da planta, assim, o transporte para os órgãos ativos, não acontece de forma eficiente. Em condições de estresse hídrico, ocorre a competição pela seiva e os teores de cálcio nos frutos podem não atingir valores adequados devido à baixa transpiração, diminuindo a qualidade, a produtividade e o valor de mercado.

Os indícios de carência deste mineral ocorrem a princípio nas zonas mais tenras da planta, a exemplo de regiões meristemáticas, folhas e frutos jovens. Em pouco tempo, o crescimento celular cessa e causa malformações nos tecidos. Quando a deficiência atinge níveis acentuados ocorre o encurvamento apical, sintomas como a clorose marginal evoluem para necroses levando a folha à morte, caracterizada por irradiar das extremidades para o centro do limbo. Além disto, o crescimento radicular é afetado, pois, a falta de cálcio causa o aparecimento de células binucleadas, ocorrendo divisões amitóticas e núcleos poliploides, assim o desenvolvimento é então cessado, ocorrendo o bronzeamento e a subsequente morte radicular (MALAVOLTA *et al.*, 1997).

Consoante a Lima (2009), as extremidades foliares e as zonas meristemáticas juvenis podem manifestar aspecto gelatiniforme, o que é singular da ausência do Pectato de Cálcio na lamela média da parede celular, desestruturando-a. Todavia, os pontos de crescimento podem morrer, quando a planta é sujeita a condições de deficiência severa.

5.2. Excesso de Cálcio no tecido vegetal

Em condições excessivas do mineral, o ritmo da divisão celular é alterado. Segundo Veiga (2006), cálcio é um dos pivores dos processos de cisão e alongação celular de, assim como na expansão e aprofundamento das radículas. Apesar de serem pouco recorrentes, os sintomas diretamente ligados ao excesso do elemento na planta não são conhecidos, no entanto, altos teores de Cálcio no solo induzem deficiências de

Potássio (K) e Magnésio (Mg), devido a competição por cargas nos coloides, causando a baixa absorção desses elementos pelas raízes.

Em estudo realizado por Maffeis *et al.* (2000) em eucalipto, o aumento na concentração de cálcio promoveu redução na produção de citronela, e o aumento da relação K/Ca influenciou na qualidade do produto. Na cultura da laranja, Lanza (2013), doses crescentes de bio sólido propiciaram aumento do teor de Cálcio no solo, reduzindo significativamente nos teores de Potássio e Magnésio.

6. Magnésio (Mg)

6.1. Magnésio no solo

Os elementos minerais podem ser absorvidos tanto em forma iônica como em forma catiônica, sendo que o magnésio é um macronutriente presente no solo na forma catiônica (VITTI *et al.*, 2006). Estruturalmente no solo, o Mg é encontrado nos dois grandes grupos da mineralogia, nos minerais primários e secundários, presentes por exemplo em silicatos, carbonatos e sulfatos de dolomita, magnesita, na forma de minerais primários e montmorilonita, illita, clorita em minerais secundários (MALAVOLTA, 1981).

O Mg pode ser encontrado na forma fixa, trocável ou solúvel. Na maioria das vezes, esse nutriente é encontrado na forma não-trocável no solo, sendo minerais secundários a estrutura mais comum. Rochas eruptivas, sedimentares e metamórficas as que liberam Mg para o solo e deste para as plantas (MALAVOLTA, 1981).

6.2. Magnésio na planta

Para que ocorra absorção de Mg pelas plantas, a raiz precisa entrar em contato com o elemento, isso é possível através da interceptação radicular, por meio de difusão ou principalmente por meio de pressão positiva (fluxo de massa). Uma vez absorvido, a mobilidade do Mg é muito alta via floema, sendo translocado no sentido fonte dreno de folhas mais velhas para folhas mais novas (SCHIMANSKY, 1973). Vitti *et al.* (2006) descreve algumas funções do Mg nas plantas:

a) Clorofila: A clorofila é o principal fotorreceptor nos cloroplastos, estruturalmente o Mg participa da parte central do anel das clorofilas, correspondente a 2,7% do peso molecular delas.

b) Ativação enzimática: Participa da ligação entre o pirofosfato do ATP ou ADP – enzima, sendo considerado um cofator de enzimas fosforilativas; diminui o N-proteico e aumento o N-não proteico; formação da cadeia polipeptídica através da transferência de aminoácidos; e necessário para a manutenção da integridade do ribossomo, responsável pela estabilização das partículas ribossômicas na síntese de proteínas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

c) Carregador de “P”: Aumenta a eficiência da absorção de P pelas raízes, e acredita-se que isso ocorra também pelo efeito do Mg nas reações de fosforilação.

6.3. Deficiência de Mg no tecido vegetal

O efeito competitivo em relação a cátions (alto teor de K), solos com pH abaixo de 5,4, proporção inferior a 6% de Mg na CTC e concentrações menores que 48,6 mg dm⁻³ no solo, são sinais de deficiência do Mg no solo.

Outra característica típica de deficiência de Mg na planta, é o acúmulo de carboidratos não estruturais (FISCHER; BUSLER, 1988). Este acúmulo em folhas pode gerar uma regulação de “feedback” sobre a Rubisco em favor da reação oxigenase, elevando os níveis de fotorrespiração, que por sua vez formará radical superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio, conseqüentemente aumento o nível de antioxidantes nas plantas (MARSCHMER; CAKMAK, 1989).

Por ser móvel no floema, geralmente os primeiros sintomas do Mg começam em folhas mais velhas, ocorrendo o amarelecimento ou clorose internerval, devido a mobilidade deste cátion. Queda de folhas rígidas e folhas quebradiças podem ser também considerada como consequência da deficiência (BUZETTI; ANDREOTTI, 2010).

Mengel e Kirkby (1987), em feijão comum, observou que a deficiência de Mg diminui o número de grana nos cloroplastos e leva a uma redução ou ausência de compartimentalização. Quando a relação Ca/Mg for alta, pode diminuir a absorção de Mg pela planta, isso ocorre quando se utiliza demasiadamente calcário calcítico por vários anos (VITTI *et al.*, 2006).

6.4. Excesso de Mg no tecido vegetal

Níveis elevado de Mg podem resultar em seu armazenamento nos vacúolos, agindo como tampão para homeostase-Mg e como critério de osmoregulação. Rao *et al.* (1987), em girassol, verificou que em déficit hídrico a concentração do Mg^{2+} aumenta no estroma dos cloroplastos, podendo inibir a fotofosforilação e a fotossíntese.

Accorsi e Haag (1959) visualizaram a paralisação do crescimento de plantas, sem queda das folhas com o excesso de Mg, e também o atrofiamento do sistema radicular, coloração cinza nas raízes e verde-clara nas folhas. Em relação a alterações anatômicas, esses mesmos autores observaram cloroplastos com verde mais claro quando comparado com a testemunha.

7. Enxofre (S)

7.1. Enxofre no Solo

O enxofre (S) pode ser encontrado de diversas maneiras no planeta, como por exemplo na rocha matriz na forma de elemento primário, sua concentração está por volta de 1,1 g kg⁻¹ na crosta terrestre. A forma orgânica é sua principal forma, presente em restos vegetais e animais (VITTI, *et al.*, 2006).

Em solos aerados o S mineral é encontrado na forma de sulfato (SO_4^{-2}), essa carga negativa do sulfato faz com que não seja atraído por argila e pela matéria orgânica, com algumas exceções como por exemplo em solos ácidos. Ainda na forma de sulfato, em regiões áridas podem estar ligados a Ca, Mg, K e Na (SFREDO; LANTMANN, 2007).

7.2. Enxofre na planta

A concentração na matéria seca do enxofre segundo Epstein (1999), gira em torno de 0,1 ppm. Em plantas superiores, a absorção do S é na forma de sulfato, diferentemente do Mg o S é translocado principalmente pelo xilema, podendo também

ser absorvido na forma ácido sulfúrico (SO_2) no ar. O transporte do sulfato ocorre por via fluxo de massa até as raízes (VITTI *et al.*, 2006).

Os nutrientes minerais das plantas são classificados em função de suas características bioquímicas, no caso de S e N se encaixam no mesmo grupo, envolvendo oxidações e reduções. Basicamente, o processo de redução, incorporação e metabolização do S nas plantas, começa com a redução do sulfato em adenosina fosfossulfato (APS) com gasto de energia (ATP) e posteriormente esse APS é reduzido em fosfo adenosina fosfossulfato (PAPS) e em SO_3^{-2} . Depois da fase de redução, quando o SO_3^{-2} é transformado em S^{2-} , o qual é incorporado na cisteína que por sua vez será formar coenzimas e proteínas (MALAVOLTA, 1979).

Outra função do S é a proteção contra excesso de metais pesados, através de fitoquelatos. O S também é um composto volátil que contribui para o odor característico que desprende do alho, cebola, mostarda, abacaxi, etc (GRASSI, 2010).

Segundo Vitti *et al.* (2006), o S desempenha papel importante na estrutura de proteínas, as quais possuem três estruturas, a primária, secundária e terciária. Para realizar ligações de duas cadeias ou formar anéis em uma mesma cadeia, os aminoácidos que contêm S fornecem ligações de dissulfeto (cistina). O grupo sulfídrico (SH), por sua vez, afeta a estrutura secundária, configurando a cadeia de proteína ao redor do metal.

Presente em aminoácidos livres e em proteínas, o S pode desempenhar algumas das funções metabólicas nas plantas, como por exemplo ligar o substrato com uma enzima através do grupo SH, ou ainda ser importante em reações onde ocorre a transferência de radicais que contêm um C através do S-adenosil metionina (VITTI *et al.*, 2006; MALAVOLTA, 1979).

7.3. Deficiência de Enxofre no tecido vegetal

Diversos sintomas causados pela deficiência do S são semelhantes ao N, pelo fato de ambos os elementos constituírem proteínas incluindo diminuição do crescimento, clorose e acúmulo de antocianinas. Porém, existem diferenças entre essas deficiências, como por exemplo a clorose causada pelo S que ocorre inicialmente em folhas jovens e maduras, ao contrário do N que geralmente é em folhas velhas. Isso ocorre porque o S não é remobilizado com facilidade para as folhas jovens (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Diminuir a fotossíntese e a atividade respiratória são processos que afetam todo o metabolismo das plantas, levando a diversas consequências desde a redução na produção de proteínas, no teor de gordura, como na fixação do nitrogênio atmosférico, sendo o enxofre responsável por diversas reações dentro da planta que são capazes de causar esses tipos de distúrbios (VITTI *et al.*, 2006).

Com o passar dos anos, áreas com deficiência de S tem aumentado por diversos fatores (LOPES, 1998): alto uso de fertilizantes com pouca concentração de S; Imobilização de S decorrentes das práticas conservacionista; grande número de culturas que retiram S do solo.

7.4. Excesso de Enxofre no tecido vegetal

Accorsi e Haag (1959) verificaram modificações em cafeeiro com excesso de S, dentre essas modificações, notaram que o crescimento da planta não foi paralisado, o sistema radicular ainda mostrava-se profundo e havia desenvolvimento de galhos, porém os primeiros sintomas ocorreram em folhas mais velhas. As folhas revelaram uma série de manchas nos bordos de limbo com formas e tamanhos diversos e o ápice junto às suas adjacências apresentavam-se inteiramente de coloração amarronzada.

8. Referências Bibliográficas

- ACCORSI, W.R.; HAAG, H.P. "Alterações morfológicas e citológicas do cafeeiro (*Coffea arabica* L., var. Bourbon (B. Rodr.) Choussy) cultivado em solução nutritiva decorrentes das deficiências e excessos dos macronutrientes." **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, p. 17-36, 1959.
- ANDERSON, C.A. Noninfections (abiotic) diseases. Mineral deficiencies and toxicities. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, I.W., ed. *Compendium of citrus diseases*. St. Paul: APS Press, p.57-58, 1993.
- ARNON, D.I.; STOUT, P.R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. **Plant physiology**, v. 14, n. 2, p. 371, 1939.
- BARBER, S.A. *Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach*. 2 ed. New York, John Wiley & Sons, p. 414, 1995.

- BENINNI, E.R.Y; TAKAHASHI, H.W; NEVES, C.S.V.J. Manejo do cálcio em alface de cultivo hidropônico. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n.4, p. 605-610, 2003.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C.M. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, n. 11, p. 1396-1409, 2005.
- BRITTO, D.T. et al. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 7, p. 4255-4258, 2001.
- BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M. Funções do Cálcio e Magnésio em Plantas. In: VALE, D. W.; SOUSA, J. I.; PRADO, R. M. **Manejo de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas**. Jaboticabal: FCAV. p.425, 2010.
- CALEGARI, A.; HERNANI, L.C.; PITOL, C.; PRIMAVESI, O.; RESK, D.V.S. Manejo do material orgânico. In: SALTON, J. C.; HERNANI, L. C.; FONTES, C. Z. (Org.). Sistema plantio direto: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa – SPI, p.52-57., 1998.
- CLARKSON, D.T.; HANSON, J.B. The mineral nutrition of higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 239-298, 1980.
- DELÚ-FILHO, N. et al. Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 3, p. 185-190, 1998.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 641-664, 1999.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas. 3 ed. Londrina, Planta. p.403, 2006..
- EVANS, H.J.; SORGER, G.J. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. **Annual review of plant physiology**, v. 17, n. 1, p. 47-76, 1966.
- FAGOTTI, M. Nutrição e qualidade do fruto. **Citricultura Atual**, v.1, n.3, p.10, 1998.
- FERNANDES, M.S. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.432., 2006.
- FISCHER, E.S.; BUSSLER, W. Effects of magnesium deficiency on carbohydrates in *Phaseolus vulgaris*. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v. 151, n. 5, p. 295-298, 1988.

- GERENDÁS, J., SATTELMACHER, B. Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. Giromontiina). **Plant Soil**, v.196, p. 217-222, 1997.
- GIGON, A.; RORISON, I.H. The response of some ecologically distinct plant species to nitrate-and to ammonium-nitrogen. **Journal of Ecology**, p. 93-102, 1972.
- GRASSI, H.F. Funções do Nitrogênio e Enxofre nas Plantas. In: VALE, D. W.; SOUSA, J. I.; PRADO, R. M. Manejo de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. Jaboticabal: FCAV. p.425, 2010.
- GRUBER, B.D. GIEHL, R.F.H.; FRIEDEL, S.:VON WIRÉN, N. Plasticity of the Arabidopsis rootsystem under nutrient deficiencies. **Plant Physiology**, v. 163, p. 161-179, 2013.
- HAVLIN, J.L. et al. Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, p.515, 2005.
- JONES, R.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.; WAALAND, S. The Molecular Life of Plants. American Society of Plant Biologists, Wiley – Blackwell, UK, 2013.
- KEENEY, D.R. Nitrogen – availability index. In: PAGE, R.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (eds.). Methods of soli analysis. Chemical and microbiological properties. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy, p. 711-733, 1982.
- LANZA, M.H. Utilização de lodo de esgoto compostado e irrigação com água residuária em laranjeira 'valência'. 2013. 76f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Irrigação e Drenagem) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Luiz de Mesquita Filho”, Botucatu - SP, 2013.
- LEONARD, R.T. Absorption of potassium into root cells. R. D. Munson, ed. Amer. Soc. Agronomy, Crop Sci. Soc. America, Soil Sci. Soc. America. Madison, p. 1223, 1985.
- LI, S.X.; WANG, Z.H.; STEWAR, B.A. Responses of crop plants to ammonium and nitrate N. *Advances in Agronomy*, San Diego, v. 118, p. 205– 397, 2013.
- LIMA, S.S. Crescimento, Composição Mineral e Sintomas Visuais de Deficiências de Macronutrientes em Plantas de *Zingiber Spectabilis* Griff. Disertação de Mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém – PA, p.84, 2009.
- LINDHAUER, M.G. The role of potassium in the plant with emphasis on stress conditions (water, temperature, salinity). In: PROCEEDINGS OF THE POTASSIUM SYMPOSIUM. Pretoria, 1985. Proceedings. Pretoria, International Potash Institute and Fertilizer Society of South Africa, p. 95-113, 1985.
- LOPES, A.S. Manual Internacional de Fertilidade do Solo. Piracicaba, Instituto da Potassa & Fosfato, p. 79-85. 1998.

- MAFFEIS, A.R.; SILVEIRA, R.L. V.A.; BRITO, J.O. Reflexos das deficiências de macronutrientes e boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**, n.57, p. 87-98, 2000.
- MALAVOLTA, E. Potássio. Mg e S nos solos e culturas brasileiras. Piracicaba, Instituto da Potassa & Fosfato, p. 92, 1979.
- MALAVOLTA, E. Manual de química agrícola – adubos e adubação. São Paulo, Agronômica Ceres, p.596, 1981.
- MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo, Ceres, p.638, 2006.
- MALAVOLTA, E; VITTI, G.C; OLIVEIRA, S.A. Princípios, métodos e técnicas de avaliação do estado nutricional. In: MALAVOLTA, E; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, p. 115-230, 1997.
- MANICA, I. Fruticultura Tropical 5. Abacaxi. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.501, 1999.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N. F. Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Editora Universidade Federal de Viçosa, p. 306-308. 2005.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, p.674, 1986.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2 ed. London, Academic Press, p.889, 1995.
- MARSCHNER, H; ÇAKMAK, I. High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of zinc, potassium, and magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Journal of plant physiology**, v. 134, n. 3, p. 308-315, 1989.
- MELO, J.L.S.; LIMA, A.M.; MELO, H.N.S; ANDRADE NETO, C.O; LUCAS FILHO, M. Avaliação da remoção dos macronutrientes sódio, potássio, cálcio e magnésio em disposição controlada em solo. **Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro, ABES, v.1, p.6, 2000.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. 4 ed., Bern: International Potash Institute, p. 687, 1978.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principles of plant nutrition. Worblaufen-Bern: International Potash Institute, p.687, 1987.

- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principios de nutrición vegetal. Basel, Switzerland: International Potash Institute, p. 692, 2000.
- NAIFF, A.P.M. Crescimento, Composição Mineral e Sintomas Visuais de Deficiências de Macronutrientes em Plantas de *Alpinia Purpurata* cv. Jungle King. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural Da Amazônia. Belém, p.77, 2007.
- PALLARDY, S.G. Nitrogen metabolism. In: PALLARDY, S. G. Physiology of Woody Plants. 3. ed. San Diego: Elsevier, Chapter 9, p. 233-254, 2008.
- PRADO, R.M. Nutrição de plantas. São Paulo: Editora UNESP, 2008.
- RAIJ, B.V. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Ceres, 343p. 1991.
- RAO, I.M.; SHARP, R.E.; BOYER, J.S. Leaf magnesium alters photosynthetic response to low water potentials in sunflower. **Plant Physiology**, v. 84, n. 4, p. 1214-1219, 1987.
- RODRIGUEZ, O. Aspectos fisiológicos nutrição e adubação dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, R.F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.S., ed. Citricultura brasileira. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, p.419-475, 1991.
- SCHIMANSKY, C. Investigations into the translocation of magnesium (Mg-28) in sunflowers. *Z. Pflanzernähr*, p. 68-81, 1973.
- SFREDO, G.J.; LANTMANN, A.F. Enxofre: nutriente necessário para maiores rendimentos da soja. Embrapa Soja. Circular técnica, 2007.
- SOUZA, L.F. da S. Exigências edáficas e nutricionais. In: Cunha, G.A.P. da, CABRAL, J.R.S., SOUZA, L.F. da S. (orgs.) O abacaxizeiro, cultivo, agroindústria e economia. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, p. 67 – 82, 1999.
- STEVENSON, F.J. (ed.). Nitrogen in agricultural soils. Madison, Soil Science of American, p.567-604, 1982.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p.719, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, p.918, 2013.
- TROEH, F.R.; THOMPSON, L.M. Solos e fertilidade do solo. Andrei, 2007.
- VEIGA, D. Sintomas de deficiência de alguns nutrientes na cultura do milho (Parte I). REHAGRO – Recursos Humanos no Agronegócio. 2006. Disponível em: <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=72>> Acesso em: 02 de dezembro de 2016.
- VITTI, C.G.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, Magnésio e Enxofre. In: FERNANDES, M. S. Nutrição mineral de plantas. 22 ed. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.432, 2006.

- VITTI, C.G.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, Magnésio e Enxofre. In: FERNANDES, M. S. Nutrição mineral de plantas. 22 ed. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 432p. 2006.
- WALLINGFORD, W. Functions of potassium in plants. In: Potassium for Agriculture - A Situation Analyses. p. 10-27. Potash and Phosphate Institute. Athanta. p. 216, 1980.
- WANG, X.; BELOW, F.E. Cytokinins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. **Crop Science**, v. 36, n. 1, p. 121-126, 1996.
- WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.

CAPÍTULO 3

ESTRESSE MINERAL (MICRONUTRIENTES)

ENRIQUE ALONSO ZUÑIGA; RENAN LIMA DE SOUSA; LUIS GOMES; ADOLFO BERGAMO
ARLANCH; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

Para o desenvolvimento das plantas são necessários elementos que são utilizados em seu metabolismo que podem ser classificados em dois grupos sendo, os macronutrientes e os micronutrientes. O primeiro grupo representa aqueles utilizados em maior quantidade pelas plantas (N - Nitrogênio, P - Fósforo, K - Potássio, Ca - Cálcio, Mg - Magnésio, S - Enxofre), enquanto o segundo grupo reúne os elementos os quais as plantas necessitam em menores quantidades (B - Boro, Cl - Cloro, Cu - Cobre, Fe - Ferro, Mn - Manganês, Mo - Molibdênio, Ni - Níquel e Zn - Zinco). Esses elementos são retirados do solo atendendo a demanda do crescimento e reprodução adequados do vegetal (MARSCHNER, 1995; MENGEL; KIRKBY, 2000; EPSTEIN; BLOOM, 2005).

Atualmente sete elementos químicos são classificados como micronutrientes satisfazendo os três critérios propostos por Arnon e Stout (1939), sendo: boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn). É pertinente salientar que alguns autores consideram o cobalto (Co) e o níquel (Ni) como essenciais classificando-os no grupo acima. De forma geral os micronutrientes têm comportamento químico muito diferenciado, sendo dois não metais (Boro - em condições naturais ocorrendo como ácido bórico e cloro - em condições naturais, livre e monovalente). Os demais elementos são considerados metais pesados (Cu - ocorre como sulfetos, Fe - ocorre em óxidos, silicatos e sulfetos; B, forma sempre ligações covalentes; Mn - ocorre em silicatos e óxidos; Mo - metal de caráter aniônico em solos e minerais, ocorrendo também como sulfetos e Zn - ocorre como sulfetos e silicatos) (RAIJ, 1991).

Segundo López-Hernández *et al.* (1993), no Brasil, algumas situações indicam uma realidade de baixos níveis de micronutrientes disponíveis nos solos, com necessidade de reposições dos elementos. Dentre estes fatores, destaca-se a utilização de locais com baixa fertilidade devido à expansão agrícola aumento na produção; uso de fertilizantes com baixa concentração de micronutrientes; utilização de calcários contribuindo na insolubilização de micronutrientes.

É pertinente salientar que, por mais que os micronutrientes sejam requeridos pelas plantas em concentrações muito baixas, os mesmos desempenham a mesma importância que os macronutrientes, sendo fundamentais para o crescimento e pleno desenvolvimento das plantas. Além disso, estes elementos são responsáveis por atividades como ativadores de enzimas (Manganês e Zinco), constituintes de enzimas (Manganês, Ferro, Cobre e Níquel), constituintes das paredes celulares (Boro) e pivôs no processo da fotossíntese (Manganês, Ferro, Cobre e Cloro) (GRAHAM, 1983). Dentro deste contexto é pertinente salientar por menor as implicações da ausência ou mesmo excesso dos micronutrientes e suas respectivas consequências.

2. Ferro (Fe)

O Ferro (Fe) é um componente importante das proteínas que contem centros de ferro-enxofre [Fe-S] que participam da cadeia respiratória e em reações Redox. Além disso, é um constituinte de proteínas de ferro não prostético que tomam parte na fixação de N₂, fotossíntese e respiração (TAIZ; ZEIGER, 1991).

A toxidez por Fe aparece quando os níveis elevados do elemento se acumulam. Ele pode catalisar e agir através da reação de *Fenton* para gerar radicais hidroxilas, que pode danificar lipídios, proteínas e DNA. As espécies de plantas e os fatores relacionados com o meio de crescimento, tais como a idade das plantas, a acumulação de sulfureto de hidrogênio, ácidos orgânicos e outros agentes redutores também influenciam a ocorrência de toxicidade de ferro (SHARAWAT, 2004).

O ferro é um mineral essencial para plantas que é necessário em sistemas Redox biológicos (ASAD; RAFIQUE, 2000) e é também um componente vital de muitas enzimas que desempenham papéis importantes nos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas. Atua como cofator de enzimas chave, principalmente no processo da síntese

de reguladores de crescimento vegetal e participa em distintas reações de transferência de elétrons (KERKEB; CONNOLY, 2006). As plantas são sujeitas a diferenças variáveis na disponibilidade de ferro do ambiente devido à sua imobilidade. Portanto, acredita-se que tanto a inanição quanto as quantidades em excesso deste elemento geram estresse oxidativo (ABDEL-KADER, 2007), o que subsequente mente leva a vários distúrbios nutricionais que afetam a fisiologia da planta (BECKER; ASCH, 2005). A toxicidade de espécies reativas de oxigênio depende da presença de um catalisador de *Fenton*, como íons de ferro ou cobre que dão origem a radicais OH extremamente reativos na presença de H_2O_2 e O_2^- (CHEN; SCHOPFER, 1999). As espécies reativas de oxigênio (ERO) causam danos às proteínas, DNA, lipídios, clorofila e quase todos os outros constituintes orgânicos das células vivas (BECANA; MORAN; ITURBE-ORMAEXTE, 1998). As plantas protegem os sistemas celulares e subcelulares contra os efeitos citotóxicos dessas espécies reativas de oxigênio com enzimas antioxidantes e metabólitos, como carotenóides, ácido ascórbico, etc. (ALSCHER *et al.*, 1997).

Venkatesan *et al.* (2005) descobriram que altas concentrações de ferro podem resultar na formação localizada de complexos de polifenóis de ferro. Monteiro e Winterbourn (1988) encontraram que o excesso de quantidades de ferro deve ter catalisado a geração de espécies de radicais livres de O_2 ativo, o que pode ter eventualmente oxidado a clorofila e subsequente mente ter diminuído seu teor. Além disso, há relatos de diminuição no conteúdo de alguns pigmentos (carotenóides e clorofila) quando há um acréscimo das quantidades do ferro. Esta tendência é devido à uniformidade da síntese de pigmentos (WILKINSON; OHKI, 1988) e os carotenóides também atuam como metabólitos importantes que ajudam na proteção dos sistemas celulares e subcelulares das implicações citotóxicas destas EROs (AGARWAL *et al.*, 2006).

A amilase é uma enzima que participa no metabolismo de carboidratos. Hofner (1970) descobriu que a atividade da amilase diminuiu com o aumento das concentrações de ferro e isso se deve ao fato de que o ferro forma complexos em plantas com compostos de carboidratos como a maltose. A assimilação de NH_4^+ em aminoácidos ocorre através da atuação contígua de glutamina sintetase e glutamato sintase. Glutamato sintase catalisa a transferência de um grupo amida da glutamina para alfa-cetoglutarato para produzir duas moléculas de glutamato. Esta reação é acordada como a principal via de assimilação de nitrogênio em plantas (TEMPLE; VANCE; GANTT, 1998). Quando a atividade diminuiu, a formação de aminoácidos também diminuiu o

que levou à falta de assimilação de nitrogênio em plantas. Hemalatha *et al.* (2011) descobriram que em plantas de chá, a amilase, invertase, aspartato amino transferase e glutamato sintase também foram drasticamente afetadas pelo excesso de concentrações de ferro. Eles também relataram que quando a concentração de ferro diminuiu, a quantidade de pigmentos como clorofila e carotenóides foi reduzida. O teor de polifenóis, que desempenha um papel vital na qualidade do chá, também foi afetado pela formação localizada de um complexo Fe-polifenol.

Uma limitação do ferro causa o declínio de muitos componentes fotossintéticos, incluindo a ferredoxina Fe-S (Fd), que está envolvida nas vias oxidorreduativas essenciais dos cloroplastos (TOGNETTI *et al.*, 2006). Neste papel, é oxidado reversivelmente de Fe_2^+ a Fe_3^+ durante a transferência de elétrons. As plantas privadas de ferro geralmente desenvolvem sintomas cloróticos intervenais em folhas jovens, bem como a má formação de raízes, e quando grave, a deficiência leva ao retardo do crescimento, estase e morte (KOBAYASHI *et al.*, 2003). A clorose tem sido atribuída à inibição da síntese de clorofila, que requer a função de enzimas contendo ferro (REINBOTHE *et al.*, 2006). Contudo, a expressão de proteínas de ligação à clorofila e outros componentes fotossintéticos é regulada negativamente com independência relativa dos níveis de pigmento (THIMM *et al.*, 2001). A deficiência de ferro pode ocorrer em solos agrícolas em ambos os extremos da faixa de pH. Além disso, vários dos seguintes fatores contribuem individualmente ou em combinação para o desenvolvimento da clorose: baixa oferta de ferro; carbonato de cálcio no solo; bicarbonato no solo ou na água de irrigação; sobre a irrigação ou as condições de água registrada; níveis elevados de fosfato; altos níveis de metais pesados; temperaturas baixas ou altas; intensidades de luz elevadas; níveis elevados de nitrogênio nitrato; desequilíbrios nas relações catiónicas; má ventilação do solo; certas adições de matéria orgânica ao solo; vírus; e danos radiculares por nematóides e outros organismos (WALLACE; LUNT, 1960; EMBLETON *et al.*, 1973).

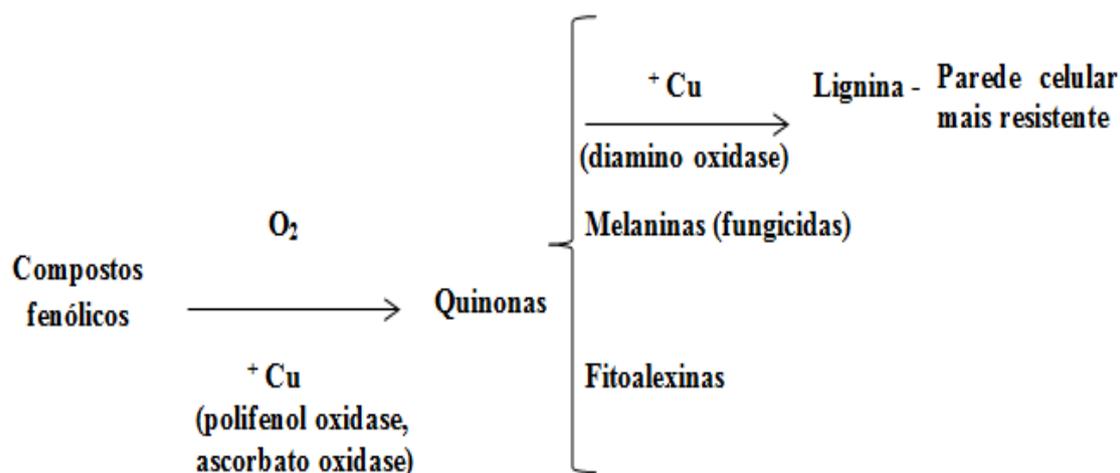
3. Cobre (Cu)

O Cobre (Cu) é um micronutriente que permite a transferência de elétrons ($Cu^{2+} + e^- \leftrightarrow Cu^+$), forma quelatos altamente estáveis e tem funções semelhantes às do Fe,

principalmente em alguns processos de oxido-redução (KIRKBY; ROMHELD, 2007). Além disso, o cobre está ligado a algumas enzimas que reagem com o oxigênio molecular e catalisando processos terminais de oxidação (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Contudo, quando há excesso de cobre pode haver danos em membranas celulares, pois ocorre ligação com os grupos sulfidril das proteínas de membrana e ocorrendo a peroxidação de lipídios. Desta forma, ocorrerá aumento na atividade das enzimas antioxidativas tais como superóxido dismutase, catalase e peroxidase (SALISBURY ; ROSS, 1992).

Recentemente, as enzimas desempenham um papel essencial, especialmente a Super Oxido Dismutase (SOD), pois ajuda na desintoxicação de radicais superóxido, reduzindo os danos que pudessem causar as células vegetais (CAKMAK, 2000). Como exemplo, quando há ausência de cobre a atividade da enzima Cu/Zn-SOD (situada no estroma do cloroplasto) torna-se muito baixa, pois o elemento participa no processo de desintoxicação de O₂ gerado na fotossíntese. Desta forma, a baixa atividade enzimática não consegue evitar danos severos às células.

Outras enzimas como a polifenol oxidase, ascorbato oxidase e diamino oxidase (na parede celular) também contem cobre e são importantes, sobretudo nas vias biosintéticas desde fenol via quinona, até substâncias melanóticas e lignina como



mostrado na **Figura 3.1** (KIRKBY; ROMHELD, 2007).

Figura 3.1. Atuação do cobre na transformação de compostos fenólicos. *Fonte:* Adaptado de Kirkby e Romheld (2007).

Conforme descrito na Figura 3.1., quando existe uma insuficiência de Cu a atividade das enzimas diminui, induzindo ao acúmulo de fenóis, redução da lignificação e de melaninas. Este micronutriente desempenha uma função extraordinária, pois atribui à planta resistência a doenças que podem causar danos significativos.

4. Silício (Si)

O segundo elemento mais abundante é o Silício, e tem-se mostrado importante para as plantas, apresentando uma série de efeitos benéficos, ajudando na produção e crescimento das mesmas.

Para as plantas, esse elemento foi classificado como benéfico ou útil, assim não sendo absolutamente necessário no sistema para que tenha ciclo vegetal completo. Contudo, estudos afirmam que há eficiência do elemento bem como na melhoria de aspectos relacionados à estruturação e morfologia, quanto ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas, principalmente àquelas acumuladoras de Si, como gramíneas, onde estudos avaliando seu efeito vêm sendo excessivamente realizados, entretanto, plantas leguminosas vêm, também, sobressaindo nas pesquisas (MARSCHNER, 1995).

Analisando por outra perspectiva, segundo Epstein e Bloom (2005), esse elemento assume o segundo dos critérios da nova definição de essencialidade dos nutrientes. Com a ausência do Si a planta apresenta anomalias em sua fase de crescimento, desenvolvimento ou reprodução, comparando as com plantas bem nutridas desse elemento. Assim, o elemento silício é considerado de grande valia para o desenvolvimento de algumas culturas, exclusivamente as gramíneas, consideradas plantas acumuladoras de Si, como trigo, cana-de-açúcar, arroz, etc.

Nas plantas, relacionou-se a função do Si à alta resistência ao acamamento, também diminuindo o ataque de doenças e pragas (por conta do maior grau de lignificação ou no caso silicificação, e espessamento das células epidérmicas), maior resistência a situações causadas por estresse abiótico e biótico, como menos dano causado pela geada, ocorre também uma menor taxa de evapotranspiração (com o déficit hídrico), e ainda favorece a nodulação nas leguminosas (EPSTEIN; BLOOM, 2005; MALAVOLTA, 2006).

Muitos trabalhos têm demonstrado benefícios com a adição de silício, em especial nas culturas de arroz, cana-de-açúcar, cevada, milho, sorgo e trigo (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001; GONG *et al.*, 2005; HATTORI *et al.*, 2005), que podem ser chamadas de acumuladores de Si.

Estudos demonstram que o ácido monossilícico (H_4SiO_4), é a forma preferencial para que as plantas absorvam o silício. Em solos ácidos é encontrado em uma forma não dissociada, sendo sua disponibilidade afetada pela temperatura, concentração de Si na solução, pH e teor de matéria orgânica no solo (JONES; HANDRECK, 1967).

Maiores concentrações de Si podem ser encontradas no caule e nas folhas e em baixas concentrações nos grãos. Ácido silícico polimerizado é a forma em que se encontra 99% de todo elemento na planta.

Como exemplo, podemos citar os benefícios do Si proporcionados à cultura do arroz: maior resistência a condições adversas, como estresse hídrico, incidência de doenças e pragas, salinidade, entre outros. Além disso, observa-se redução no surgimento de flores estéreis e também aumento na taxa fotossintética por conta de plantas mais rígidas e eretas, devido ao aumento da área de interceptação de luz. Tais efeitos podem estar relacionados à formação e acúmulo de uma camada de sílica nas folhas, logo abaixo da cutícula (LIANG *et al.*, 2007).

A literatura indica que o silício pode ser eficiente no combate da deficiência hídrica. Foi observado por Gao *et al.* (2006), a interação positiva no depósito de silício nas folhas e a diminuição da transpiração na cultura do trigo, em diferentes regimes hídricos. O silício pode, além disso, diminuir a toxicidade proveniente dos metais pesados, como alumínio (Al), ferro (Fe) e manganês (Mn) (HODSON; EVANS, 1995). Já foi evidenciado nas culturas de feijão-caupi, pepino e arroz a eficiência desse elemento em neutralizar esses metais (LIANG *et al.*, 2007).

Conforme GUNES *et al.*, 2008, em eventos de estresse salino e/ou hídrico, o silício parece estar envolvido nas atividades fisiológicas ou metabólicas das plantas. A aplicação de silício em gramíneas sob condições de pouca umidade levou ao aumento da capacidade fotossintética e também dos níveis de enzimas antioxidantes e conteúdo de clorofila. A planta que tem uma maior concentração das enzimas antioxidantes, tratadas com silício, desenvolveu tolerância a este tipo de estresse (SCHMIDT *et al.*, 1999).

A consequência do uso de Silício é a redução da toxidez de elementos como alumínio, já que pode ocorrer dentro da planta por estímulo do sistema antioxidante, complexação dos íons metálicos, imobilização destes metais durante o desenvolvimento vegetal ou compartimentação em vacúolos, citoplasma (NEUMAM; NIEDEN, 2001) ou parede celular (LIANG *et al.*, 2007).

Conforme Hodson e Sangster (1999), em pH próximo a 7 (neutro) o alumínio e o silício podem formar hidroxialuminossilicatos (HAS), podendo reduzir a toxidez do Al, como mostrado na equação abaixo (**Figura 3.2**):



Figura 3.2. Equação demonstrando a formação de hidroxialuminossilicatos (HAS).

Fonte: Adaptado de Hodson e Sangster (1999).

5. Molibdênio (Mo)

O Molibdênio (Mo) não é encontrado naturalmente como metal livre, estando em sua forma oxidada Mo^{4+} e Mo^{5+} com baixa solubilidade em água. O elemento é classificado como micronutriente com grande importância no processo de produção de uma cultura, e sua deficiência está relacionada com condições de baixo valor de pH do solo.

Nos estudos aprofundados a respeito das atividades do Mo, é possível elencar sua participação no processo de atividade da nitrato redutase e nitrogenase. As enzimas contendo Mo podem ser definidas como proteínas multicentro de transferência de elétrons, sendo primordiais no processo da nitrogenase reduzindo o nitrogênio a amônia e gás hidrogênio livre (PESSOA *et al.*, 2000).

A enzima nitrato redutase, responsável pela redução de NO_3 a NO_2 , atua no citoplasma, tendo forma de uma enzima dímérica, com três grupos prostéticos sendo um deles o Mo, que são transferidores durante a redução diretamente do Mo para o nitrato (**Figura 3.3**).

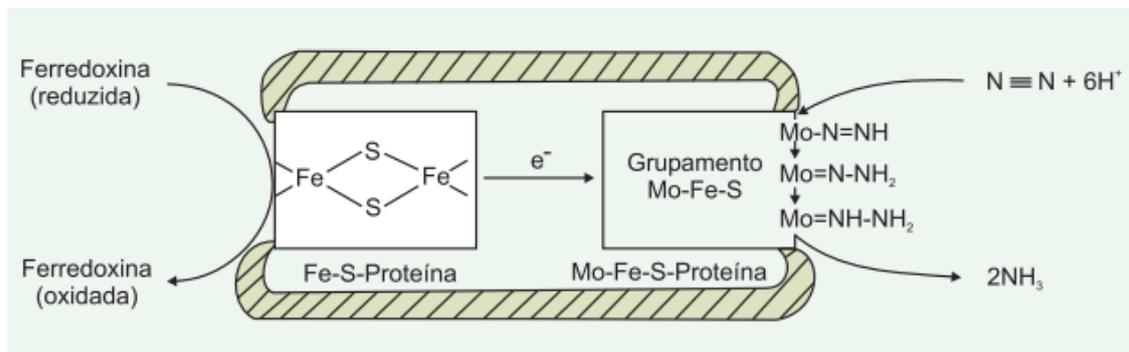


Figura 3.3. Modelo da redução em etapas de N_2 . Fonte: Kirkby e Römheld (2007).

Plantas deficientes em Mo, devido a menor atividade da Nitrato Redutase, podem acumular o NO_3 e apresentar deficiência de N. A concentração de Mo nos nódulos radiculares das leguminosas é muito maior que nas suas folhas, devido a sua participação na atividade da Nitrogenase. Outra função do Mo nas plantas tem sido relatada, com envolvimento na síntese de ácido ascórbico (Vitamina C) e de açúcares (TANNER, 1979).

A localização dos sintomas de deficiência de Mo varia com as espécies. As leguminosas podem apresentar clorose nas folhas velhas, similar à deficiência de N. Clorose molhada e manchas amarelo-esverdeadas em folhas velhas também tem sido relatadas. No gênero brássica, o “rabo de chicote”, onde cresce apenas a nervura principal, é o sintoma típico da deficiência de Mo (LEYDECKER *et al.*, 1995).

6. Manganês (Mn)

A absorção do Manganês (Mn) pelas raízes se dá na forma de Mn^{+2} , sofrendo o transporte pelo xilema nessa mesma forma. Por ser pouco difundido na planta, os sintomas de deficiência de Mn se manifestam nas folhas novas. O micronutriente atua como cofator de enzimas fosforilativas (fosfoquinases e fosfotransferases), formando uma ponte entre o ATP e as enzimas. Descarboxilases e Desidrogenases que atuam no Ciclo de Krebs são ativadas pelo Mn.

De forma geral, deficiências leves de Mn interferem na fotossíntese e reduzem o nível de fotoassimilados solúveis na planta. Porém, a reposição dos níveis deste micronutriente permite a retomada fotossintética. Com escassez mais intensa de Mn, no

entanto, ocorre a desestruturação do cloroplasto que uma vez iniciada é irreversível (**Figura 3.4**). Por causa da grande importância do Mn no sistema de transporte de elétrons através da fotossíntese, quando ocorre a insuficiência deste elemento, a reação à luz durante a fotossíntese é fortemente afetada e todas as outras reações ligadas ao transporte de elétrons também o são prejudicadas. Isto compreende a fotofosforilação, a redução de CO₂, de nitrito e de sulfito. O nitrito acumulado pode gerenciar o *feedback* sobre a nitrato redutase de tal maneira que o NO₃⁻ se acumula, como algumas vezes é observado em plantas deficientes em Mn. O Mn também exerce papel considerável como co-fator para muitas enzimas-chave na biossíntese dos metabólitos secundários da planta correlacionados com a via do ácido chiquímico, inclusive aminoácidos aromáticos fenólicos, cumarinas, ligninas e flavonóides (BURNELL, 1988). Portanto, concentrações reduzidas de compostos fenólicos, lignina e flavonóides foram encontradas em tecidos com deficiência em Mn, o que pode, parcialmente, ser o motivo de maior sensibilidade a doenças em plantas subnutridas por este micronutriente (GRAHAM, 1983).

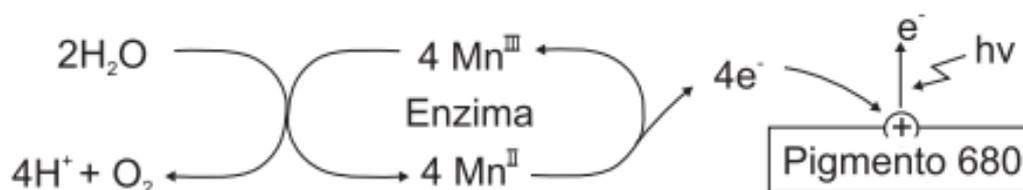


Figura 3.4. Atividade do manganês na reação de quebra da molécula de água. *Fonte:* Kirkby e Römheld (2007).

De forma visual os sintomas de deficiência de Mn podem ser observados nas folhas novas, como uma clorose internerval (**Figura 3.5**), formando o reticulado grosso: além das nervuras, umas estreitas faixas de tecido ao longo das mesmas permanecem verdes. Em solos ácidos, principalmente nas dicotiledôneas, é comum o aparecimento de sintomas de toxidez de Mn, que se manifesta inicialmente como deficiência de Fe induzida, e só posteriormente, como toxidez. Este se caracteriza por pontuações de cor marrom no limbo das folhas novas, que se tornam necróticas, cercadas por zonas cloróticas.



Figura 3.5. Foto de clorose internerval na cultura de pimentão em estufa. *Fonte:* Autores do capítulo (2016).

7. Boro (B)

O Boro (B) é um dos micronutrientes limitantes na produtividade agrícola no Brasil, principalmente as que são conduzidas em solos de textura mais arenosa, pois o mesmo tende a uma maior mobilidade no perfil do solo por consequência de lixiviação (BLEVINS; LUKASZENWSKI, 1998).

Este micronutriente é encontrado em diversas rochas, na forma de boratos ou borossilicatos, e se apresenta maior concentração em solos derivados de granitos do que em solos basálticos.

Algumas das principais funções que envolvem o boro são: metabolismo de carboidratos, transportador de vários açúcares pelas paredes celulares; síntese de ácidos nucléicos (DNA e RNA), hormônios vegetais, divisão celular e formação de paredes, processo de florescimento e frutificação, e ainda pode intervir na absorção de água e outros cátions como o Cálcio.

O sistema de incorporação do boro e os fatores restritivos à distribuição nas plantas ainda não são bem conhecidos; porém, sabe-se que a disponibilidade do boro na solução do solo é gerenciada pela reação de adsorção do boro com os colóides do solo à qual pode aumentar conforme teor de argila e pH do solo.

O fluxo do B nos tecidos vegetais ocorre pelo xilema assim como grande parte dos minerais absorvidos pelas raízes. Este é predominantemente conduzido pelo

processo de transpiração e é conseqüentemente afetada pelas condições climáticas tais como: temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e quantidade de água disponível no solo (ASAD *et al.* 2001).

Tem-se notado em vários estudos, que a concentração do boro, em plantas que não sofreram estresse por deficiência ou excesso do mesmo, diminui gradativamente das folhas mais velhas para as juvenis. Além do que, indícios de falta do mesmo aparecem em tecidos meristemáticos, enquanto sintomas de excesso do nutriente surgem primeiramente nas bordas de folhas mais velhas (MARSCHNER, 1995; SHELPS *et al.*, 1995).

8. Cloro (Cl)

Embora associado à um macronutriente devido sua alta concentração nos tecidos vegetais, o cloro (Cl) é utilizado pelas plantas em quantidades muito baixas e é classificado como um micronutriente. Em estudos realizados por Broyer *et al.* (1954) revelam que a quantidade necessária para o desenvolvimento ótimo das plantas fica em torno de 100 a 200 mg Kg⁻¹.

Mesmo sendo um importante co-fator na quebra de água durante o processo de fotossíntese, em nível de campo não foram encontrados registros de deficiência desse mineral. Isso se deve ao fato, talvez, de sua ampla abundância. Outra função observada do cloro está no balanço de cargas e controle de fechamento estomático em palmeiras e na cebola, por exemplo, quando submetidas à um estresse hídrico por escassez de água (RÖMHELD e MARSCHNER, 1991).

Em estudos laboratoriais realizados por Bergmann (1992) e Faquin (2004), o murchamento, bronzeamento e clorose ocorrem nas plantas entre folhas jovens ou velhas. Estes sintomas, embora sejam similares à deficiência de manganês, podem ser diagnosticados como sintomas de deficiência de cloro.

9. Referências Bibliográficas

- ABDEL-KADER, D.Z.E.A. Role of nitric oxide on iron homeostasis, chlorophyll biosynthesis and antioxidants system in two wheat cultivars. **Am. J. Plant Physiol.**, v.2, p. 237-250, 2007.
- AGARWAL, G.S.; KUMAR, H.; CHAUDARI, S. Biosorption of aqueous chromium (VI) by *Tamarindus indica* seeds. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 949-956, 2006.
- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 224-233, 1997.
- ARNON, D.I.; STOUT, P.R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plant with special reference to copper. **Plant Physiol.**, v. 14, p. 371-375, 1939.
- ASAD, A.; RAFIQUE, R. 2000. Effect of zinc, copper, iron, manganese and boron on the yield of yield components of wheat crop in tehsil Peshawar. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 3, p. 1615-1620, 2000.
- ASAD, A.; BLAMEY, F.P.C.; EDWARDS, D.G. Boron nutrition of sunflower crops. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, 14., **SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE A CULTURA DO GIRASSOL**, 2., 2001, Rio Verde. Resumos... Rio Verde: FESURV/IAM, p.14-19, 2001.
- BECANA, M.; MORAN, J.F.; ITURBE-ORMAEXTE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant Soil**. v. 201, p. 137-147, 1998.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice—conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 168, n.4, p. 558-573, 2005.
- BERGMANN, W. Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, p. 741, 1992.
- BLEVINS, D.G.; LUKASZEWSKI, K.M. Boron plant structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.481-500, 1998.
- BROYER, T.; CARLTON, A.B.; JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R. Chlorine – a micronutrient element for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 29, p. 526-532, 1954.
- BURNELL, J.N. The biochemistry of manganese in plants. In: GRAHAM, R. D.; HANNAM, R. J.; UREN, N. C. Manganese in soils and plants. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**, p. 125-137, 1988.

- CAKMAK, I. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. **New Phytologist**, Cambridge, v. 146, p. 185-205, 2000.
- CHEN, S.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions, **Eur. J. Biochem.**, v.260, n.3, p. 726-735, 1999.
- EMBLENTON, T.W.; JONES, W.W.; LABANAUSKAS, C.K.; REUTHER, W.J. Leaf analysis is a diagnostic tool and guide to fertilization. In REUTHER, W.J, ed., *The citrus industry*. Vol. 3. Berkeley: University of California Division of Agricultural Sciences Press. p.183-211, 1973.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. Sunderland: Sinauer Associates, p. 400, 2005.
- FAQUIN, V. *Nutrição Mineral e Diagnose do Estado Nutricional das Hortaliças*/Valdemar Faquin, Alex Teixeira Andrade. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.
- GAO, X. et al. Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.29, p.1637–1647, 2006.
- GONG H. et al. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. **Plant Sci.**, v.169, p.313-321, 2005.
- GRAHAM, R.D. Effect of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. **Advances in Botanical Research**, London, v. 10, p. 221-276, 1983.
- GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**. v.32, p.481-494, 2005.
- GUNES, A.; PILBEAM, D.J.; INAIL, A.; COBAN, S. Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, in growth, antioxidant mechanisms, e lipid peroxidation. **Comunication in Soil Science and plants Analysis**, New York, v.39, n.13-14, p. 1885-1903, 2008.
- HATTORI T. et al. Application of silicon enhanced drought tolerance in Sorghum bicolor. **Physiol. Plant.**, v.123, p.459-466, 2005.
- HEMALATHA, K.; VENKATESAN, S. Impact of iron toxicity on certain enzymes and biochemical parameters of tea. **Asian J. Biochem.**, v.6, p. 384-394, 2011.
- HODSON, M.J.; EVANS, D.E. Aluminium/silicon interactions in higher plants. **J. Exp. Bot.**, v.46, p.161–171, 1995.
- HODSON, M.J.; SANGSTER, A.G. Aluminium/silicon interactions in conifers. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 76, p. 89-98, 1999.
- HOFNER, W. Eisen und manganhaltige verbindungen im blutungassafit von Helianthus annuus, **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 23. p. 673-677, 1970.

- JONES, L.H.O.; HANDRECK, K.A. Silica in soils, plants, and animals. **Adv. Agron.**, v.19, p.107-149, 1967.
- KERKEB, L.; CONNOLY, E. 2006. Iron transport and metabolism in plants. **Genet. Eng.**, v. 27, p. 119-140, 2006.
- KIRKBY, E.A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: Funções absorção e mobilidade. **Inf. Agron.**, v. 118, p.1-24, 2007.
- KOBAYASHI, T.; NAKAYAMA, Y.; ITAI, R.N.; NAKANISHI, H.; YOSHIHARA, T.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. Identification of novel cis-acting elements, IDE1 and IDE2, of the barley IDS2 gene promoter conferring iron-deficiency-inducible, root-specific expression in heterogeneous tobacco plants. **Plant J.** v.36, p.780–793, 2003.
- LEYDECKER, et al. Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. **Plant Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1427-1431, 1995.
- LIANG, Y. et al. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. - **Environ. Pollut.** v.147, p.422-428, 2007.
- LÓPEZ-HERNÁNDEZ, E.; MEDINA, C.; INFANTE, D.; SEQUERA, M.; NIÑO, O.; VALLEJO-TORRES. Nutrient cycles in a sugarcane agroecosystem. M.G. Paoletti, W. Foissner, D. Coleman (Eds.), Soil biota, nutrient cycling, and farming systems, Lewis Publishers, Florida, p. 147–156, 1993.
- M.G. Paoletti, W. Foissner, D. Coleman (Eds.), Soil biota, nutrient cycling, and farming systems, Lewis Publishers, Florida (1993), pp. 147–156
- MA, J.F; MIYAKE, Y. & TAKAHASHI, E. Silicion as a beneficial elemnete for crop plantas, In: DATANOFLF, L.E.; SNYDER, G.H. & KORNDORFER, G.H. (Eds). Silicon in Agricultres. The Nertherland, Elsevier Science, p. 17-39, 2001.
- MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: Editora Ceres, p.631, 2006.
- MARSCHNER H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. New York: Academic Press, p.379-396, 1995.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Principios de nutrición vegetal. Basel, Switzerland: International Potash Institute, p.692, 2000.
- MONTEIRO, H.P; WINTERBOURN, C.C. The superoxide-dependent transfer of iron from ferritin to transferritin. *Biochemical Journal*, London, v. 256, p. 923-928, 1988.
- NEUMAM, D.; NIEDEN, U. Silicon and heavy metal tolerance of higher plantas. **Phytochemistry**, v.56, p.685-692, 2001.
- PESSOA, A.C.S.; RIBEIRO, A.C.; CHAGAS, J.M.; CASSINI, S.T.A. Concentração foliar de molibdênio e exportação de nutrientes pelo feijoeiro “Ouro Negro” em

resposta à adubação foliar com molibdênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa**, v.24, n.1, p.75-84, 2000.

RAIJ, B. V. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Ceres, p.343, 1991.

REINBOTHE, C; BARTSCH, S; EGGINK, L.L; HOOBER, J.K; BRUSSLAN, J; ANDRADE-PAZ, R; MONNET, J.; REINBOTHE, S. A role for chlorophyllide a oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll a/b proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 4777-4782, 2006.

RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Functions of micronutrients in plants. In: MORTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M.; WELCH, R. M. (Ed.). *Micronutrients in agriculture*. 2. ed. Madison: SSSA, p. 297-328, 1991.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. *Plant physiology*. 4.ed. Califórnia: Wadsworth Publishing Company, p.682, 1992.

SHELP, B.J. et al. Boron mobility in plants. **Physilology Plantarum**, v.94, p.356-361, 1995.

SCHMIDT, R.E.; ZHANG, X.; CHALMERS, D.R. Responde of ptotosynthesis and superoxide dismutase applied to creeping bentgrass grown under two fertility levels. **Journal of Plants Nutrition**, v.22, p. 1763-1773, 1999.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v.10 n.10, p.308-13, 2004.

SAHRAWAT, K.L. Iron toxicity in wetland rice and the role of other nutrients. **J. Plant Nutr.**, v. 27, p. 1471-1504, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc. Redwood City, Calif., USA, p. 565, 1991.

TANNER, P.D. The effect of molybdenum on maize seed quality. **Rhodesian Journal of Agricultural Research**, v.17, n.1, p.125-129, 1979.

TEMPLE, S.J; VANCE C.P; GANTT, J.S. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. **Trends in Plant Science**. v. 3. p.51-56, 1998.

THIMM, O.; ESSIGMANN, B.; KLOSKA, S.; ALTMANN, T.;BUCKHOUT, T.J. Response of Arabidopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis, **Plant Physiol.**, v.127, p.1030-1043, 2001.

TOGNETTI, V.B.; PALATNIK, J.F.; FILLAT, M.F.; MELZER, M.; HAJIREZAEI, M.-R.; VALLE, E.M.;CARRILLO, N. Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance. **Plant Cell**, v. 18, p. 2035-2050, 2006.

VENKATESAN, S.; MURUGESAN, S.; SENTHUR PANDAIN, V.K.; GANAPATHY, M.N.K. Impact of sources and doses of potassium on

biochemical and Greenleaf parameters of tea. **Food Chemistry**, v. 90, p. 535-539, 2005.

WALLACE, A.; LUNT, O.R. Iron Chlorosis in horticultural plants. A review. **Proc Am Soc Hortic Sci** , v.75, p. 819-841, 1960.

WILKINSON, R.; OHKI, K. Influence of manganese deficiency and toxicity on isoprenoid synthesis. **Plant Physiol.**, v.87,p. 841-846. 1988.

CAPÍTULO 4

MECANISMOS MORFOLÓGICOS E METABÓLICOS EM VEGETAIS PARA ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE SALINO

CARLA VERÔNICA CORRÊA; THAIS ARRUDA COSTA JOCA; MICHELY DA SILVA ALVES;
MARIA VITÓRIA BARROS SIFUENTES; ANGÉLICA LINO RODRIGUES; FERNANDO
BROETTO.

1. Introdução

O aumento da concentração de sais no solo pode torná-lo improdutivo (SANTANA *et al.*, 2007) e dessa forma, afetar negativamente o desenvolvimento vegetal, sendo, portanto, um dos estresses abióticos mais limitantes para a agricultura. Dessa forma, a salinidade pode afetar de diferentes formas as plantas cultivadas, e em diferentes fases do seu desenvolvimento, comprometendo desde a germinação, até o seu crescimento e produção (AYERS; WESTCOT, 1999). Quanto aos níveis de sensibilidade ao acúmulo salino, as plantas são distribuídas em quatro diferentes grupos: sensíveis, moderadamente sensíveis, moderadamente tolerantes e tolerantes ou resistentes. Ambas as classificações são relacionadas à condutividade elétrica do extrato de saturação do solo, ou seja, correspondente à quantidade de sal concentrada ali (AYERS; WESTCOT 1999; CAVALCANTE *et al.*, 2007).

Há uma vasta diversidade de ambientes salinos continentais e marinhos. A proximidade a oceanos (a maresia influencia a salinidade dos ambientes continentais), lagos salinos e pequenos corpos de água (charcos, poças, pântanos) pode gerar solos salinos e assim desencadear nas plantas que ali habitam, respostas a estas condições abióticas (LARCHER, 2000; ISAYENKOV, 2012). A evaporação que ocorre em regiões áridas e semi-áridas, ao longo do ano, gera salinidade no solo (LARCHER, 2000; JOLLY; HASSAM, 2009). Isso acontece devido à evaporação ser maior que a

precipitação que se infiltra nesse mesmo solo (LARCHER, 2000), sendo classificada como salinidade primária (acumulação de sais naturalmente) (ISAYENKOV, 2012).

Os solos salinos das regiões úmidas, pântanos e estuários, numa escala local, apresentarão variações sazonais na salinidade ao longo do tempo (RYAN; BOYER, 2012). Essas variações podem ocorrer por eventos ambientais naturais mas também pode haver uma origem secundária (antrópica). A salinidade secundária causada pelas práticas agrícolas é a mais comum observada nas áreas antropizadas (e.g. áreas intensamente irrigadas onde há uma quantidade considerável de sal na água de irrigação e uma drenagem insuficiente), podendo diminuir a produtividade das culturas agrícolas bem como dos ecossistemas nativos que ocorrem em seu entorno (BARRETT-LENNARD, 2002; RYAN; BOYER, 2012). É interessante salientar que as interações interespecíficas como a inoculação de micorrizas resistentes a ambientes salinos em espécies cultivadas como o milho, confere a estas plantas uma melhor adaptação a áreas degradadas salinizadas (ESTRADA *et al.*, 2013).

2. Decorrências das Elevadas Concentrações de Sais

Em níveis elevados de sais a água encontrada no solo fica cada vez menos acessível ao vegetal. Isso ocorre devido ao elevado potencial osmótico no solo, fazendo com que esse potencial seja superior ao presente na planta e desta forma, a água não entra não passa para o sistema radicular. Assim, em condições de estresse salino tem-se também o estresse hídrico. Assim, plantas que se desenvolveram ao longo dos séculos em regiões salinas, desenvolveram estratégias de adaptação a esses ambientes, como o acúmulo de sal em estruturas como vacúolo, compensando os baixos potenciais osmóticos dos solos salinos (PARIDA; DAS, 2005). Desta forma, em muitas espécies, em especial as dicotiledôneas, ocorre o acúmulo de Na^+ , outros íons (K^+ , Cl^- e SO_4^{2-}) e açúcares o que diminui o potencial osmótico e hídrico da célula, fazendo com que seja menor que o potencial osmótico e hídrico do solo o que permite a absorção de água do solo pela planta (MARSCHENER, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Essa capacidade de acumular íons é denominada de compartimentalização e ocorre nos vacúolos. Entretanto, outros solutos como prolina, outros aminoácidos e açúcares solúveis precisam se acumular no citoplasma para manter a homeostase, ou

seja, o equilíbrio dentro da célula (GAO *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2002). Os carboidratos solúveis e os aminoácidos contribuem para a proteção das biomembranas, do material genético e das proteínas em relação aos efeitos deletérios da alta concentração iônica (BOTELLA *et al.*, 1994; BOHNERT *et al.*, 1995; DUBEY; SINGH, 1999). Outro aspecto importante é que ao compartimentalizar esses íons no interior do vacúolo tornam-se possível a expansão celular, pois esse acúmulo de íons no vacúolo permite a entrada de água o que aumenta o volume vacuolar contribuindo para a expansão celular, sendo essencial este mecanismo para garantir o crescimento do vegetal mesmo em situações de déficit hídrico resultante do estresse salino (SALISBURY; ROSS, 1991).

As respostas ao estresse salino além de complexos são diferenciadas em relação à genética da planta. Algumas espécies podem apresentar alta tolerância à salinidade, outras não possuem tolerância desenvolvida, e são altamente susceptíveis. Assim, as plantas são classificadas em *natrofilicas ou halófitas* e *natrofóbicas ou glicófitas* em relação à resposta de crescimento deste vegetal em relação às concentrações de sódio e ao transporte a longa distancia na parte aérea. As glicófitas ou natrofóbicas apresenta perda na taxa de crescimento quando a salinidade é acima de 10 mM. Já as halófitas ou natrofilicas são acondicionadas em ambientes cuja concentração de sal varia de 50 a 500 mM. Quando se fala em potencial água, as halófitas ou natrofilicas crescem em locais aos quais o potencial varia entre -1,0 e -2,5 MPa e, em condições severas, chega a -5,0 MPa. Esta capacidade se deve justamente ao acúmulo de Na⁺ no vacúolo que contribui para a redução do potencial água, permitindo que a planta absorva água destes substratos (MARSCHENER, 1995). Isso porque, o principal mecanismo para tolerar o excesso de sal é a redução do influxo de Na⁺ da solução externa (p.ex. solo) para o citosol, e concomitantemente o aumento do fluxo de Na⁺ do citosol para o vacúolo (MUNNS; TESTER 2008).

Apesar de muitas espécies possuírem mecanismos de ajuste osmótico, ocorre o fechamento do estômato quando a planta entra em condições estressantes, reduzindo a fotossíntese e a translocação de nutrientes pela planta (SILVA, 2002).

A salinidade influencia todo o metabolismo durante o ciclo de vida da planta. A forma com a planta lida com o excesso de sal envolve alterações na sua fisiologia, morfologia, anatomia e metabolismo. Também causa alterações na composição de aminoácidos, afeta a dinâmica estomática, e reduz severamente a quantidade de água transpirada pelas plantas durante seu ciclo (LACERDA, 2003; SILVA, 1998). Esta redução pode estar relacionada com o tempo de estresse e com as alterações dos

parâmetros morfofisiológicos tais como área foliar, densidade dos estômatos, condutância estomática e transpiração (GARCÍA LEGAZ *et al.*, 1993; ROMERO ARANDA *et al.*, 2001).

A maior parte das espécies são sensíveis à salinidade e praticamente não são capazes de suportar condições de salinidade permanente no solo (KRAMER, 1984). Quando aumentado os níveis de NaCl, todos os aspectos de crescimento das plantas (altura, número de folhas, peso seco das raízes, caules e folhas) são reduzidos significativamente (HANSEN; MUNNS, 1988).

As plantas durante o seu desenvolvimento são afetadas em duas fases, sendo que na primeira, sinalizações advindas da raiz (principalmente pelo hormônio ABA) determinam o crescimento irregular da planta devido aos sais que estão no exterior. Já a segunda fase é caracterizada pela diminuição das taxas de crescimento oriunda do excesso de sais no interior da planta (GOMES FILHO, 2010).

A salinidade provoca a seca fisiológica, que está relacionada à redução da absorção de água pelas raízes, mesmo o solo estando úmido. À medida que o solo perde umidade, a concentração de sais e o efeito da salinidade são maiores. (SOARES, 2007).

3. Resistência à Salinidade e Mecanismos de Sobrevivência em Solos Salinos

A salinização é um dos maiores problemas ambientais para a produção agrícola. Em plantas submetidas ao estresse salino, a fotossíntese, a síntese proteica, metabolismo de lipídios e de energia são afetados. É esperado que plantas com alta resistência salina mantenham altas taxas de crescimento em relação à plantas com menor resistência, quando submetidas ao mesmo nível de salinidade (NEUMANN, 1997). A resistência, então, é vista como um mecanismo de evitar ou tolerar quantidades de sal acima do que a planta normalmente está acondicionada, através de regulações que permitam manter seu crescimento e produtividade apesar dos efeitos maléficos associados ao aumento da salinidade (ROY *et al.*, 2014). Entretanto, o desempenho da planta sob salinidade depende de alguns fatores variáveis, como o grau de estresse (leve, moderado ou severo); o estágio de desenvolvimento da planta no período que estiver passando pelo

estresse salino; a espécie, variedade ou até mesmo o órgão da planta levado em consideração para as análises (NEUMANN, 1997).

Os principais mecanismos de tolerância ao sal são acumulação ou exclusão de íons, compartimentalização dos íons, sínteses de solutos compatíveis, indução de enzimas antioxidantes e indução hormonal, descritos detalhadamente a seguir.

3.1. Mecanismos de exclusão e compartimentalização

Na maioria das espécies halófitas existem formas para excluir Na^+ em estruturas específicas como glândulas secretoras e pêlos vesiculares. As glândulas secretoras encontradas na epiderme, sendo células basais fortemente cutinizadas. Já as células excretoras não são cutinizadas. As glândulas secretoras liberam os sais que se encontram nas folhas (**Figura 4.1-A**). Os pêlos vesiculares (**Figura 4.2-B**), que são células epidérmicas modificadas, retêm sais no protoplasto e em seguida morrem, sendo posteriormente substituídos por novos pêlos. Essa dessalinização, também pode ocorrer pela queda de folhas velhas que armazenam os sais em excesso (PARIDA; DAS, 2005).

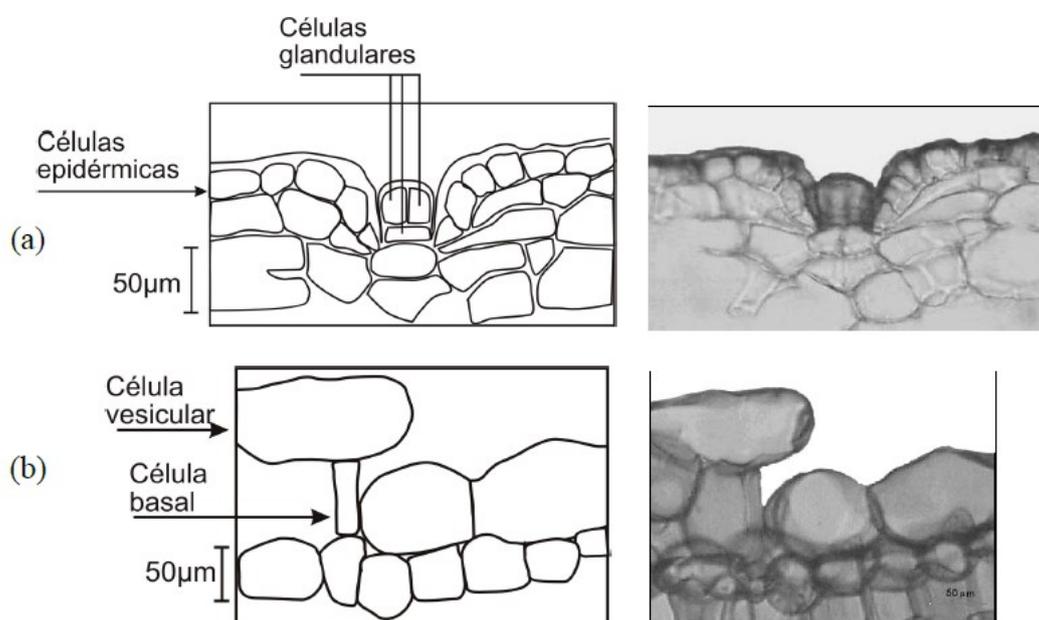


Figura 4.1. Glândulas secretoras e pêlos vesiculares como mecanismos de exclusão de Na^+ . A- Glândula secretora de *Avicennia*. B- Pêlos vesiculares de *Atriplex nummularia*. Fonte: Willadino e Camara (2004).

O grande problema da presença de sais no citosol corresponde a alterações de pH, que acarretam, por exemplo, a inativação de enzimas. Para evitar essa

desorganização no citosol, há três meios disponíveis para reverter esse excesso de Na^+ (Figura 4.2):

1. O influxo de Na^+ é delimitada pela seletividade na absorção de íons;
2. Compartimentalização de Na^+ no vacúolo;
3. O Na^+ presente no citosol é enviado para o espaço apoplástico ou para o solo/substrato (ADAMS *et al.*, 1992; APSE *et al.*, 1999; AUBERT *et al.*, 1999; ZHU, 2003).

A saída de Na^+ do citosol e sua entrada no vacúolo ou no apoplasto, ocorre pelo sistema denominado de antiporte Na^+/H^+ , que corresponde ao transporte ativo secundário movido pelo gradiente eletroquímico pela (H^+ -ATPase) da membrana tratando-se de mecanismo que ocorre com gasto de energia. As bombas (H^+ -ATPase) são necessárias para o antiporte, Na^+/H^+ , uma vez que transporta esses íons em direções opostas (DIETZ *et al.*, 2001; PARIDA; DAS, 2005).

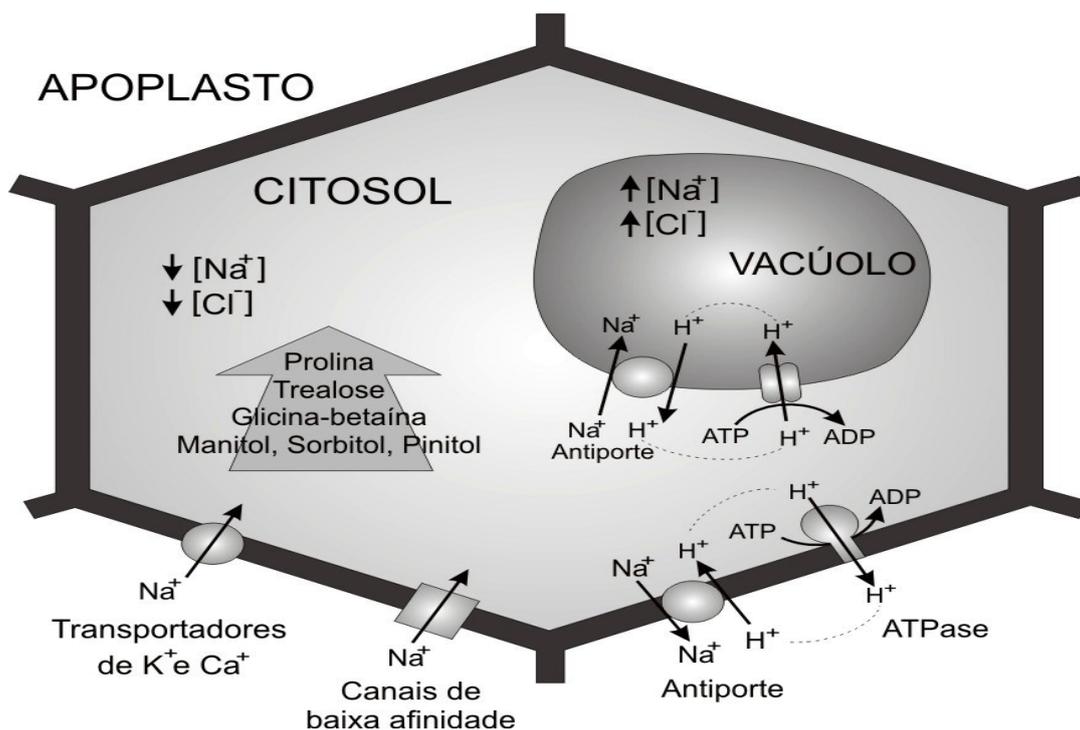


Figura 4.2. Ajuste osmótico, com acúmulo de solutos compatíveis no citoplasma, e canais iônicos e transportadores que determinam o mecanismo de absorção e extrusão de Na^+ . Fonte: Willadino e Camara (2005).

3.2. *Regulação e compartimentalização do íon*

Em todas as espécies vegetais, sendo elas halófitas ou não, não podem apresentar íons no seu citoplasma e desta forma, esses íons são armazenados no vacúolo. Este movimento de íons do citoplasma para o vacúolo ocorre devido ativação salina de enzimas Na^+/H^+ antiporte. Há o envolvimento da H^+ -ATPase, V-ATPase e a fosfatase vacuolar V-PPase.

A V-ATPase é extremamente importante para o desenvolvimento vegetal em condições normais devido a sua função na energização do transporte, mantendo a homeostase do soluto e facilitando a fusão vesicular. Dentro das condições de estresses como a salinização a sobrevivência das células depende grandemente da manutenção desta V-ATPase. Em condições salinas observa-se o aumento da expressão da V-ATPase para energizar o tonoplasto para que ocorra a passagem do íon para o vacúolo.

Em elevadas concentrações de sais também se observa a ativação do complexo proteína quinase como proteína SOS3 e serina/teonina proteína quinase SOS2. Estas proteínas quinases ativam vários transportadores de íons como Na^+/H^+ antiporte SOS1 (PARIDA; DAS, 2005).

3.3. *Biossíntese de solutos compatíveis*

Como há aumento da concentração dos íons dentro vacúolo ocorre à necessidade do acúmulo de osmólitos no citoplasma para manter o equilíbrio entre vacúolo e citoplasma. Entre esses osmólitos destacam-se: prolina, glicina betaína, açúcares, manitol e pinitol (**Figura 4.3** e **Tabela 4.1**). A síntese do manitol em condições de estresse é codificada por mecanismos gênicos e o gene responsável pela sua síntese é o M6PR (ZHIFANG; LOESCHER, 2003). Estes osmolitos também apresentam a função de osmoproteção da membrana, e também evitam que íons como Na^+ e Cl^- , causem a desestruturação de enzimas e proteínas. Também atuam como estocagem de carbono (ZHIFANG; LOESCHER, 2003; WANG; NIL, 2000).

Em relação aos açúcares, em condições de estresse salino, ocorre a diminuição do amido e aumento da síntese de açúcares solúveis, sendo verificado o aumento da atividade da enzima sucrose fosfato sintase. Além do que, o Na^+ ativa enzimas como a delta (1)- pirrolina -5- carboxilato redutase, responsável pela síntese de prolina que atua como o principal osmorregulador (MARSCHENER, 1995).

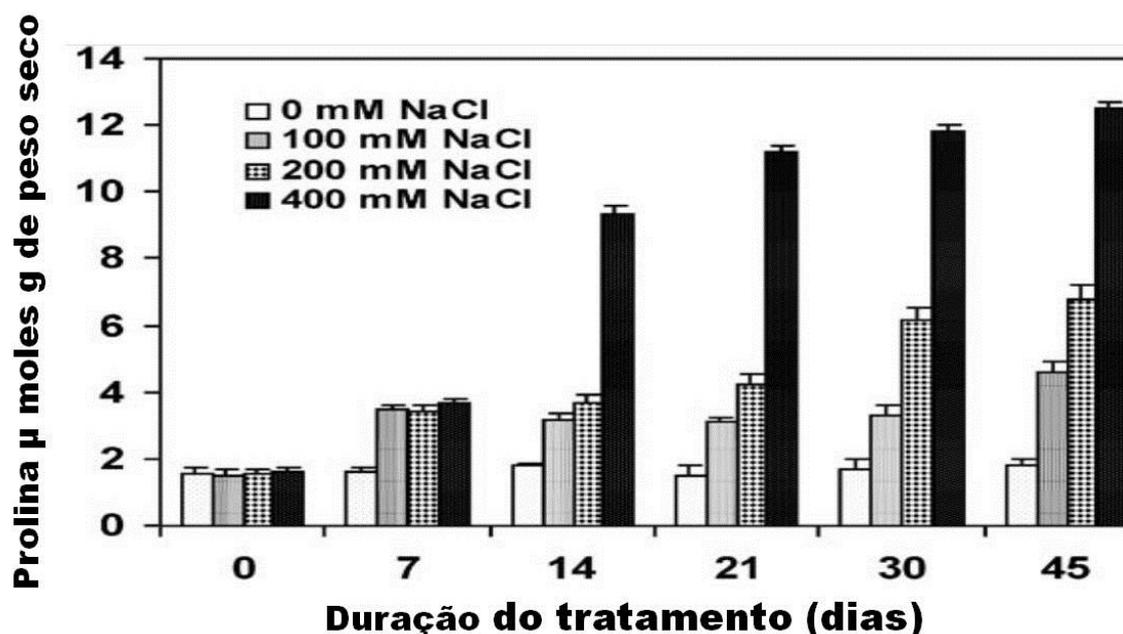


Figura 4.3. Concentração de prolina em função das concentrações salinas ao longo do tempo.
Fonte: Adaptado de Parida e Das (2005).

Tabela 4.1. Acúmulo de substâncias e suas funções para a tolerância a salinidade.

Grupos	Compostos específicos	Funções
Íons	Sódio e Cloro	Ajustamento osmótico, exclusão/exportação de potássio
Proteínas	SOD/ Catalase	Desintoxicação de radicais livres, osmoproteção
Aminoácidos	Prolina	Ajustamento osmótico
Açúcares	Glicose, frutose, sacarose, frutanas	Balanço de íons, osmoproteção e armazenamento de carbono
Polióis	Manitol, pinnitol	Armazenamento de carbono, ajustamento osmótico
Poliaminas	Espermina, espemidina	Balanço de íons e proteção da cromatina
Aminas quartenárias	Glicina betaína, betaína	Osmoproteção
Pigmentos	Carotenóides, antocianinas, betalainas	Proteção de fotoinibição

Fonte: Adaptado de Parida e Das (2005).

3.4. Indução de enzimas antioxidantes

O estresse salino apresenta como consequência o estresse hídrico devido à maior dificuldade das plantas de absorverem água do solo. Os sais presentes no solo reduzem o potencial osmótico e o hídrico o que leva a dificuldade de absorção de água pelo sistema radicular (PARIDA; DAS, 2005).

A falta de água contribui para a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS/EROS) como superóxido, peróxido de hidrogênio, hidroxila que provocam a peroxidação de lipídios, desestruturando a membrana plasmática, degradando proteínas e ácidos nucleicos (ASADA, 1992; CHANG *et al.*, 1984; ALLEN *et al.*, 1997; CHERIAN *et al.*, 1999).

Entretanto, em condições de salinidade, observa-se a maior produção de enzimas antioxidativas como superóxido dismutase e a glutatone. Pesquisas mostram que na presença de Na^+ ocorre aumento na transcrição de fosfolipídio hidroxidoperoxido glutatona peroxidase (PHGPX) (GUETA-DAHAN *et al.*, 1997).

3.5. Indução hormonal

A presença da salinidade aumenta os níveis de ABA e jasmonatos nas plantas. O ABA ativa genes relacionados com o transporte de Na^+ para o vacúolo. Porém, ainda não se conhecem os mecanismos de ação dos jasmonatos, embora se verifique aumento da tolerância a salinização com a aplicação deste hormônio (LEUNG; GIRAUDAT, 1998).

4. Essencialidade do Sódio

O sódio pode ser considerado essencial como micronutriente para halófitas como a *Atriplex vesicaria* e em plantas com metabolismo C4 e CAM. Neste caso, quando a concentração de sódio na solução básica de nutriente não atinge o mínimo necessário (0,1 μM de sódio) as plantas apresentam sintomatologia de carência como cloroses e necroses ao ponto de não ocorrer o crescimento mesmo com altas concentrações de potássio na solução (BROWNELL, 1979).

As respostas de crescimento em relação às concentrações de sódio são estabelecidas em plantas halófitas C4 e CAM. Apesar de alguns resultados demonstrarem maior crescimento em halófitas C4 na presença de sódio, nenhuma enzima envolvida nos mecanismos das C4 é afetada pelo sódio. Assim, o sódio estaria apenas relacionado com o ajustamento osmótico de espécies que requerem altas concentrações de sais para tal finalidade (BROWNELL; CROSSLAND, 1972; BROWNELL *et al.*, 1991).

5. Conclusões

Em síntese, os vegetais apresentam estratégias de tolerância e exclusão dos sais em excesso que atuam de forma coordenada eficiente para que suportem este tipo de estresse. Algumas espécies são mais ou menos vulneráveis ao dano causado pelo sal, e sua resistência afeta diretamente seu crescimento e produtividade. Entretanto, além de estudos relacionados às estratégias metabólicas adotadas naturalmente pelas plantas, espécies resistentes estão cada vez mais sendo requisitadas, a fim de aprimorar o uso de solos salinos e a melhor adaptação de plantas cultivadas submetidas a diferentes níveis de salinidade.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, P.; THOMAS, J.C.; VERNON, D.M.; BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. **Plant Cell Physiol.**, v. 33, p. 1215–1223, 1992.
- ALLEN, R.D.; WEBB, R.P.; SCHAKE, S.A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 23, p. 473–479, 1997.
- APSE, M.P.; AHARON, G.S.; SNEDDEN, W.A., BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. **Science**, v. 285, p. 1256–1258, 1999.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiol. Plant.**, v. 85, p. 235–241, 1992.

- AUBERT, S.; HENNION, F.; BOUCHEREAU, A.; GOUT, E.; BLINGY, R.; DOME, A.J. Subcellular compartmentation of proline in the leaves of the subantarctic Kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R-Br. In vivo C-13 NMR study. **Plant Cell Environ.**, v. 22, p. 255–259, 1999.
- AYERS, R.S.; WESTCOT, D.W. A qualidade da água na agricultura. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba. 153p. Estudos FAO: Irrigação e Drenagem, p.29, 1999.
- BARRET-LENNARD, E.G. Restoration of saline land through revegetation. **Agricultural Water Management**, v.53, p. 213-226, 2002.
- BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptations to environmental stresses. **Plant Cell**, v. 7, p. 1099–1111, 1995.
- BOTELLA, M.A.; QUESADA, M.A.; KONONOWICZ, A.K.; BRESSAN, R.A.; PLIEGO, F.; HASEGAWA, P.M.; VALPUESTA, V. Characterization and in-situ localization of a salt-induced tomato peroxidase messenger-RNA. **Plant Mol. Biol.**, v. 25, p. 105–114, 1994.
- BROWNELL, P.F. Sodium as an essential micronutrient element for plants and its possible role in metabolism. **Advances in Botanical Research**, v. 7, p. 117–224, 1979.
- BROWNELL, P.F.; CROSSLAND, C.J. The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C4 dicarboxylic photosynthetic pathway. **Plant Physiology**, v. 49, p. 794–797, 1972.
- BROWNELL, P.F.; BIELIG, L.M.; GROF, C.P.L. Increased carbonic anhydrase activity in leaves of sodium-deficient C4 plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p. 589–592, 1991.
- CAVALCANTE, L.F.; RODOLFO JÚNIOR, F.; SÁ, J.R.; CURVELO, C.R.S.; MESQUITA, E.F. Influência da água salina e matéria orgânica no desempenho do maracujazeiro amarelo e na salinidade do substrato. **Irriga**, Botucatu, v.12, n. 4, p. 505-518, 2007.
- CHANG, H.; SIEGEL, B.Z.; SIEGEL, S.M. Salinity induced changes in isoperoxidase in taro, *Colocasia esculenta*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 233–235, 1984.
- CHERIAN, S.; REDDY, M.P.; PANDYA, J.B. Studies on salt tolerance in *Avicennia marina* (Forstk.) Vierh.: effect of NaCl salinity on growth, ion accumulation and enzyme activity. **Indian J. Plant Physiol.**, v. 4, p. 266–270, 1999.
- DIETZ, K.J.; TAVAKOLI, N.; KLUGE, C.; MIMURA, T.; SHARMA, S.S.; HARRIS, G.C.; CHARDONNENS, A.N.; GOLLDACK, D. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. **J. Exp. Bot.**, v. 52, p. 1969–1980, 2001.

- DUBEY, R.S.; SINGH, A.K. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants. **Biol. Plant.**, v. 42, p. 233–239, 1999.
- ESTRADA, B.; AROCA, R.; BAREA, J.M.; RUIZ-LOZANO, J.M. Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. **Plant Science**, v. 201-202, p. 42-51, 2013.
- GAO, Z.F.; SAGI, M.; LIPS, S.H. Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity. **Plant Sci.**, v. 135, p. 149–159, 1998.
- GARCÍA LEGAZ, M.F.; ORTIZ, J.M.; GARCÍA - LINDON, A.G.; CERDÁ, A. Effect of salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate in lemon varieties on different roots tocks. **Physiology Plant**, v.89, p. 427 – 432, 1993.
- GUETA-DAHAN, Y.; YANIV, Z.; ZILINSKAS, B.A.; BEN-HAYYIM, G. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. **Planta**, v. 203, p. 460–469, 1997.
- HANSEN, E.H.; MUNNS, D.N. Effects of CaSO₄ and NaCl on growth and fixation of Leucaena. **Plant and Soil.**, v. 107, p. 95-99, 1988.
- ISAYENKOV, S.V. Physiological and Molecular Aspects of Salt Stress in Plants. **Cytology and Genetics**, v. 46, p. 50-71, 2012.
- JOLLY, I.D.; RASSAM, D.W. A review of modelling of groundwater-surface water interactions in arid/semi-arid floodplains. **18th World IMACS / MODSIM Congress**, Cairns, Australia. 2009.
- KRAMER, D. Cytological aspects of salt tolerance in higher plants. In: Salinity Tolerance in Plants: Estrategies for crop improvement. C Staples e G. H. Toeniessen, New york, EEUU, p.3-15. 1984.
- LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; RUIZ, H.A.; PRISCO, J.T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p.107-120, 2003.
- LARCHER, W. A planta sob estresse. In: Ecofisiologia vegetal. RIMA, p. 419-432, 2000.
- LEUNG, J.; GIRAUDAT, J. Abscisic acid signal transduction. Annu. Rev. Plant Physiol. **Plant Mol. Biol.**, v. 49, p. 199–222, 1998.
- LIN, C.C.; HSU, Y.T.; KAO, C.H. The effect of NaCl on proline accumulation in rice leaves. **Plant Growth Regul.**, v. 36, p. 275–285, 2002.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. London: Academic Press, p.889, 1995.

- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev.PlantBiol.**, v. 59, p. 651–681, 2008.
- NEUMANN, P. Salinity resistance and plant growth revisited. **Plant, Cell & Environment**, v. 20, n.9, p. 1193-1198, 1997.
- PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p. 324–349, 2005.
- PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. S.; Lacerda, C. F. 1 ed. Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCT Sal, p. 143-150, 2010.
- ROMERO ARANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant - water uptake and plant - water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**,v.160, p. 265 – 272, 2001.
- ROY, S.J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p. 115-124, 2014.
- RYAN, A.B.; BOYER, K.E. Nitrogen further promotes a dominant salt marsh plant in an increasingly saline environment. **Journal of Plant Ecology**, v.5, p. 429-441, 2012.
- SANTANA, M.J.; CARVALHO, J.A.; SOUZA, K.J.; SOUSA, A.M.G.; VASCONCELOS, C.L.; ANDRADE, L.A.B. Efeitos da salinidade da água de irrigação na brotação e desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) e em solos com diferentes níveis texturais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.1470-1476, 2007.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Plant Physiology. 4th ed. California: Wadsworth. Publishing Company, Inc., p.682, 1991.
- SHI, H.Z.; ZHU, J.K. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. **Plant Mol. Biol.**, v.50, p. 543–550, 2002.
- SILVA, J.V. Efeitos do CaCl₂ no crescimento e acumulação e osmorreguladores em plantas de feijão – de - corda cv. Pitiúba estressadas em NaCl. 103p. Dissertação (Mestrado em Horticultura). Universidade Federal do Ceará, 1998.
- SILVA, E.F.F. Manejo da fertirrigação e controle da salinidade na cultura do pimentão utilizando extratores de solução do solo. 136p. Tese (Doutorado em Agronomia / Irrigação e Drenagem). Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SOARES, T.M. Utilização de águas salobras no cultivo da alface em sistema hidropônico NFT como alternativa agrícola condizente ao semi - árido brasileiro.

268 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª edição. Editada Artmed, p.719, 2004.

WANG, Y.; NIL, N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. **J. Hortic. Sci. Biotechnol.**, v.75, p. 623–627, 2000.

WILLADINO, L.T.; CAMARA, N.; BOGET, I.; CLAPAROLS, M.; SANTOS, J.M.T. Polyamine and free amino acid variations in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and resistant cultivars. **J. Plant Physiol.**, v. 149, p.179–185, 1996.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: Nogueira, R.J.M.C., Araújo, E. De L., Willadino, L., Cavalcante, U.M.T. (eds). Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. Recife. MXM Gráfica e Editora. parte.II, cap. 10, p. 118-126, 2005.

ZHIFANG, G., LOESCHER, W.H. Expression of a celery mannose 6- phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. **Plant Cell Environ.**, v. 26, p. 275–283, 2003.

ZHU, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Plant Biol.**, v. 6, p. 441–445, 2003.

ZHU, J.K.; SHI, J.; SINGH, U.; WYATT, S.E.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; CAPITA, N.C. Enrichment of vitronectin and fibronectin like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion. **Plant J.**, v. 3, p.637–646, 1993.

CAPÍTULO 5

ESTRESSE BIÓTICO EM PLANTAS

DANY ROBERTA MARQUES CALDEIRA; TATIANE BORTOLETTO GOMES DA SILVA; TÚLIO BARROSO QUEIROZ; ANTONIO HIGO MOREIRA DE SOUSA; LUZ MARÍA RUÍZ MACHUCA; RAFAEL DOS SANTOS LIMA; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

A produção de biomassa, a sobrevivência e o rendimento das plantas são influenciados negativamente por estresses abióticos e bióticos (AGARWAL *et al.*, 2006). O estresse biótico em plantas consiste em alterações fisiológicas em resposta principalmente ao ataque de patógenos (HUSSAIN, 2010). Neste grupo estão inclusos insetos, nematóides, vírus, fungos e bactérias, que dependendo do grau de infestação são responsáveis por reduzir drasticamente a produtividade da cultura (WANI, 2010).

No cultivo de hortaliças o ataque de lepidópteros é frequente (MACHADO; SILVA; OLIVEIRA, 2007). Em citrus, o ácaro da ferrugem, a larva minadora, a cochonilha e broca do tronco são exemplos de pragas de recorrência anual (AZEVEDO, 2003). A bactéria causadora do Moko da bananeira (*Ralstonia solanacearum*) possui grande variedade de hospedeiros, com capacidade de infectar mais de 250 espécies de plantas, como por exemplo: batata, tomate e tabaco (ABDALLAH *et al.*, 2016; ELPHINSTONE, 2005; NORMAN *et al.*, 2009; VANTINI, 2007). Em plantações florestais, as formigas do gênero *Atta* e *Acromyrmex* são pragas constantes nas diversas fases de desenvolvimento (SANTOS *et al.*, 2015).

Neste contexto, uma alternativa para minimizar o ataque destes organismos consiste na resistência genética com a utilização de populações adaptadas (MATIELLO *et al.*, 1997). A variabilidade entre indivíduos da mesma espécie é resultado da localização geográfica, polimorfismo e as condições locais de cultivo, no entanto, o comportamento fisiológico de plantas expostas a uma combinação de estresses ainda é um grande desafio para a agricultura (TIPPMANN; SCHLÜTER; COLLINGE, 2006).

A manifestação da doença ou danos nas plantas podem ser evitados por meio de mecanismos estruturais, que atuam como impedimentos físicos à entrada e/ou colonização do hospedeiro, ou bioquímico com a produção de elementos que inibem o desenvolvimento do patógeno ou geram condições adversas para a sobrevivência nos tecidos da planta, os quais são denominados como resistência (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008).

2. Mecanismos de Defesa das Plantas

As plantas estão expostas diariamente às pressões do meio em que está inserida e para superar e/ou sobreviver às diversas situações fazem uso de ferramentas morfológicas, fisiológicas e de produção de substâncias de maneira conjunta ou com mecanismos isolados, variando conforme espécie, tipo e grau de severidade do estresse e do estágio fenológico.

Como exemplos destes mecanismos tem-se a produção de peptídios ou proteínas com propriedades inseticidas capazes de inibir a herbívora (VANDENBORRE; SMAGGHE; DAMME, 2011), fitohormônios como o ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e aqueles que atuam no crescimento e defesa contra estresses abióticos (abscísico, ácido giberélico, citocinina e auxina) estariam relacionados com a defesa contra patógenos e consequente imunização das plantas (SHIGENAGA; ARGUESO, 2016).

Resistência é a denominação do sistema de defesa e adaptação das plantas, a qual pode atuar de três formas. A resistência constitutiva não sofre influência de agentes agressores tornando as plantas imunes à maioria dos patógenos, é recebida por herança dos ancestrais. Exemplos desse tipo de resistência são estruturas histológicas e fitoanticipinas. A resistência sistêmica adquirida (SAR – “systemic acquired resistance”) é impulsionada pela resistência localizada que a protege contra ataques futuros, enquanto que a resistência localizada (não hospedeira) é ativada no ponto onde ocorre a infecção (VANTINI, 2007).

Reação de hipersensibilidade (hypersensitive reaction, ou HR) é o nome dado à resistência local, decorrente da morte de células, está situada no local de penetração do agente causador, impedindo o acesso à células vizinhas, gerando uma barreira física à

infecção. Este comportamento é reflexo do rápido aumento e transição de compostos oxidantes, redução e aumento dos íons potássio (K^+) e hidrogênio (H^+) respectivamente, destruição de compartimentos, síntese de toxinas e proteínas relacionadas à defesa e espessamento da cutícula e parede celular (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 1999).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) protege a planta contra novos ataques de patógenos. Após a ocorrência de uma primeira infecção, a planta torna-se resistente a posteriores infecções por várias semanas. Essa proteção é eficiente contra um grupo de patógenos, variando de acordo com a espécie da planta (VANTINI, 2007).

Na interação entre bactérias e plantas pode ocorrer o desenvolvimento de dois tipos: compatíveis e incompatíveis. Na interação compatível, há produção e liberação de toxinas como enzimas líticas extracelulares e moléculas de virulência lançados nos meios extra e intracelular da planta atacada. Tais estratégias utilizadas pelo patógeno neutralizam os mecanismos de defesa da planta hospedeira, possibilitando que o patógeno se desenvolva nos tecidos vegetais e manifeste os sintomas da doença (WHITE; YANG; JOHNSON, 2000 apud VANTINI, 2007).

Por outro lado, a interação incompatível apesar de ser caracterizada como resistência espécie-específica ou raça-específica, e resistência não hospedeira, após o acionamento de estratégias de defesa, o patógeno fica restrito ao sítio de infecção ocasionando uma necrose localizada denominada reação de hipersensibilidade (HR, “*Hipersensitivity Response*”) (STASKAWICZ *et al.*, 1995) e se esse mecanismo obtiver sucesso, o patógeno é eliminado no sítio de infecção (TAIZ; ZEIGER, 2004).

No reconhecimento do ataque desses organismos, as plantas passam por uma ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que estariam associados a ectodomínios de proteínas que participam da regulação de processos fisiológicos (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012). Assim, enzimas específicas poderão atuar na síntese de compostos voláteis com possíveis modificações na rota metabólica (FAHART *et al.*, 2016). Isso ocorre, porque algumas plantas são capazes de detectar as proteínas secretadas e injetadas pelo patógeno (AZNAR *et al.*, 2015), ou ainda induzem a produção de fitohormônios que conseqüentemente atuam na ativação de genes atuantes na proteção (NAFISI *et al.*, 2015).

A resposta de defesa de plantas contra patógenos envolve uma ativação coordenada de expressão de múltiplos genes que ocasiona no acúmulo de metabólitos secundários e uma frequente ativação de uma resposta de hipersensibilidade (HR)

gerando o desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida (SAR) (DANGL; JONES, 2001).

3. Mecanismos Bioquímicos de Defesa (Enzimas Antioxidantes)

As plantas reagem ao ataque de fitopatógenos e insetos produzindo compostos químicos resultantes da ativação do oxigênio (espécies reativas de oxigênio - ROS) principalmente os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio H_2O_2 . (MITTLER, 2002; APEL; HIRT, 2004). Este último, por ser um oxidante relativamente estável e sem a presença de carga, tem sua passagem facilitada na camada bilipídica da membrana celular (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Plantas e muitos outros organismos aeróbicos produzem constantemente espécies reativas de oxigênio em cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias devido aos processos metabólicos como a fotossíntese, respiração e fotorespiração (MATSUO *et al.*, 2015). Após o estresse, a explosão oxidativa é uma das formas mais rápidas de defesa da planta, para combater as ROS as plantas dispõem de um sistema de proteção composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que trabalham em conjunto e em sincronia, fazendo com que as plantas, superem a situação de estresse (MITTLER, 2002; KIM; KWAK, 2010). A primeira descrição de explosão oxidativa foi feita em tecido de batata, inoculando *Phytophthora infestans*, como resultado o tecido gerou superóxido que é rapidamente transformado em peróxido de hidrogênio (DOKE, 1985).

Nos organismos aeróbicos, as enzimas superóxido dismutases (SODs) representam a primeira linha de proteção contra os níveis elevados das ROS que atuam dismutando radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). As catalases são as principais enzimas que convertem o H_2O_2 gerado durante a fotorrespiração em H_2O e oxigênio molecular O_2 . (BREUSEGEM *et al.*, 2001). A peroxidase está envolvida em diversas reações tais como lignificação, cicatrização de ferimentos, proteção contra o ataque de patógenos, formação e reticulação de componentes da parede celular e outras (KAO, 2003).

4. Mecanismo de Defesa (Metabolismo Secundário)

A produção de metabólitos secundários consiste em uma importante estratégia fisiológica que as plantas possuem a fim inibir o ataque de patógenos (TENENBOIM; BROTMAN, 2016). Estes metabólitos são sintetizados e segregados através de estruturas especializadas denominadas tricomas, que também atuam como uma barreira física para impedir o ataque desses organismos (CHAMPAGNE; BOUTRY, 2016). Entretanto, a maioria das vias metabólicas específicas de tricomas e os genes envolvidos nos seus estágios de desenvolvimento apresentam poucas informações disponíveis em bases de dados sobre genômica (TIWARI, 2016). Estas estruturas sintetizam compostos lipofílicos que são secretadas ou armazenadas no espaço subcuticular (CHAMPAGNE; BOUTRY, 2016).

Dentre os compostos secretados por essa estrutura é possível destacar, os óleos essenciais, alcalóides, taninos e flavonoides (ANDREUCCI *et al.*, 2008). O óleo essencial apresenta capacidade de inibir agentes patogênicos por possuir diversidade de compostos bioativos com propriedades antibacterianas (BOUBAKER *et al.*, 2016). A diversidade química do óleo essencial está associada às adaptações como estratégia de sobrevivência, esse fato deve-se principalmente ao polimorfismo e localização geográfica (VENDITTI *et al.*, 2015).

Além disso, compostos químicos como limoneno, linalol e geraniol, presente no óleo essencial de algumas espécies, são exemplos de marcadores químicos com propriedades repelentes (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2015). Diversos autores relataram a atuação de outros compostos específicos com essa propriedade (GOVNDARAJAN, 2011; ROH; LEE; PARK, 2013; DHIMAN *et al.*, 2015).

Assim, estudos relacionados à diversidade química do óleo essencial permitem que estas substâncias ou extratos de plantas sejam promissores agentes controladores de organismos fitopatogênicos (AL-REZA *et al.*, 2010). Em condições de laboratório, o óleo essencial das partes vegetais pode ser obtido por hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos ou micro-ondas (SANTOS *et al.*, 2004). Os compostos orgânicos são quantificados principalmente através da técnica de cromatográfica que acoplado a outros sistemas de detecção apresentam alto

desempenho na determinação da abundância relativa de compostos químicos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; MENG *et al.*, 2016).

5. Considerações Finais

O contato com adversidades bióticas e abióticas possibilitou alterações morfo-fisiológicas nas plantas, cujo objetivo é manter a sua integridade. Estas alterações são conhecidas como resistência e podem ser desenvolvidas de três formas, sendo elas, resistência constitutiva (hereditária), local (com a necrose da área afetada) ou sistêmica adquirida (a qual protege a planta contra novos ataques).

Os caminhos para adaptações em plantas são variados e os danos causados por organismos vivos também contribuem para alterações no metabolismo. Isso ocorre através da produção de enzimas específicas ou substâncias que são produzidas a partir de estruturas especializadas, atuantes no mecanismo defesa. Conhecer as estratégias de sobrevivência é uma ferramenta fundamental para o uso agrônômico no combate e prevenção de pragas e doenças. Isso permite, portanto, melhorias na cadeia produtiva e manutenção nos níveis de produtividade.

6. Referências Bibliográficas

- ABDALLAH, R.A.B.; MOKNI, S.; NEFZI, A.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H. DAAMI-REMADI, M. Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. **Biological Control**, v. 97, p. 80-88, 2016.
- AGARWAL, P.K.; AGARWAL P.; REDDY, M.K.; SOPORY, S.K. Role of dreb transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports.**, v. 25, p. 1263-1274, 2006.
- AL-REZA, S.M.; RAHMAN, A.; AHMED, Y.; KANG, S.C. Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 2, p. 86-92, 2010.

- 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, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- ANDREUCCI, A.C.; CICCARELLI, D.; DESIDERI, I.; PAGNI, A.M. Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry, **Finnish Zoological and Botanical Publishing Board**, v. 45, n. 1, p. 11-18, 2008.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- AZEVEDO, C.L.L. Sistema de produção de citros para o nordeste. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Sistema de Produção, v. 16, versão eletrônica, 2003. Disponível em:<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/pragas.html>>>. Acesso em: nov. 2016.
- AZNAR, A.; CHEN, N.W.G.; THOMINE, S.; DELLAGI, A. Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. **Plant Science**, v. 240, p.90-97, 2015.
- BOUBAKER, H.; KARIM, H.; HAMDAR, A.E.; MSANDA, F.; LEACH, D.; BOMBARDA, I.; VANLOOT, P. ABBAD, A.; BOUYACH, E. H.; AOUMAR, A.A.B. Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 95-101, 2016.
- BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414,2001.
- CHAMPAGNE, M.; BOUTRY, M. Proteomics of terpenoid biosynthesis and secretion in trichomes of higher plant species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1864, n. 8, p. 1039 – 1049, 2016.
- CHATTOPADHYAY, P.; DHIMAN, S.; BORAH, S.; RABHA, B.; CHAURASIA, A. K.; VEER, V. Essential oil based polymeric patch development and evaluating its repellent activity against mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 147, p.45-53, 2015.
- CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

- DANGL, J.L.; JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826-833, 2001.
- DHIMAN, N.G.S.; TALUKDAR, P.K.; RABHA, B.; GOSWAMI, D.; VEER, V. Synergistic mosquito-repellent activity of *Curcuma longa*, *Pogostemon heyneanus* and *Zanthoxylum limonella* essential oils. **Journal of Infection and Public Health**, v. 8, n. 4, p. 323-328, 2015.
- DOKE, N. NADPH - dependent O_2^- generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 3, p. 311-322, 1985.
- ELPHINSTONE, J. The current Bacterial Wilt situation: a global overview. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, editors. Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia Solanaceum Species Complex. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society, p. 9–28, 2005.
- FAHART, M.B.; JORDÁN, M.J.; CHAOUCH-HAMADA, R.; LANDOULSI, A.; SOTOMAYOR, J.A. Phenophase effects on sage (*Salvia officinalis* L.) yield and composition of essential oil. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3 p. 87-93, 2016.
- GOVNDARAJAN, M. Larvicidal and repellent properties of some essential oils against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 2; p. 106-111, 2011.
- HUSSAIN, Q. Peroxidase mediated de colorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, Delft, v. 9, p. 117-140, 2010.
- KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 83-89, 2003.
- KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: Science Publishers. p.129-150, 2010.
- MACHADO, L.A.; SILVA, V.B.; OLIVEIRA, M.M. Uso de extratos vegetais no controle de pragas em horticultura. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.103-106, 2007. Disponível em: http://200.144.6.109/docs/bio/v69_2/p103-106.pdf. Acesso em: nov. 2016.

- MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZEIM, M.; OLIVEIRA, D.A. defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v. 25, p. 24-31, 1999.
- MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas a moléstias fungicas. **Revista Ciência Rural**, v.274, n.1, p.161-168, 1997.
- MATSUO, M.; JOHNSON, J.M.; SHERAMETI, I.; HIENO, A.; TOKIZAWA, M.; YAMAMOTO, Y.Y.; NOMOTO, M.; TADA, Y.; GODFREY, R.; OBOKATA, J.; et al. High REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR1 Levels Result in Accumulation of Reactive Oxygen Species in *Arabidopsis thaliana* Shoots and Roots. **Mol. Plant**, v 8, p. 1253–1273, 2015.
- MENG, X.; LI, D.; ZHOU, D.; WANG, D.; LIU, Q.; FAN, S. Chemical composition, antibacterial activity and related mechanism of the essential oil from the leaves of *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc against *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 698-705, 2016.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.
- MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 349-357, 2012.
- NAFISI, M.; FIMOGNARI, L.; SAKURAGI, Y. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 63-71, 2015.
- NORMAN, D.J.; ZAPATA, M.; GABRIEL, D.W.; DUAN, Y.P.; YUEN, J.M.F.; MANGRAVITA-NOVO, A., et al. Genetic Diversity and Host Range Variation of *Ralstonia solanacearum* Strains Entering North America. **Phytopathology**, v.99, n.9, p. 1070–7, 2009.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatol. Bras.**, v. 28, p. 123–130, 2003.
- ROH, H. S.; LEE, B. H.; PARQUE, C. G. Acaricidal and repellent effects of myrtacean essential oils and their major constituents against *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 16, n. 3, p. 245-249, 2013.

- SANTOS, A.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Descrição de sistema de Métodos de Extração de óleo essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado Técnico 99, **EMBRAPA**, p. 1-6, 2004.
- SANTOS, J.O.P.; PERES FILHO, O. ; SOUZA, M.D.; DORVAL, A. Preferência de *Atta laevigata* f. smith, 1858 (hymenoptera: formicidae) por diferentes espécies e híbridos de eucaliptos. **Revista de Agricultura**, v. 90, n. 1, p. 42-53, 2015. Disp. em: <<<http://www.arefloresta.org.br/uploads/downloads/000610201591825.pdf>>>
- SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.
- SHIGENAGA, A.M.; ARGUESO, C.T. No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 56, p. 174-186, 2016.
- STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p. 661-667, 1995.
- TAIZ, L.; ZEIGHER, E. Fisiologia Vegetal. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A, 2004.
- TENENBOIM, H.; BROTMAN, Y. Omic Relief for the Biotically Stressed: Metabolimics of Plant Biotic Interactions. **Trens in Plant Science**, v. 21, n. 9, 2016.
- TIPPMANN, H.F.; SCHLÜTER, U.; COLLINGE, D. B. Common themes in biotic and abiotic stress signalling in plants. Middlesex, UK: Global Science Books, 2006.
- TIWARI, P. Recent advances and challenges in trichome research and essential oil biosynthesis in *Mentha arvensis* L. **Industrial Crops and Products**, v.82, p.141-148, 2016.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; DAMME, E.J.V. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v.72, n.13, p.1538-1550, 2011.
- VANTINI, J. S. Avaliação das vias relacionadas a resistência de *Citrus sinensis* em resposta a interação com a bactéria *Xanthomonas axonopodis*. 2007. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas).

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal -SP, 2007.

VENDITTI, A.; BLANCO, A.; FREZZA, C.; CONTI, F.; BINI, L.M.; GIULIANI, C.; BRAMUCCI, M.; QUASSINT, L.; DAMIANO, S.; LUPIDI, G.; BEGHELLI, D.; CATERBI, S.; PETRELLI, D.; VITALI, L. A.; PAPA, F.; CAPRIOLI, G.; MAGGI, F. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 353-363, 2015.

WANI, S.H. Inducing Fungus-Resistance into Plants through Biotechnology. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 2, n.2, p.14–21, 2010.

WHITE, F.F.; YANG, B.; JOHNSON, L.B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in plant Biology**, v. 3, n. 4, p. 291-298, 2000.

CAPÍTULO 6

METABOLISMO ESPECIALIZADO

JOSÉ ABRAMO MARCHESE; ADRIANO SUCHORONCZEK; ELIANE CARNEIRO; CLEITON NICARETA; JOSÉ CARLOS CAZAROTTO MADALÓZ; MARISA DE CACIA OLIVEIRA; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

As plantas sintetizam uma multiplicidade de compostos – denominados metabólitos especializados (ME) - que contribuem para a adaptação destas em seus nichos ecológicos. São classes de compostos naturais que as plantas e outros organismos produzem para defender-se quimicamente dos estresses bióticos (ex.: patógenos, parasitas e herbívoros) e abióticos (ex.: estresses hídrico, nutricional, etc.), para atrair polinizadores e dispersores de sementes, e na interação planta-planta. Durante muitos anos a importância adaptativa dos ME foi desconhecida e eram considerados produtos finais do metabolismo ou resíduos, também, equivocadamente chamados metabólitos secundários, devido ao desconhecimento de sua importância na defesa vegetal. Os ME também estão envolvidos em processos essenciais do crescimento das plantas e na interação destas com o ambiente (fitormônios, etc.). Os ME apresentam distribuição restrita no reino vegetal (distribuídos em grupos taxonômicos restritos) e são substâncias estudadas pelo seu uso como drogas medicinais, biocidas, nutracêuticos, corantes, perfumes, aromatizantes e materiais industriais, entre outros. O número total de metabólitos especializados encontrados no reino vegetal excede em muito a capacidade de qualquer genoma vegetal de codificar as enzimas necessárias e, assim como uma linhagem vegetal adquire a capacidade de produzir novos compostos especializados durante a evolução, também perde a capacidade de fazer outras. Embora a capacidade das plantas para produzir novos metabólitos especializados continue a evoluir, existem também muitos exemplos em que diferentes plantas desenvolveram independentemente a capacidade de produzir compostos já presentes em outras linhagens de plantas ou de fazer compostos diferentes que cumprem o mesmo papel (PICHERSKY; LEWINSOHN, 2011).

O número de metabólitos especializados foi estimado em aproximadamente 200.000 (DIXON; STRACK, 2003). Todavia, dados recentes de investigações de perfil

metabólico mostram um grande número de metabólitos detectados em cada espécie examinada e grande diversidade entre as espécies (YONEKURA-SAKAKIBARA; SAITO, 2009), sugerindo que 200.000 é provavelmente uma subestimação grosseira, particularmente devido ao fato de tão poucas espécies de plantas terem sido investigadas. Além disso, muitos metabolitos especializados são intermediários em vias complexas e não são tipicamente encontrados em altas concentrações nos tecidos de plantas que estão sendo examinados, evitando assim a detecção. As questões relativas à eficácia da extração e estabilidade dos compostos também limitam o número de compostos detectados nestes estudos (os argumentos acima também se aplicam aos metabolitos primários). Inversamente, artefatos de extração e instabilidade química podem gerar novas estruturas que são essencialmente ausentes em planta (PICHESKY; LEWINSOHN, 2011). Estes compostos pertencem a várias classes químicas tais como terpenóides derivados de isopreno incluindo mono-, sesqui-, di- e triterpenóides, assim como esteróides; alcalóides contendo N; compostos fenólicos incluindo flavonóides; glucosinolatos; glicosídeos cianogênicos, e outros (MITHÖFER; BOLAND, 2012) (**Tabela 6.1**).

Tabela 6.1. Metabólitos especializados de plantas. Adaptado de Mithöfer e Boland (2012).

Classe de compostos	Exemplo	Família/espécie fonte	Número aproximado de compostos conhecidos
Terpenóides	Artemisinina	<i>Artemisa annua</i> L	>30,000
Esteróides	Fitoecdisona	Ranunculaceae	~200
Cardenólídeos	Digoxigenina	Plantaginaceae	~200
Alcalóides	Nicotina	Solanaceae	>12,000
Derivados de Ác. graxos	(3Z)-Hexenilacetato	Cosmopolita	n.d.
Glucosinolatos	Sinigrina	Capparales	~150
Glicosídeos cianogênicos	Durrina	Rosaceae, Fabaceae	~60
Fenóis	Lignina, tanino	Cosmopolita	>9,000
Polipeptídeos	Inibidor de tripsina	Cosmopolita	n.d.
Aminoácidos não-protéicos	γ-Ácido aminobutírico	Fabaceae	>200
Sílica	SiO ₂	Poaceae	1
Látex	Emulsão indefinida	Euphorbiaceae	c.v.

Abreviações: n.d., não determinado; c.v., composição variável.

Neste capítulo daremos especial destaque para as classes de metabólitos especializados: fenóis, terpenóides, alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos.

2. Fenóis

Por definição, um fenol é uma substância orgânica que possui uma ou mais hidroxilas ligadas diretamente a um anel aromático. As plantas produzem uma ampla gama de compostos do metabolismo especializado que contém um grupo fenol. Tais substâncias recebem a denominação de compostos fenólicos. Estes compostos fenólicos vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo de aproximadamente dez mil compostos. São os metabólitos especializados mais amplamente distribuídos no reino vegetal, ocorrendo em todas as espécies (CHEYNIER *et al.*, 2013).

Nos estratos vegetais de folhas de plantas vasculares, podem ser encontrados diversos compostos fenólicos, como ésteres, amidas, glicosídeos de ácido hidroxicinâmico, flavonoides, protoantocianidinas e outros compostos relacionados. Também são encontrados polímeros de fenóis como a lignina, suberina e a melanina que ocorrem comumente em plantas (CARETTO *et al.*, 2015). Estima-se que aproximadamente 2% de todo carbono proveniente da fixação pela fotossíntese são convertidos em compostos fenólicos e seus derivados (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997).

A síntese de compostos fenólicos é heterogênea e envolve diversas rotas metabólicas (**Figura 13.1**). A glicólise e a rota das pentoses-fosfato fornecem precursores (ácido fosfoenolpirúvico e eritritose-4-fosfato) para a rota do ácido chiquímico (CARETTO *et al.*, 2015). A rota do ácido malônico (que possui a acetil-CoA como precursor) também participa na biossíntese de compostos fenólicos.

O aminoácido fenilalanina, produzido pela rota do ácido chiquímico, é o precursor de diversos fenóis. A eliminação da molécula de amônia da fenilalanina pela enzima PAL (fenilalanina amônia liase) (EC 4.3.1.24) leva à formação do ácido cinâmico. A PAL é uma enzima chave para a síntese de compostos fenólicos, fazendo a

ponte entre o metabolismo primário (rota do ácido chiquímico) e o metabolismo especializado (rota dos fenilpropanóides) (HE *et al.*, 2012).

A cinamato-4-hidroxilase (C4H) (EC 1.14.13.11) catalisa a reação do ácido cinâmico para ácido *p*-cumárico. Os ácidos *trans*-cinâmico e *p*-cumárico, o *p*-cumariol-CoA e seus derivados são chamados de fenilpropanóides por conterem um anel benzênico ligado a uma cadeia lateral de carbono. A reação de adição de três moléculas de malonil-CoA, provenientes da rota do ácido malônico, ao *p*-cumaroil-CoA, produz as chalconas. Essa reação é catalisada pela enzima chalcona sintase. As chalconas são convertidas a flavonas, que dão origem às isoflavonas e di-hidroflavonóis, precursores dos flavonóides, isoflavonóides e neoflavonóides. Os di-hidroflavonóis também dão origem as antocianinas e aos taninos condensados (BUCHANAN *et al.*, 2000; WESTON; MATHESIUS, 2013).

Os compostos fenólicos são classificados com base no seu esqueleto carbônico (Tabela 13.2), sendo que diversos grupos já foram caracterizados (CHEYNIER *et al.*, 2013; LATTANZIO, 2013).

Tabela 6.2. Classificação dos compostos fenólicos em função da sua estrutura química e do número de carbonos.

Nº de carbonos	Esqueleto base	Classificação
6	C6	Fenóis simples
7	C6 – C1	Ácidos fenólicos
8	C6 – C2	Acetofenonas e ácido fenilacético
9	C6 – C3	Cumarinas e fenilpropanóides,
10	C6 – C4	Naftoquinonas
13	C6 – C1 – C6	Xantonas
14	C6 – C2 – C6	Estilbenos e antraquinonas
15	C6 – C3 – C6	Flavonóides, isoflavonóides e neoflavonóides
n	(C6 – C3 – C6) _{2,3}	Bi-, tri-flavonóides
n	(C6 – C3) ₂	Lignanas, neolignanas
n	(C6 – C3) _n	Ligninas
n	(C6 – C3 – C6) _n	Taninos condensados

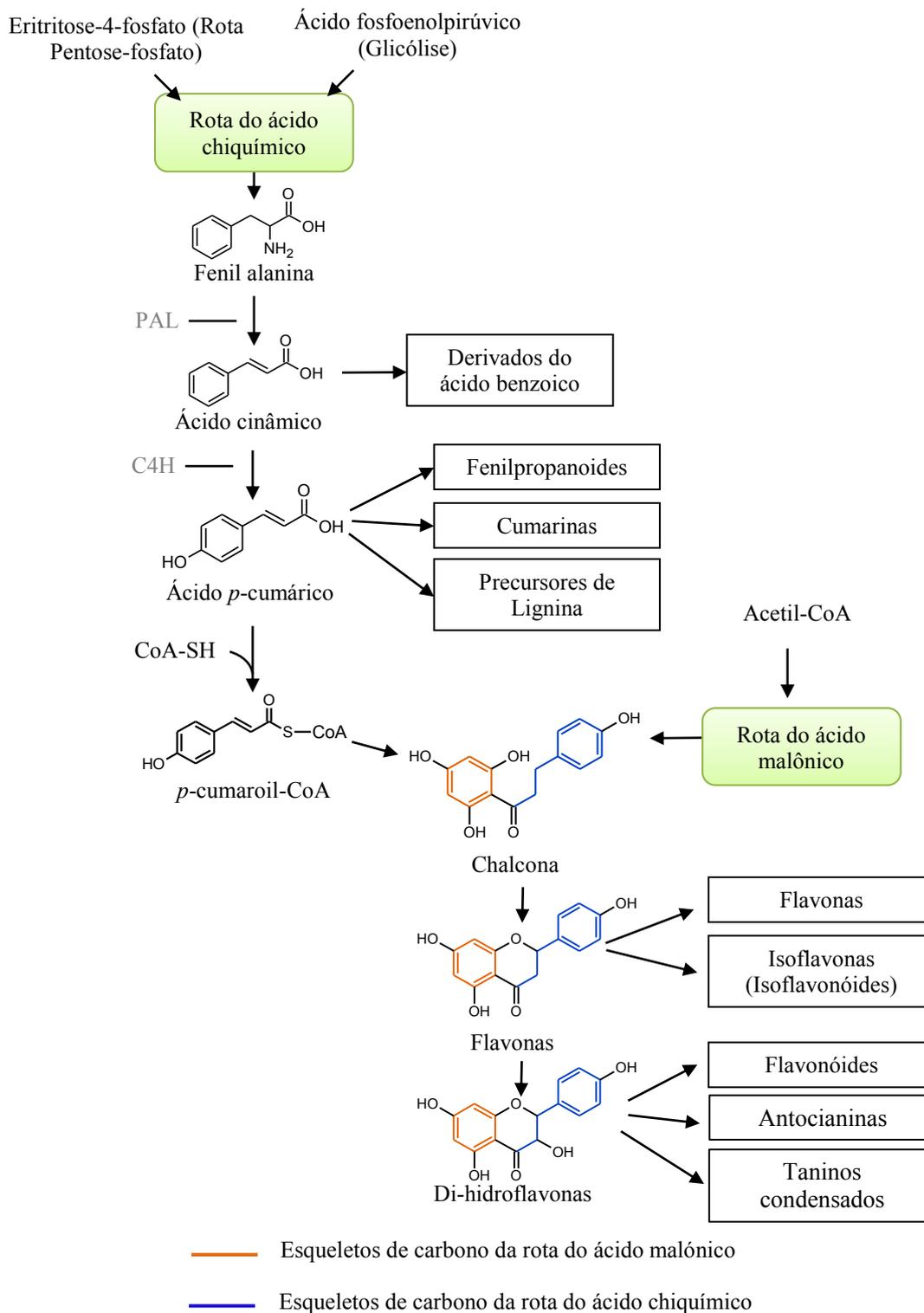


Figura 6.1. Esquema de biossíntese de compostos fenólicos a partir da rota do ácido chiquímico e do ácido malônico. *Fonte:* Adaptado de Feng *et al.* (2013); Taiz e Zeiger (2013); Weston e Mathesius (2013).

Alguns exemplos de fenóis simples são o catecol e a hidroquinona. Estes são incomuns em tecidos vegetais. O catecol pode ser encontrado em *Gaultheria* spp. A arbutina é uma hidroquinona glicosilada (**Figura 6.2**), que ocorre em plantas do gênero

Vaccinium (Ex: mirtilo e oxococo), begônia (*Bergenia crassifolia*) e pera (*Pyrus communis*). É um inibidor da tirosinase e é amplamente utilizada como agente de clareamento de pele, como protetor solar e agente antioxidante na formulação de cosméticos (ALAM *et al.*, 2011).

Os ácidos fenólicos (C6 – C1) raramente são encontrados nas plantas em sua forma livre, ocorrendo, principalmente, em formas conjugadas. Já foram identificados inúmeros compostos conjugados de ácidos fenólicos com flavonoides, ácidos graxos, açúcares e compondo estruturas complexas como as dos taninos hidrolisáveis (MATTILA; HELLSTRÖM, 2007; LATTANZIO, 2013). Ácidos fenólicos constituem um importante grupo de compostos que apresentam ampla aplicação farmacêutica, com ação antioxidante, atuando como quelante de íons metálicos e alterando a atividade de diversas enzimas. Frutas e vegetais podem apresentar elevados conteúdos de ácidos fenólicos, porém, as principais fontes de ácidos fenólicos são as infusões herbais, como por exemplo, as de chá verde, chá preto e café (ARCEUSZ *et al.*, 2013). Alguns exemplos de ácidos fenólicos são a vanilina, o ácido gálico e o ácido salicílico (**Figura 6.2**). O ácido salicílico é um hormônio vegetal, sendo possivelmente o ácido fenólico mais estudado (WIDHALM; DUDAREVA, 2015). Ele é um composto chave envolvido nas respostas a diversos estresses bióticos e abióticos, influenciando, também, diversos processos fisiológicos como a germinação, estabelecimento de plântulas, florescimento, senescência e rendimento de frutos. Seu efeito em muitos desses processos é indireto, induzindo a produção de outros hormônios vegetais como o ácido jasmônico, etileno e auxina (VLOT *et al.*, 2009; MIURA; TADA, 2014).

Os fenilpropanoides (C6 – C3) são uma classe de compostos fenólicos que ocorrem em todas as espécies vegetais e muitas vezes são precursores de outros compostos fenólicos. O ácido *p*-cumárico pode originar as hidroxycumarinas e é uma importante unidade estrutural na formação dos flavonoides, estilbenos e xantonas (**Figura 13.1**). Os fenilpropanoides mais comuns são o ácido cafeico (**Figura 6.2**), ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico (ALU'DATT *et al.*, 2017). Essa classe de compostos fenólicos contribui grandemente para a resistência das plantas a diversos patógenos. Em pepino, a aplicação de extrato vegetal de *Reynoutria sachalinensis* foi eficiente no controle de oídio (*Sphaerotheca fuliginea*), induzindo resistência da planta ao patógeno. A resistência induzida é atribuída ao acúmulo de fenilpropanoides e derivados (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido hidroxicinâmico e éster metílico do ácido *p*-cumárico), sendo que alguns destes compostos, como por exemplo, o ácido

hidroxicinâmico, apresentam efeito fungitóxico contra diversos patógenos da cultura do pepino (DAAYF *et al.*, 2012).

As antocianinas são uma ampla classe de pigmentos flavonoides, solúveis em água, responsáveis pela coloração azul, púrpura e vermelha de diversas frutas, flores e folhas (IWASHINA, 2000; HE; GIUSTI, 2010). Podem influenciar a resposta dos vegetais a diferentes tipos de estresses ambientais. Esses pigmentos estão envolvidos na atração de polinizadores, tolerância à seca, radiação UV-B, resistência à herbivoria e ao ataque de patógenos, e também estão associados à proteção do cloroplasto contra os efeitos fotoinibitórios e fotooxidativos de elevados níveis de radiação (GARRIGA *et al.*, 2014). A cianidina-3-galactosídeo (**Figura 6.2**) é a principal antocianina encontrada na casca da maçã. Está envolvida na proteção do fruto contra danos por fotooxidação e danos por alta temperatura sob elevada intensidade luminosa. Na nutrição humana, os polifenóis encontrados na maçã têm demonstrado potencial para melhorar a saúde humana, reduzindo o risco de diversas doenças como o câncer, problemas cardiovasculares, diabetes, Alzheimer e outras doenças degenerativas (FENG *et al.*, 2013).

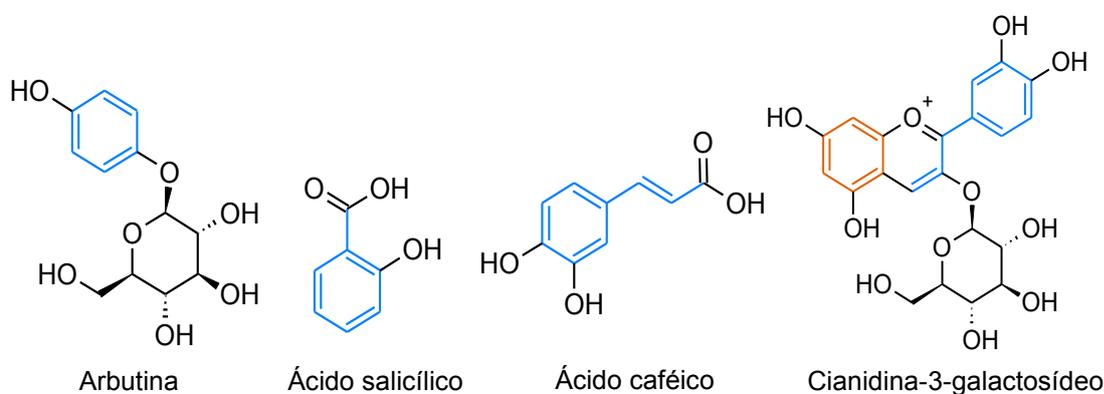


Figura 6.2. Exemplos de compostos fenólicos. *Fonte:* Autores (2016).

Restrições ambientais como a deficiência hídrica, salinidade, altas ou baixas temperaturas, alta intensidade luminosa, radiação UV-B, metais pesados, deficiência nutricional, ataque de pragas e de patógenos impactam negativamente no desenvolvimento e na produção de plantas em condições ambientais. Os compostos fenólicos e outros compostos naturais estão envolvidos na adaptação específica a diversas condições ambientais e, conseqüentemente, apresentam papel fundamental na defesa das plantas (CARETTO *et al.*, 2015).

Diversos aleloquímicos desempenham papel importante nas interações entre os organismos, sendo que os compostos fenólicos são o principal grupo nos ecossistemas (JOHN; SARADA, 2012). Os flavonoides são relatados na literatura a mais de 50 anos como mediadores químicos envolvidos em interações alelopáticas na rizosfera. (WESTON; MATHESIUS, 2013).

Compostos fenólicos com características aleloquímicas podem inibir o alongamento de raízes, afetar a divisão celular e a estrutura, com efeitos no desenvolvimento da planta como um todo. Também podem aumentar a permeabilidade da membrana celular, intensificando a peroxidação de lipídios e, em última instância, a morte do tecido vegetal. Na respiração, os aleloquímicos fenólicos podem reduzir a capacidade de absorção de oxigênio, assim como afetar a atividade e função de certas enzimas. Ácido clorogênico, ácido cafeico e catecol inibem a atividade de fosforilases; ácido cinâmico e seus derivados inibem a atividade hidrolítica da ATPase (JOHN; SARADA, 2012).

A Serralha (*Sonchus oleraceus*) é uma planta com forte efeito alelopático, reduzindo a germinação e o crescimento de outras culturas e plantas daninhas, pela liberação de diversos compostos fenólicos nos exsudatos radiculares ou pela decomposição de sua matéria seca (GOMAA *et al.*, 2015).

He *et al.* (2012) estudando duas cultivares de arroz, uma considerada alelopáticas e outra não alelopática, observaram que a expressão das enzimas PAL, C4H e F5H (Ferulato-5-hidroxilase, que catalisa a conversão de ácido *p*-cumárico a ácido cafeico) e COMT (cafeato *O*-metiltransferase, que catalisa a reação do ácido cafeico a ácido felúrico) aumentou com a presença de plantas daninhas na área da cultivar considerada alelopática e reduziu naquela não alelopática. Os autores apontaram o ácido salicílico, *trans*-ferúlico e *p*-hidroxibenzóico como principais componentes alelopáticos do exsudato.

3. TERPENOS

Terpenos, também conhecidos como isoprenoides, constituem a maior e mais diversa classe de metabolitos especializados, com mais de 45.000 compostos conhecidos (THULASIRAM *et al.*, 2007; RENAULT *et al.*, 2014). Isoprenoides

também estão envolvidos em funções fundamentais no metabolismo primário de plantas, em processos como crescimento e desenvolvimento, além da formação de um grande número de compostos terpenóides com papéis mais especializados na interação de plantas com seu ambiente (THOLL, 2015).

Como metabolitos especializados, eles participam de interações alelopáticas, e na proteção de plantas contra herbívoros e patógenos. Também são produzidos para atrair polinizadores e animais dispersores de sementes (CHENG; CHENG, 2015). Os terpenos compõem a essência volátil de flores e dos óleos essenciais de ervas e especiarias, pertencendo a uma classe de compostos naturais com propriedades biológicas funcionais e desejáveis, de grande interesse econômico para a produção de borracha, fármacos, nutracêuticos, sabores, fragrâncias, pigmentos, inseticidas e compostos industriais (EDRIS, 2007).

Todos os terpenóides derivam de moléculas universais de cinco átomos de carbono, o isopentenil difosfato (IPP) e o seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). Os intermediários prenil difosfato formados por condensação destas unidades de cinco carbonos são utilizados como precursores para a biossíntese de terpenóides (LANGE; AHKAMI, 2013). Assim, a unidade básica contém cinco carbonos e é chamada isopreno (**Tabela 6.3**).

Tabela 6.3. Classificação dos terpenóides

Nome	Nº de Carbono	Nº unidades de isopreno
Hemiterpenos	C ₅	1
Monoterpenos	C ₁₀	2
Sesquiterpenos	C ₁₅	3
Diterpenos	C ₂₀	4
Triterpenos	C ₃₀	6
Tetraterpenos	C ₄₀	8
Politerpenos	(C ₅) _n	n = acima de 8

Monoterpenos são os compostos presentes nas plantas com maior volatilidade, devido à baixa massa molecular. São constituintes de essências voláteis de flores e óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, justificando sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes (CROTEAU *et al.*, 2000).

Sesquiterpenos são encontrados em óleos essenciais e vários deles atuam como fitoalexinas, compostos antimicrobianos produzidos em resposta ao ataque de microrganismos, e compostos anti-herbivoria que impedem ataques de herbívoros (SCHWAB; WUST, 2015).

O grupo dos diterpenos exhibe várias bioatividades incluindo anticancerígena (LUO et al., 2014), antivirótica (CHEN et al., 2009), antimicrobianas e anti-inflamatórias (CHUA, 2014), sugerindo valores farmacêuticos potenciais (SHEN *et al.*, 2016).

Os triterpenos são sintetizados a partir da condensação cauda-cauda de duas unidades de sesquiterpeno (pela extremidade fosfato), sendo alguns de seus representantes os brassinoesteroides, fitoesteroides de membrana, algumas fitoalexinas, toxinas e componentes de ceras cuticulares com funções diversas tais como formação de saponinas (VOUTQUENNE-NAZABADIOKO *et al.*, 2013), estrutura das barreiras lipófilas cuticulares (BUSCHHAUS; JETTER, 2012), ou como cristais epicuticulares na mediação de interações planta-inseto (GUHLING *et al.*, 2005).

Tetraterpenos são terpenos que contêm oito unidades isoprênicas, sendo o principal deles os carotenoides, pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos. Terpenos que apresentam mais de oito unidades de isopreno são denominados politerpenos, como ubiquinonas, poliprenoides e polímeros longos como a borracha encontrada no látex (CROTEAU *et al.*, 2000).

3.1. Biossíntese

As plantas utilizam duas vias independentes capazes de sintetizar os precursores universais dos isoprenoides, isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). A via clássica do ácido mevalônico citosólica (MVA) origina IPP a partir de acetil-CoA, enquanto a via plastidial 2-C-metileritritol 4-fosfato (MEP), descrita mais recentemente, leva à formação de IPP e DMAPP a partir de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (VRANOV'Á *et al.*, 2013). Embora a compartimentação subcelular das duas vias ocorra de forma independente, esta não é absoluta e intermediários podem ser trocados através da membrana plastidial por transportadores ainda não identificados e estabelecer uma comunicação metabólica cruzada entre as duas vias (HEMMERLINA *et al.*, 2012; PULIDO *et al.*, 2012). A via MVA produz apenas IPP, a via MEP resulta na síntese de IPP e DMAPP numa proporção de 6: 1

(ROHDICH *et al.*, 2003). Assim, ambas as vias dependem da isopentenil difosfato isomerase (IDI), que reversivelmente converte IPP para DMAPP e controla o equilíbrio entre elas (NAKAMURA *et al.*, 2001). A via do ácido mevalônico (MVA) consiste em seis reações enzimáticas e é iniciada por uma condensação gradual de três moléculas de acetil-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, que sofre redução a MVA seguido por duas fosforilações subsequentes e uma decarboxilação/eliminação com formação de IPP e através da ação da enzima IPP-isomerase, pode originar DMAPP (LANGE *et al.*, 2000). Esta via forma os precursores para a biossíntese citosólica de sesquiterpenos voláteis, fitosteróis, brassinosteróides e triterpenóides, e para a biossíntese de terpenóides na mitocôndria, por exemplo, ubiquinonas e poliprenóis (HSIEH *et al.*, 2008), no entanto, novas evidências sugerem que a via do MVA é distribuída entre o citoplasma, retículo endoplasmático e peroxissoma (**Figura 6.3**) (PHILLIPS *et al.*, 2008; DUDAREVA *et al.*, 2012; PULIDO *et al.*, 2012).

A via MEP exclusivamente plastídica proporciona precursores para hemiterpenos voláteis, monoterpênicos e diterpenos, como por exemplo, isopreno, os carotenoides e os seus produtos de degradação, citocininas, giberelinas, clorofila, tocoferóis e plastoquinonas (HSIEH *et al.*, 2008).

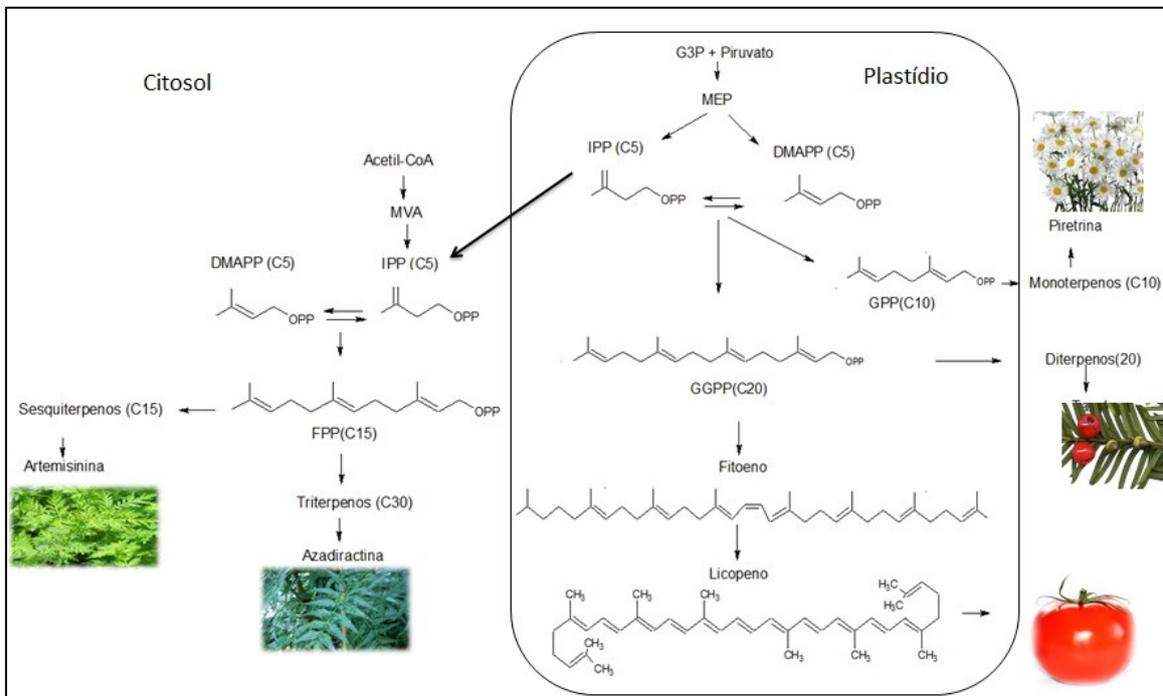


Figura 6.3. Via de biossíntese de terpenos. MVA, ácido mevalônico; MEP, metileritritol fosfato; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; FPP, farnesil difosfato; GPP, geranyl difosfato; GGPP, geranylgeranyl difosfato. *Fonte:* Adaptado de Lipko e Swiezewska (2016).

As rotas biossintéticas ocorrem por meio de um intercâmbio bioquímico de produtos e precursores entre os diversos compartimentos celulares, como plastídio, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndria e citosol. Por exemplo, em plastídios o GPP (C10) e GGDP (C20) estão presentes e são utilizados para a biossíntese dos monoterpenos e diterpenos (**Figura 6.4**), respectivamente (ZHANG *et al.*, 2015). No citosol, o FPP é utilizado para a biossíntese de sesquiterpenos e do triterpeno e esteróis (duas unidades de FPP) (DONG *et al.*, 2016). Nas mitocôndrias, o GGPP é usado para a biossíntese de ubiquinona e o FPP é usado para a biossíntese de sesquiterpeno (**Figura 6.5**) (KAPPERS *et al.*, 2005).

A disponibilidade destes substratos é uma função das preniltransferases localizadas dentro de cada organela: geranyl difosfato sintase (GDPS E.C. 2.5.1.255) nos plastídios; geranylgeranyl difosfato sintase (GGDPS E.C. 2.5.1.29) nos plastídios, mitocôndrias e citosol; e farnesil difosfato sintase (FDPS E.C. 2.5.1.10) nas mitocôndrias e citosol. Apesar da sua localização diferenciada, todas as três enzimas utilizam isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) como substratos. A capacidade de biossíntese isoprenoidal nos diferentes sub-compartimentos pode ser postulada como uma função da atividade local de GDPS, FDPS e GGDPS, produção local de IDP e DMADP e a capacidade de troca desses substratos entre os componentes (VRANOV' A *et al.*, 2013).

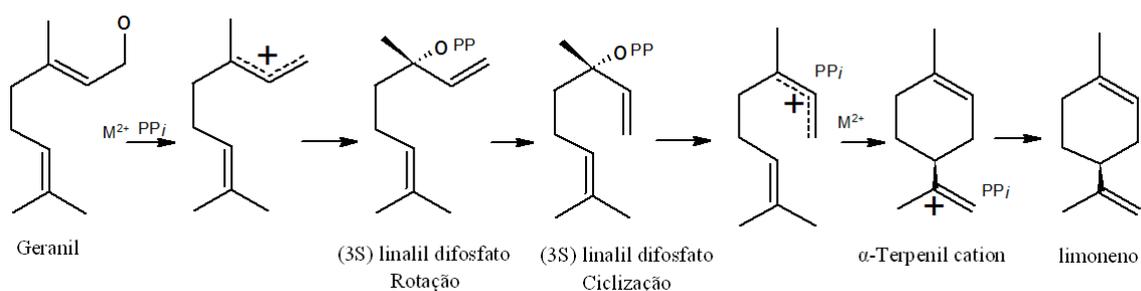


Figura 6.4. Biossíntese do limoneno. *Fonte:* Adaptado de Maróstica Júnior e Pastore (2007).

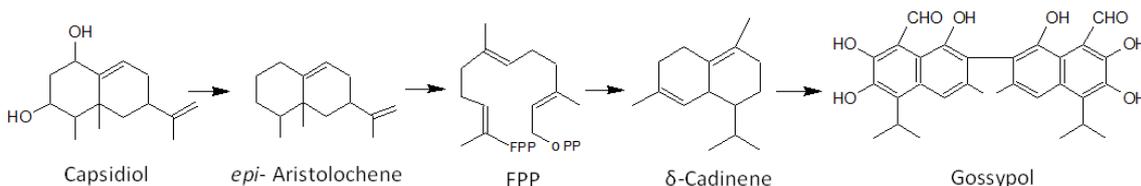


Figura 6.5. Biossíntese do gossypol. *Fonte:* Adaptado de Barreiro (2009).

3.2. Importância econômica dos terpenos

Além da importância no papel fisiológico e no metabolismo, desempenhado pelos terpenos, muitos são de interesse econômico para a produção de produtos como borracha, fármacos, nutracêuticos, sabores, fragrâncias, pigmentos, inseticidas e compostos industriais (BOHLMANN; KEELING, 2008).

Monoterpenos e sesquiterpenos são encontrados em óleos essenciais. Além disso, numerosos sesquiterpenóides atuam como fitoalexinas, compostos antibióticos produzidos por plantas em resposta ao desafio microbiano, e como deterrentes que desestimulam a herbivoria oportunista, características extremamente exploradas pelas indústrias de pesticidas. Diterpenóides exibem várias bioatividades, incluindo anticancerígena (LUO *et al.*, 2014), antivirótica (CHEN *et al.*, 2009), antimicrobianas e anti-inflamatórias (CHUA, 2014), sugerindo propriedades farmacêuticas potenciais (SHEN *et al.*, 2016).

Terpenóides de plantas, tais como artemisinina, taxol e ginkgolides, têm bons efeitos curativos em sobre diversas doenças. A artemisinina, uma lactona sesquiterpenóide derivada de *Artemisia annua* L., é atualmente a melhor terapêutica contra as estirpes de *Plasmodium falciparum* causadoras de malária e resistentes aos fármacos (WEATHERS *et al.*, 2006). O paclitaxel (taxol), um diterpenoide produzido por *Taxus brevifolia* e outras espécies de teixo, é um agente anticancerígeno importante (LENKA *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2016).

O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, um monoterpene monocíclico faz parte da estrutura de mais de 300 compostos vegetais. Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes terpenos na natureza. S-(-)-limoneno é, principalmente, encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp., enquanto R-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia (*Carum carvi* L.). O limoneno é utilizado como solvente para resinas, síntese de outros compostos químicos, aplicações em borracha, tintas, agente dispersante para óleo, além da síntese química do mentol (MARÓSTICA JÚNIOR; PASTORE, 2007). A ação antiinflamatória encontrada no óleo de *Cordia verbenacea* tem como principais componentes químicos terpenos e sesquiterpenos, entre eles, α -pineno, β -pineno e trans-cariofileno (BENJAMIN; FAVORETO, 2012).

3.3. Terpenos e a relação com a defesa de plantas

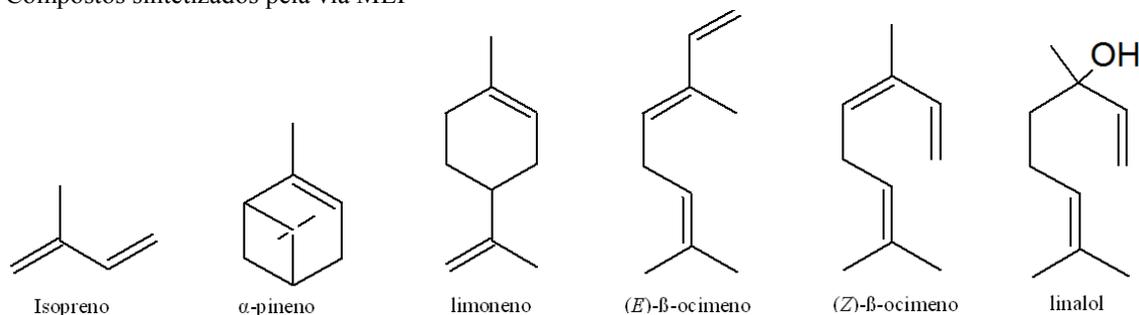
As plantas produzem vários compostos que desempenham papel importante em uma ampla gama de processos ecológicos e biológicos, como no crescimento e desenvolvimento da planta, nas interações da planta com outros organismos, como por exemplo, compostos voláteis que atuam como atrativos ou repelentes de insetos, polinizadores, microrganismos e outras plantas (ARIMURA *et al.*, 2004; KEELING; BOHLMANN, 2006; UNSICKER *et al.*, 2009; DONG *et al.*, 2016). Além disso, protegem as plantas contra estresses abióticos, incluindo a termotolerância e o estresse oxidativo. Entre 5-10% de carbono assimilado podem ser convertidos em compostos voláteis de plantas e são mais expressivos quando as plantas estão sob estresse (DUDAREVA *et al.*, 2006; VICKERS *et al.*, 2009)

Qualquer estresse pode alterar potencialmente a taxa de liberação e as concentrações de compostos, afetando, assim, as relações entre os organismos vivos. Por exemplo, o dano foliar aumenta a emissão de sesquiterpenos e o teor de alcaloides do néctar e, portanto, pode alterar a preferência do polinizador. A produção e a liberação dos compostos variam dependendo da espécie vegetal (ADLER *et al.*, 2006; THEIS; ADLER, 2012). Em condições de estresse ocorre a liberação de mono e sesquiterpenoides, como linalol, isômeros de ocimeno, isômeros de farneseno, (E)- β -cariofileno entre outros (**Figura 6.6**), (COPOLOVICI *et al.*, 2011; PINTO-ZEVALLOS *et al.*, 2013). Os compostos voláteis liberados pela planta estão divididos em quatro níveis, de acordo com a sua função: celular, superfície da planta, ecossistema e atmosfera (HOLOPAINEN, 2004).

Ao nível celular, os compostos podem proteger a planta contra danos causados pela oxidação. Há exemplo do ácido jasmônico e do metil jasmonato que são liberados pelos tecidos lesionados após danos (bióticos ou abióticos) em algumas espécies de plantas (PINTO-ZEVALLOS *et al.*, 2013). Os terpenos também agem contra efeitos causados por agentes abióticos, evitando a oxidação, ao extinguir espécies de oxigênio reativas e ao reagir com o ozônio (O₃) da atmosfera, além da proteção contra o calor ao reduzir espécies de oxigênio reativas produzidas por altas temperaturas (LORETO; SCHNITZLER, 2010). Como proteção aos estresses bióticos, os terpenos protegem as plantas de microrganismos e repelem insetos, além de interações entre plantas e herbívoros, vinculando cadeias alimentares em ecossistemas complexos. Promovem a atração de polinizadores, inimigos naturais (predadores e parasitoides) e de animais

disseminadores de sementes assim como a localização de plantas hospedeiras por insetos herbívoros (CLAVIJO MCCORMICK *et al.*, 2012; FRYE *et al.*, 2013)

Compostos sintetizados pela via MEP



Compostos sintetizados pela via MVA

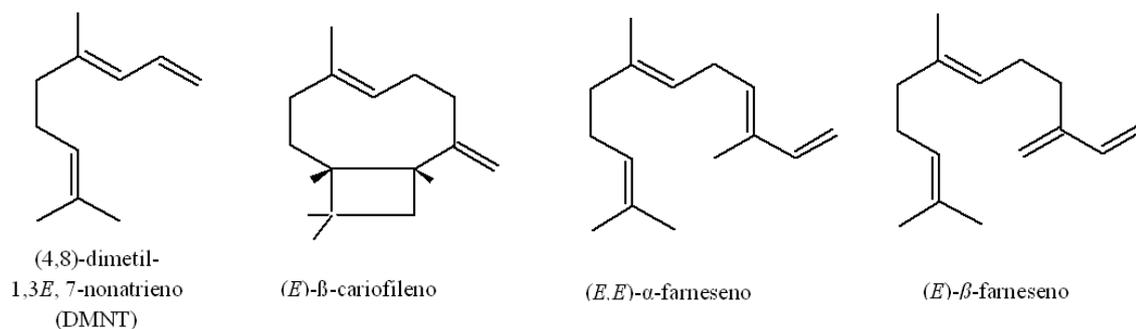


Figura 6.6. Estruturas moleculares de alguns compostos emitidos por planta estressada. *Fonte:* Adaptado de Kask *et al.* (2013).

O isopreno (C₅) e os hidrocarbonetos monoterpênicos (C₁₀) estão envolvidos na proteção contra estresse abiótico, em várias espécies de plantas, através da estabilização da membrana e efeitos antioxidantes diretos (PALMER-YOUNG *et al.*, 2015). Isoprenos e monoterpênicos podem aumentar a termotolerância ou neutralizar o estresse oxidativo, ao mesmo tempo em que interferem na atração de herbívoros (SCHNITZLER *et al.*, 2010).

Os monoterpênicos e os sesquiterpênicos são os principais compostos voláteis liberados pelas plantas após dano por herbívoros, atraindo artrópodes que atacam ou parasitam os primeiros (DUDAREVA *et al.*, 2004). Além de terpenoides voláteis, certos diterpênicos e sesquiterpênicos são fitoalexinas envolvidas na defesa direta de plantas contra herbívoros e patógenos. O (*S*)-limoneno é uma fitoantecipina volátil, que desempenha um papel significativo na supressão do crescimento de *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* em plântulas de arroz (LEE *et al.*, 2016). A liberação de monoterpênicos α -pineno, por ferimento, em pinheiro (*Pinus sylvestris* L.), age como

atrativo para *Hylobius abietis*. No entanto, a atração de *H. abietis* pode ser reduzida pela emissão de limoneno (NORDLANDER, 1991). Compostos terpenóides emitidos a partir de plantas de feijão-de-lima infestadas de ácaros agiram como sinais aéreos, ativando respostas de defesa induzidas por jasmonato e etileno, aumentando a resistência contra ácaros-aranha nas folhas de plantas vizinhas (ARIMURA *et al.*, 2000). A intensidade de resposta em relação a emissão de compostos pode ser quantitativamente relacionada com a gravidade de estresses bióticos e abióticos (NIINEMETS *et al.*, 2013).

4. Alcalóides

Os alcalóides caracterizam-se pela presença de um átomo de nitrogênio na molécula e representam um grupo amplo com mais de 20 mil compostos isolados de diversos organismos (KUTCHAN *et al.*, 2015), em aproximadamente 20% das plantas vasculares (ZIEGLER; FACCHINI, 2008), sendo Solanaceae, Papaveraceae, Apocynaceae e Ranunculaceae as principais famílias que os contêm. São compostos de baixa massa molecular, solúveis em água e a maioria apresenta caráter básico. Podem ser divididos em diferentes classes, conforme **Tabela 6.3** (MITHÖFER; BOLAND, 2012).

As funções biológicas dos alcalóides estão relacionadas, principalmente, à defesa, porém, alguns autores sugerem que tais moléculas poderiam armazenar e transportar nitrogênio, nas plantas (WINK; WITTE, 1985). Além disso, são amplamente conhecidas suas atividades farmacológicas, como por exemplo, analgésica (morfina e codeína), antineoplásica (vinblastina, vincristina), antimalárica (quinina e cloroquinina), entre outras (ZULAK *et al.*, 2006).

Tabela 6.3 – Principais classes de alcalóides e seus respectivos precursores.

Classe de alcalóides	Precursor biossintético	Exemplos
Pirrolidínicos	L-Ornitina	Nicotina
Tropânicos	L-Ornitina	Atropina, cocaína
Pirrolizidínicos	L-Ornitina	Retronecina
Fenantroindolizidínicos	L-ornitina	Tiloforina
Piperídínicos	L-Lisina	Coniína
Quinolizidínicos	L-Lisina	Lupinina
Imidazólicos	L-Histidina	Pilocarpina
Quinolínicos	L-Triptofano	Quinina
Indólicos	L-Triptofano	Reserpinina
Piridínicos	Ác. L-Aspártico	Tenelina
Quinolínicos	Ác. Antranílico	Dictamina
Quinazolínicos	Ác. Antranílico	Peganina
Terpenoídicos (mono, sesqui, di, tri)	Ác. Mevalônico	Valerianina, dendrobina, atisina, ciclomicrofilina
Esteroídico	Ác. Mevalônico	Solasodina
Isoquinolínico	Tirosina	Codeína/morfina

A maioria dos alcalóides são sintetizados a partir de aminoácidos proteicos (configuração L), dentre eles lisina, tirosina e triptofano, além de não protéicos, como a ornitina. Alguns têm como precursores esteróides e terpenoides, sendo que o nitrogênio parece ser inserido à molécula em estágios finais da síntese (ANISZEWSKI, 2007).

O estudo dos alcalóides praticamente se iniciou com o isolamento da morfina em 1806 por Friedrich Sertüner, mas somente em 1952 teve sua estrutura química elucidada. O termo alcalóide foi proposto por Meißner em 1819 devido as características alcalinas de compostos isolados em plantas, na época (ANISZEWSKI, 2007). Certos alcaloides recentemente descobertos não apresentam o caráter básico, sendo considerados neutros apesar da presença do nitrogênio na molécula (KUTCHAN, 1995).

4.1. Biossíntese dos alcalóides

Devido à complexidade estrutural dos alcalóides, principalmente pela presença de um ou mais centros assimétricos, a elucidação de suas vias biossintéticas foram e continuam sendo desafios aos pesquisadores.

Um exemplo é o caso da nicotina, com apenas um centro assimétrico, que apesar de seu isolamento ter ocorrido em 1828, somente em 1904 teve sua estrutura determinada, enquanto a morfina levou quase 150 anos (KUTCHAN *et al.*, 2015). Além da estrutura, outros complicadores para estudos da biossíntese de alcalóides incluem as baixas concentrações produzidas, a interferência de outros compostos na extração e isolamento das enzimas. No entanto, técnicas moleculares vêm sendo utilizadas, mudando o cenário e contribuindo na elucidação das vias de síntese (KUTCHAN *et al.*, 2015).

A ajmalicina, um alcalóide indólico monoterpenoide, derivado do L-triptofano, foi a primeira a ter sua biossíntese elucidada a nível enzimático. Assim como outros 1800 alcalóides indólicos monoterpénoides, a sua formação inicia-se pela descarboxilação do triptofano pela triptofano descarboxilase (E.C. 4.1.1.28), resultando em triptamina. Esta, pela ação da estrictonidina sintase (E.C. 4.3.3.2) é condensada à secologanina (secoiridoide derivado do geraniol), formando 3 α (S)-strictosidina que originará diversos outros alcalóides pela atividade de diferentes enzimas (**Figura 6.7**).

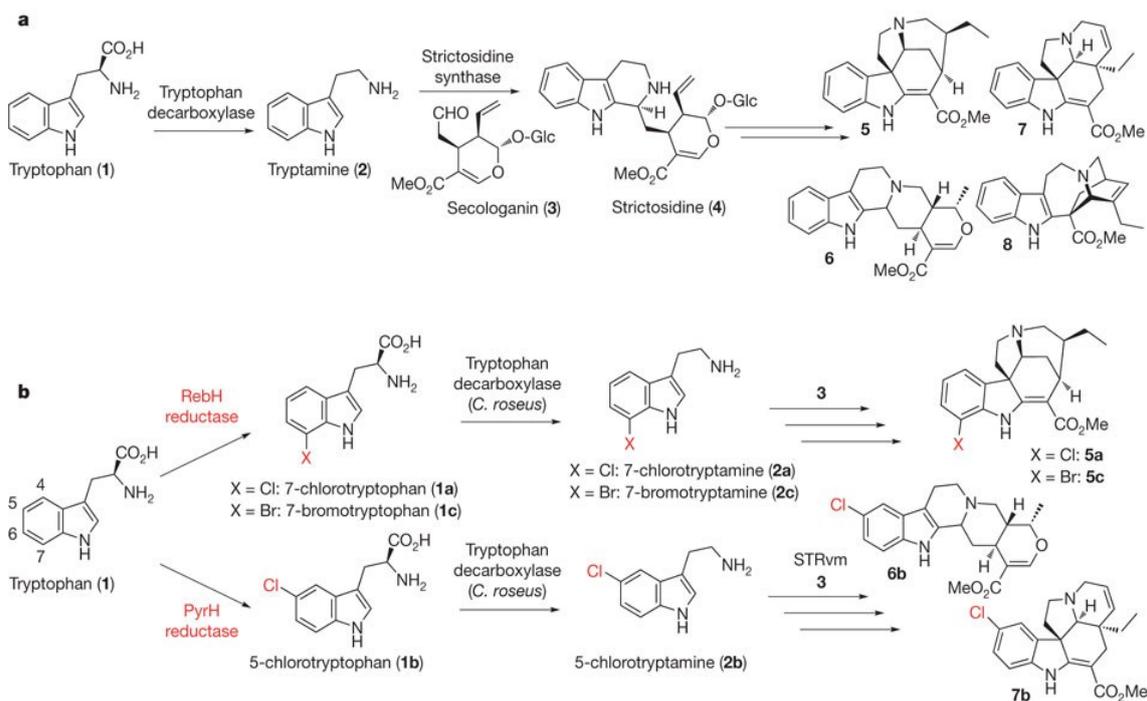


Figura 6.7. a) Triptofano (1) é decarboxilado pela triptofano decarboxylase formando triptamina (2), a qual reage com secologanina (3) para originar estrictosidina (4). Após numerosos rearranjos, estrictosidina (4) é convertida em diversos alcaloides monoterpênicos indólicos, tais como 19,20-diidroacuamicina (5), ajmalicina (6), tabersonina (7) e catarantina (8). Me: CH₃; Glc: glucose. **b)** RebH e PyrH, juntamente com uma reductase, halogenam o anel indólico do triptofano para produzir clorotriptofano. No esquema é mostrada os clorotriptofanos halogenados 1a e 1b podem ser decarboxilados pela triptofano decarboxilase (*C. roseus*) para formar as clorotriptaminas 2a e 2b, as quais serão convertidas em alcaloides monoterpênicos indólicos clorados. *Fonte:* Adaptado de Runguphan *et al.* (2010)

Um exemplo de determinação da biossíntese com uso de técnicas de cDNA foi da berberina, um alcaloide benzilisoquinólico. A elucidação mostrou a especificidade das enzimas, assim como a compartimentalização na síntese de alcaloides. As enzimas envolvidas podem estar localizadas em diferentes compartimentos celulares, como por exemplo, as citocromos P450 que em geral se encontram associadas ao retículo endoplasmático, enquanto metiltransferases no citosol e estrictosidina sintase se encontra no vacúolo. Além desta compartimentação, o armazenamento também ocorrerá em células diferentes de onde os alcaloides foram produzidos, indicando a presença de transportadores (KUTCHAN *et al.*, 2015).

4.2. Importância econômica dos alcaloides

Além de sua importância ecológica/biológica, os alcaloides também apresentam características que os tornam úteis como fármacos, com amplo uso na medicina, como por exemplo a codeína, escopolamina, vinblastina, ou com propriedades estimulantes ou sedativas utilizados por grande número de pessoas, como cafeína, nicotina e cocaína (OLIVOTO *et al.*, 2017).

Para mencionar alguns importantes alcalóides, como os morfínicos morfina e codeína com ação analgésica e antitussígena, ambos provenientes do ópio (*Papoula somnifera*) e empregados na medicina há muitos anos (KUTCHAN *et al.*, 2014) e que se ligam a receptores opióides no sistema nervoso central, que estão ligados a proteínas G inibitórias (TRIVEDI *et al.*, 2013). Já os monoterpênicos indólicos, como a vincristina e vinblastina, isolados de *Catharanthus roseus*, são moléculas usadas no tratamento de alguns tipos de neoplasias (KUTCHAN *et al.*, 2015). Outros alcalóides amplamente utilizados na medicina, como camptotecina, colchicina, quinina, escopolamina, são exemplos da importância deste grupo de produtos naturais no tratamento de diversas doenças.

4.3. Alcalóides envolvidos na defesa das plantas

Todos os organismos vivos estão expostos a diversos fatores bióticos e abióticos que podem afetar seu desenvolvimento e determinar a morte dos mesmos. Por isso, os sistemas biológicos desenvolveram mecanismos de defesa contra potenciais “inimigos”.

As plantas, devido suas características, são expostas a diversas ameaças ambientais. Na tentativa de se protegerem, desenvolveram vários mecanismos de defesa, que incluem barreiras estruturais e/ou químicas, sendo estas últimas de fundamental importância, já que têm a capacidade de sintetizar centenas de milhares de compostos especializados, envolvidos em respostas às mudanças do ambiente (PICHERSKY; LEWINSOHN, 2011). A defesa química pode ocorrer constitutivamente (compostos pré-formados), característica de cada genótipo, e através de indução por estímulos de danos causados por fatores diversos, sendo ativados genes específicos para tal.

Alguns dos alcalóides mais conhecidos na defesa vegetal são a colchicina, a

caféina e a nicotina. O primeiro, do grupo dos tropicânicos, é produzido por *Colchicum autumnale*, sendo tóxico a *Apis mellifera* na concentração de 0,03% (v/v) (DETZEL; WINK, 1993). Já a caféina, um alcalóide purínico, é encontrado em diversas espécies vegetais, dentre as mais conhecidas estão o cafeeiro (*Coffe arábica*), *Camellia* sp., cacau (*Theobroma cacao*) e erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Um dos alcalóides purínicos mais estudados, é a nicotina. A biossíntese de nicotina é estimulada pela ação da herbivoria nas folhas da planta de fumo (*Nicotiana tabacum*) que resulta no aumento dos níveis de jasmonato. Este fitormônio é transportado através do floema até as raízes da planta, local de biossíntese, estimulando a produção da nicotina. Então, a nicotina é transportada através do xilema às partes aéreas da planta, e acumula-se nos vacúolos das células foliares (**Figura 6.8**). O alvo da nicotina são os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), receptores pós-sinápticos mais abundantes nos insetos (SATTELLE, 1980).

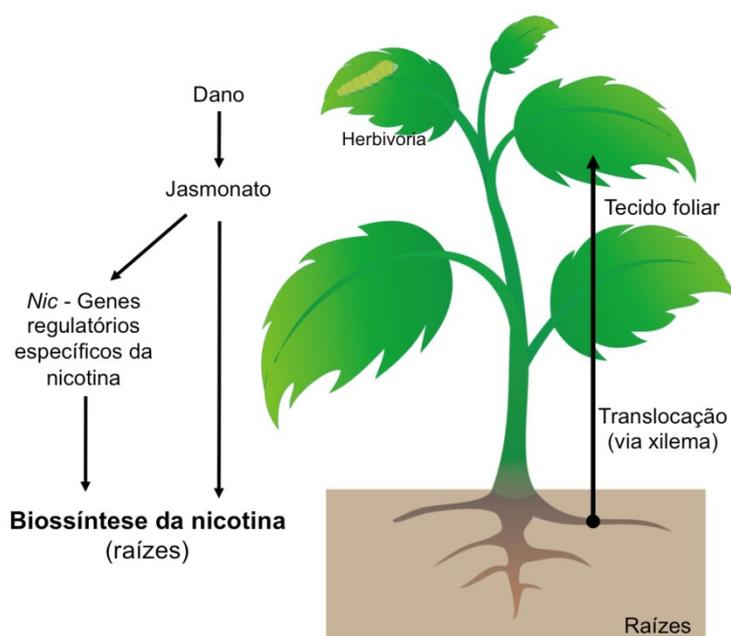


Figura 6.8. Biossíntese da nicotina. *Fonte:* Adaptado de Mithöfer e Boland (2012).

5. Glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos

Os glicosídeos cianogênicos são β -glicosídeos de α -hidroxinitrilas caracterizadas pela capacidade de liberar ácido cianídrico (cianeto de hidrogênio, HCN) quando

hidrolisados por β -glicosidasas e α -hidroxinitrilases, em processo conhecido como cianogênese ou bomba de cianeto (MORANT *et al.*, 2008; KUTCHAN *et al.*, 2014).

Todas as plantas produzem quantidades ínfimas de HCN como produto da biossíntese de etileno, mas poucas são aquelas que liberam este composto, em concentrações significativas, pela quebra do glicosídeo cianogênico. O HCN inibe a atividade de enzimas, como a citocromo c oxidase (EC 1.9.3.1), a enzima final da cadeia de transporte de elétrons no processo respiratório (GLEADOW; MØLLER, 2014).

Já foram constatadas mais de 2.600 espécies, distribuídas em cerca de 110 famílias que sintetizam glicosídeos cianogênicos, com estrutura básica conforme **Figura 6.9** (RAJNIAK, 2015). São exemplos destes glicosídeos cianogênicos a amigdalina ou amigdalósido, das amêndoas amargas, a linamarina, das sementes do linho, a maniotoxina, da raiz da mandioca e a faseolunatina, do feijão tóxico (*Phaseolus lunatus*) (KAUTZ, 2014).

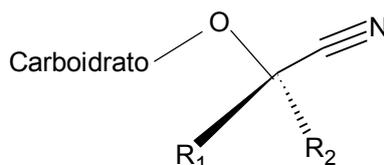


Figura 6.9. Estrutura básica de um glicosídeo cianogênico. *Fonte:* Autores (2016).

Um dos pontos importantes para as plantas que sintetizam estas substâncias é a compartimentação, a qual evita autotoxicidade, assegurando que a liberação da porção tóxica só ocorra com o rompimento das estruturas. Assim, os glicosídeos serão armazenados em vacúolos (em folhas) ou vesículas, como por exemplo a linamarina, presente nos caules e pecíolos da mandioca (ELIAS *et al.*, 1997). Já a localização das β -glicosidasas é bastante variável, dependendo da espécie, com algumas sendo encontradas ligadas à parede celular, no espaço apoplástico, no citosol, nos cloroplastos ou em pequenas vesículas (GLEADOW; MØLLER, 2014). Evidências sugerem que α -hidroxinitrilase seja uma enzima citoplasmática (HICKEL *et al.*, 1996).

A família Rosaceae é especialmente rica em plantas produtoras destes compostos, destacando-se as sementes de amêndoas amargas, pêssegos, ameixas, cerejas, damascos, etc. Na mandioca, na amêndoa e no sorgo foram encontradas 36 diferentes estruturas químicas relacionadas aos glicosídeos cianogênicos, como a

linamarina, lotaustralina, prunasina, amigdalina e durrina, incluindo di e tri-glicosídeos derivados. (PICMANOVA, 2015).

5.1 Biossíntese de Glicosídeos Cianogênicos

Os glicosídeos cianogênicos derivam de cinco L-aminoácidos: isoleucina, leucina, valina, fenilalanina e tirosina, além de aminoácidos não proteicos como ciclopentenil glicina (KUTCHAN *et al.*, 2014). A via biossintética é resumida na **Figura 6.10**.

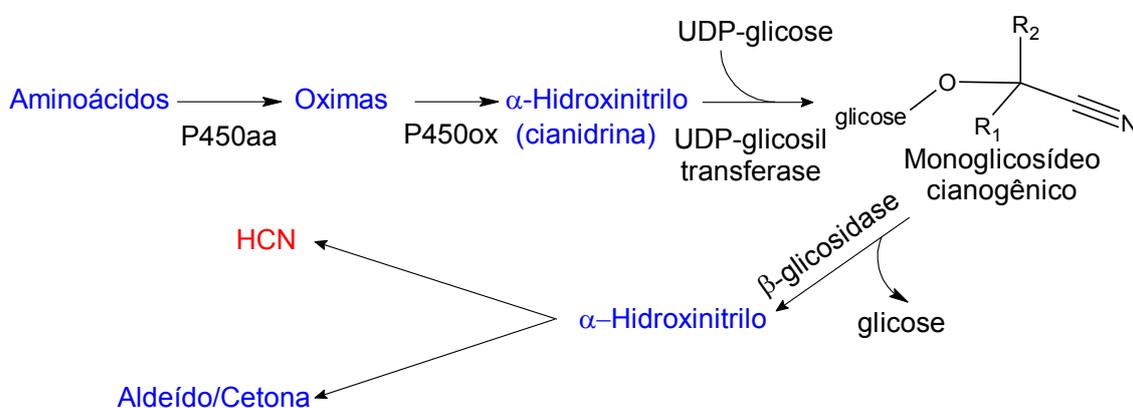


Figura 6.10. Biossíntese e bioativação de glicosídeos cianogênicos. Estes compostos são sintetizados de aminoácidos em reações catalisadas por duas multifuncionais enzimas: a citocromo P450s ligada à membrana (P450aa e P450ox) e a UDP-glicosil-transferase. A cianogênese ocorre quando β-glicosidase hidrolisa a ligação glicosídica e forma α-hidroxinitrila (cianidrina) que dissocia-se em HCN ou em uma cetona através da ação de uma α-hidroxinitrilase ou espontaneamente e meio alcalino. Abreviações: aa, aminoácido; ox, oxima. *Fonte:* Adaptado de Gleadow e Møller (2014).

5.2. Glucosinolatos

Os glucosinolatos ou β-tioglicosídeos são compostos ricos em enxofre, sintetizados em plantas da família Brassicaceae (brócolis, repolho, couve-flor) (DOSZ, 2014; KUTCHAN *et al.*, 2014). Possuem estrutura comum contendo um grupo β-D-tioglicose ligado a uma aldoxima sulfonada e cadeia lateral variável, derivada de um aminoácido. Conforme os aminoácidos precursores, os glucosinolatos podem ser

divididos em três classes: a) glucosinolatos alifáticos; b) glucosinolatos aromáticos (tirosina e fenilalanina); c) glucosinolatos indólicos (triptofano) (REDOVNIKOVIĆ *et al.*, 2008).

Constituem uma pequena classe de compostos cuja bioatividade provém da hidrólise da molécula por β -tioglucosidases, também denominadas de mirosinases. Com a quebra, a porção aglicona poderá sofrer rearranjos, através de vias diversas, produzindo isotiocianatos, nitrilas, epitionitrilas, oxazolidina-2-tionas ou tiocianato (Figura 6.11 e 6.12) (KUTCHAN *et al.*, 2014).

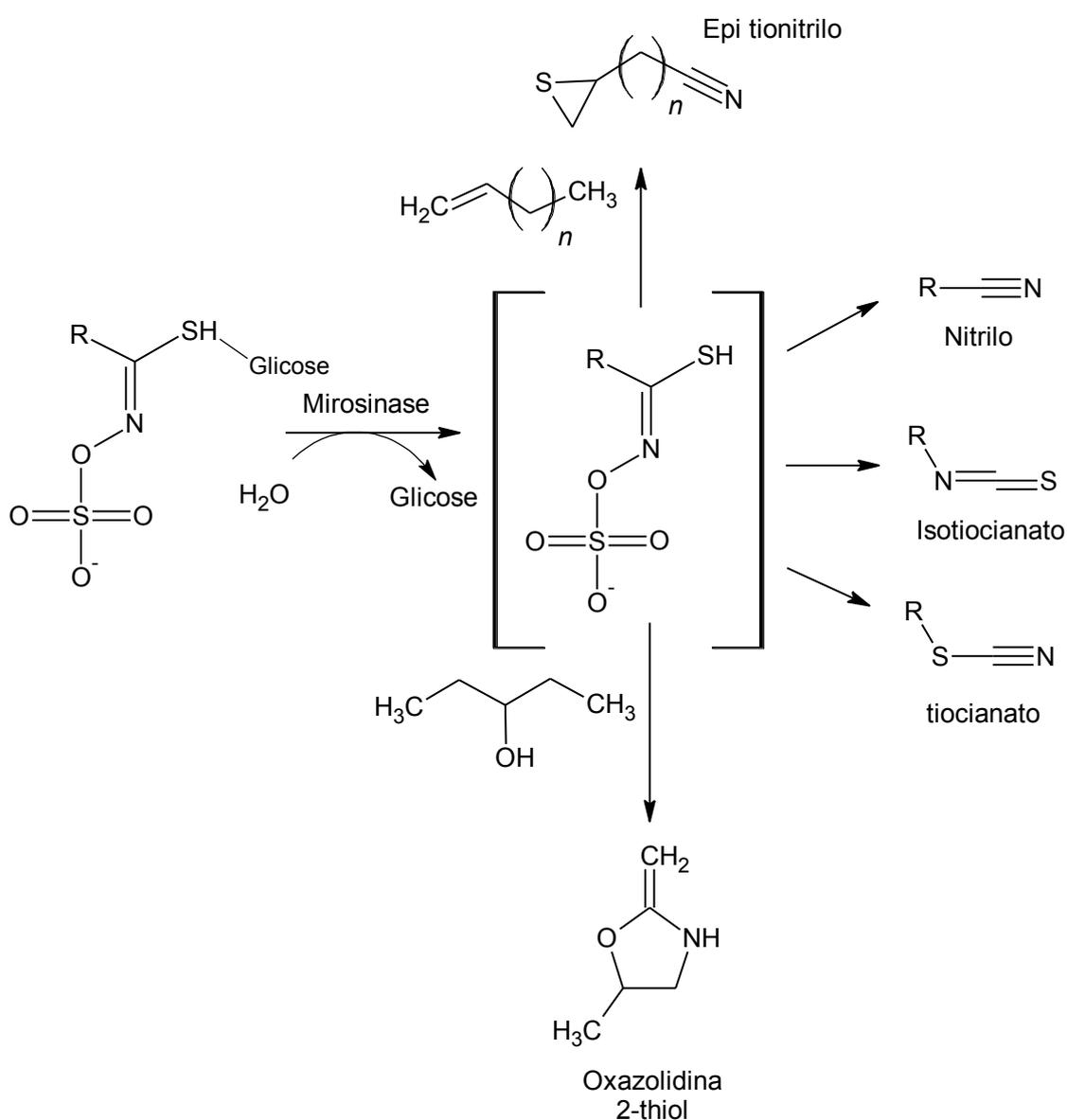


Figura 6.11. Hidrólise de glucosinolato. *Fonte:* Adaptado de Dinkova-Kostova e Vostov (2012).

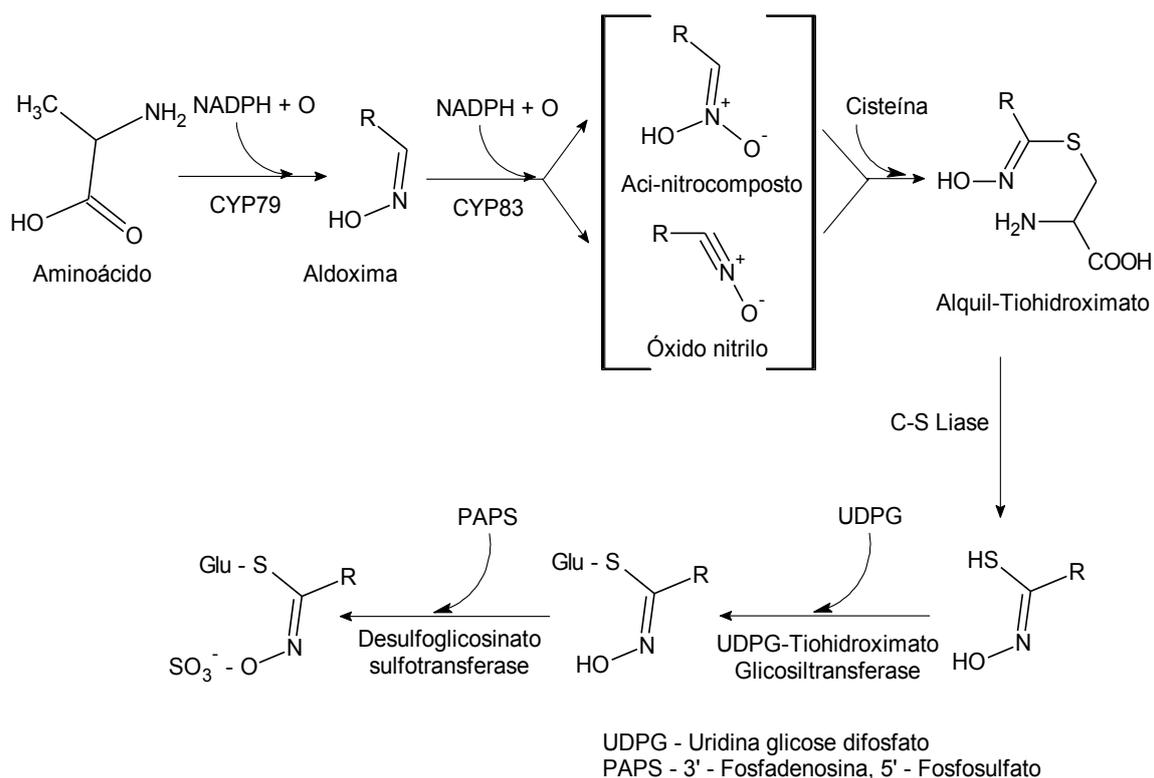


Figura 6.12. Biossíntese da estrutura do núcleo de glucosinolatos. *Fonte:* Autores (2016).

Glucosinolatos e isotiocianatos têm sido objetos de pesquisa após a descoberta de que o sulforafano, um isotiocianato de brócolis, induz potencialmente proteínas citoprotetoras em mamíferos (DINKOVA-KOSTOVA; VOSTOV, 2012).

5.3. Biossíntese de Glucosinolatos

A biossíntese dos glucosinolatos compreende três fases: alongamento da cadeia do aminoácido precursor, com a adição de grupamentos metileno às cadeias laterais; conversão do aminoácido em glucosinolato; e modificações das cadeias laterais (REDOVNIKOVIĆ *et al.*, 2008) **Figura 6.13.**

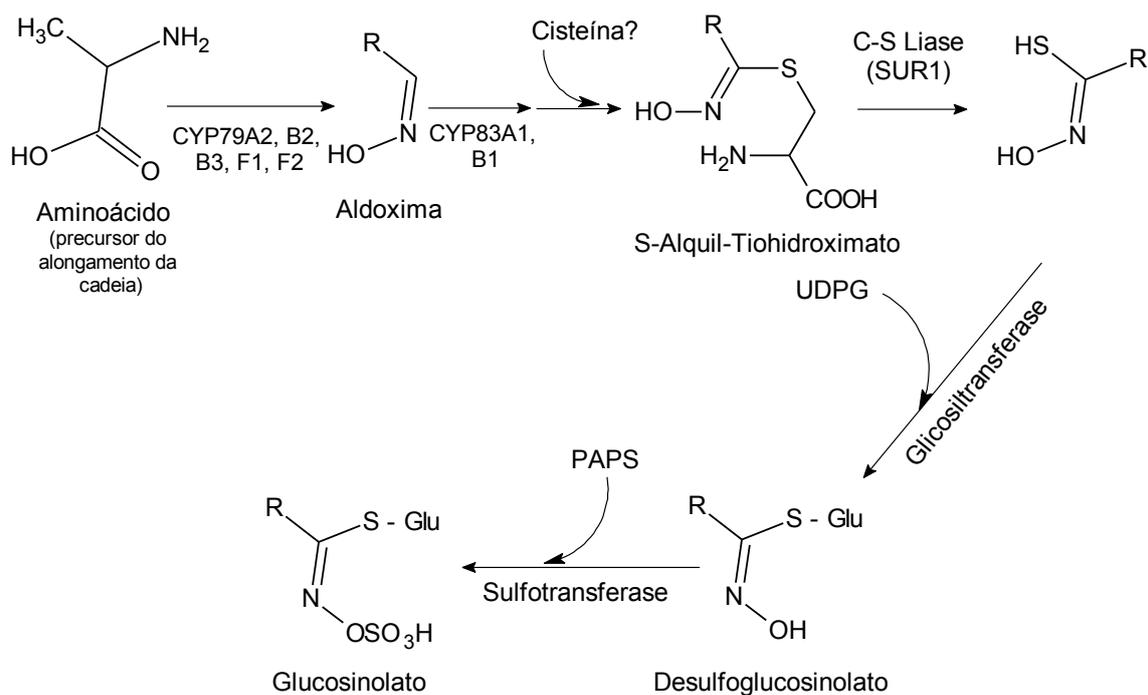


Figura 6.13. Biossíntese de glucosinolatos. *Fonte:* Adaptado de Piotrowski *et al.* (2016).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, L.S.; WINK, M.; DISTL, M.; LENTZ, A.J. Leaf herbivory and nutrients increase nectar alkaloids. **Ecology Letters**, v. 9, n. 8, p. 960-967, 2006.
- ALAM, P.; ALQASOUMI, S.I.; SHAKEEL, F.; ABDEL-KADER, M.S. HPTLC densitometric analysis of arbutin in bulk drug and methanolic extracts of *Arctostaphylos uva-ursi*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 17, p. 1671-1675, 2011.
- ALU'DATT, M.H.; RABABAH, T.; ALHAMAD, M.N.; AL-MAHASNEH, M.A.; ALMAJWAL, A.; GAMMOH, S.; EREIFEJ, K.; JOHARGY, A.; ALLI, I. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 218, p. 99-106, 2017.
- ANISZEWSKI, T. Alkaloid Chemistry, Applications and Ecological Role. Elsevier Science, p. 334, 2007.
- ARCEUSZ, A.; WESOŁOWSKI, M.; KONIECZYNSKI, P. Methods for Extraction and Determination of Phenolic Acids in Medicinal Plants: A Review. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 12, p. 1821-1829, 2013.

- ARIMURA, G.; OZAWA, R.; SHIMODA, T.; NISHIOKA, T.; BOLAND, W.; TAKABAYASHI, J. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. **Nature**, v.406, p. 512-515, 2000.
- ARIMURA, G.-I.; OZAWA, R.; KUGIMIYA, S.; TAKABAYASHI, J.; BOHLMANN, J. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)-beta-ocimene and transcript accumulation of (E)-beta-ocimene synthase in *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1976-83, 2004.
- BARREIRO, E.J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v. 32, n.3, p.679-688, 2009.
- BENJAMIN, G.; FAVORETO, R. *Cordia verbenacea* DC Boraginaceae. **Revista Fitos**, v. 7, p. 17-25, 2012.
- BOHLMANN, J.; KEELING, C.I. Terpenoid biomaterials. **Journal of Plant**, v. 54, p. 656-669, 2008.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: John Wiley & Sons, p.1367, 2000.
- BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves: beta-amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. **Plant Physiology**, v. 160, n. 2, p. 1120-1129, 2012.
- CARETTO, S.; LINSALATA, V.; COLELLA, G.; MITA, G.; LATTANZIO, V. Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26378-26394, 2015.
- CHEN, J.-X.; XUE, H.-J.; YE, W.-C.; FANG, B.-H.; LIU, Y.-H.; YUAN, S.-H.; YU, P.; WANG, Y.-Q. Activity of Andrographolide and Its Derivatives against Influenza Virus in Vivo and in Vitro. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1385-1391, 2009.
- CHENG, F.; CHENG, Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. **Front Plant Science**, v. 6, n. 1020, p. 1-16, 2015.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K.M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013.
- CHUA, L.S. Review on liver inflammation and antiinflammatory activity of *Andrographis paniculata* for hepatoprotection. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 11, p. 1589-98, 2014.

- CLAVIJO MCCORMICK, A.; UNSICKER, S.B.; GERSHENZON, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends in Plant Science**, v.17, n.5, p. 303-310, 2012.
- COPOLOVICI, L.; KÄNNASTE, A.; REMMEL, T.; VISLAP, V.; NIINEMETS, Ü. Volatile emissions from *Alnus glutinosa* induced by herbivory are quantitatively related to the extent of damage. **Journal of Chemical Ecology**, 37, 18–28, 2011.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B.B. et al., eds). **American Society of Plant Physiologists**, p. 1250-1318, 2000.
- DAAYF, F.; EL HADRAMI, A.; EL-BEBANY, A.F.; HENRIQUEZ, M.A.; YAO, Z.; DERKSEN, H.; EL-HADRAMI, I.; ADAM, L.R. Phenolic Compounds in Plant Defense and Pathogen Counter-Defense Mechanisms. In **Recent Advances in Polyphenol Research**. Wiley-Blackwell, p.191-208, 2012.
- DETZEL, A.; WINK, M. Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. **Chemoecology**, vol. 4, p. 8–18, 1993.
- DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; KOSTOV, R.V. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**. v.18, p.337-347, 2012.
- DIXON R.A.; STRACK, D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. **Phytochemistry** v.62, n.6, p. 815-6, 2003.
- DONG, L.; JONGEDIJK, E.; BOUWMEESTER, H.; VAN DER KROL, A. Monoterpene biosynthesis potential of plant subcellular compartments. **New Phytologist**, v. 209, n. 2, p. 679-90, 2016.
- DOSZ, E.B.; KU, K.; JUVIK, J.A.; JEFFERY, E. Total Myrosinase Activity Estimates in Brassica Vegetable Produce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.32, p. 8094-8100, 2014.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J.K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16-32, 2012.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1893-902, 2004.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytoterapy Research**, v.21, p.308-323, 2007.

- ELIAS, M.; NAMBISAN, B.; SUDHAKARAN, P.R. Characterization of linamarase of latex and its localization in petioles in cassava. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v. 341, p.222–228, 1997.
- FENG, F.J.; LI, M.J.; MA, F.W.; CHENG, L.L. Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 69, p. 54-61, 2013.
- FRYE, G.G; CONNELLY, J.W.; MUSIL, D.D.; FORBEY, J.S. Phytochemistry predicts habitat selection by an avian herbivore at multiple spatial scales. **Ecology**, v.94, n.2, p. 308-314, 2013.
- GARRIGA, M.; RETAMALES, J.B.; ROMERO-BRAVO, S.; CALIGARI, P.D.S.; LOBOS, G.A. Chlorophyll, anthocyanin, and gas exchange changes assessed by spectroradiometry in *Fragaria chiloensis* under salt stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 5, p. 505-515, 2014.
- GLEANDOW, R.M.; MOLLER, B.L. Cyanogenic Glycosides: Synthesis, Physiology, and Phenotypic Plasticity. **Annual Review of Plant Biology**, v.65, p.155-185, 2014.
- GOMAA, N.H.; HASSAN, M.O.; FAHMY, G.M.; GONZALEZ, L.; HAMMOUDA, O.; ATTEYA, A.M. Flavonoid profiling and nodulation of some legumes in response to the allelopathic stress of *Sonchus oleraceus* L. **Acta Botanica Brasiliica**, v. 29, n. 4, p. 553-560, 2015.
- GUHLING, O.; KINZLER, C.; DREYER, M.; BRINGMANN, G.; JETTER, R. Surface composition of myrmecophilic plants: cuticular wax and glandular trichomes on leaves of *Macaranga tanarius*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 10, p. 2323-2341, 2005.
- HE, H.B.; WANG, H.B.; FANG, C.X.; WU, H.W.; GUO, X.K.; LIU, C.H.; LIN, Z.H.; LIN, W.X. Barnyard grass stress up regulates the biosynthesis of phenolic compounds in allelopathic rice. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 17, p. 1747-1753, 2012.
- HE, J.; GIUSTI, M.M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 1, p. 163-87, 2010.
- HEMMERLINA, A.; HARWOOD, J.L.; BACH, T.J. A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 95-148, 2012.
- HICKEL, A.; HASSLACHER, M.; GRIENG, L.H. Hydroxynitrile lyases: functions and properties. **Physiology Plant**, v. 98, p.891–898, 1996.
- HOLOPAINEN, J.K. Multiple functions of inducible plant volatiles. **Trends in Plant Science**, v. 9, n.11, p. 529-533, 2004.

- HSIEH, M.H.; CHANG, C.Y.; HSU, S.J.; CHEN, J.J. Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in IspD and IspE albino mutants in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 66, p. 663-673, 2008.
- IWASHINA, T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. **Journal of Plant Research**, v. 113, n. 3, p. 287-299, 2000.
- JOHN, J.; SARADA, S. Role of phenolics in allelopathic interactions. **Allelopathy Journal**, v. 29, n. 2, p. 215-229, 2012.
- KAPPERS, I.F.; AHARONI, A.; VAN HERPEN, T.W.J.M.; LUCKERHOFF, L.L.P.; DICKE, M.; BOUWMEESTER, H.J. Genetic Engineering of Terpenoid Metabolism Attracts Bodyguards to Arabidopsis. **Science**, v. 309, p. 2070-2072, 2005.
- KAUTZ, J.A.S.; DANIEL, T.; BALLHORN, J. Jasmonic Acid Enhances Plant Cyanogenesis and Resistance to Herbivory in Lima Bean. **Journal of Chemical Ecology**, v.40, n.11, p.1186–1196, 2014.
- KEELING, C.I.; BOHLMANN, J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New Phytologist**, v. 170, n. 4, p. 657-75, 2006.
- KUTCHAN, T.M. Alkaloid biosynthesis – the molecular basis for metabolic engineering in plants. **Plant Cell**, v. 7, p.1059-1070, 1995.
- KUTCHAN, T.M.; GERSHENZON, J.; MØLLER, B. L.; GANG, D. R. Natural products. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2 ed. Oxford: John Wiley & Sons, p. 1132-1206, 2014.
- KUTCHAN, T.M.; GERSHENZON, J.; MØLLER, B.L.; GANG, D.R. Natural products. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2 ed. Oxford: John Wiley & Sons, p. 1132-1206, 2015.
- LANGE, B.M.; AHKAMI, A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes—current status and future opportunities. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, p. 169-196, 2013.
- LANGE, M.B.; RUJAN, T.; MARTIN, W.; CROTEAU, R. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 97, n. 24, p. 13172-7, 2000.
- LATTANZIO, V. Phenolic Compounds: Introduction. In: RAMAWAT, K. G. e MÉRILLON, J.-M. (Eds.). **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p.1543-1580, 2013.

- LEE, G.W.; CHUNG, M.-S.; KANG, M.; CHUNG, B.Y.; LEE, S. Direct suppression of a rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) by monoterpene (S)-limonene. **Protoplasma**, v. 253, n. 3, p. 683-90, 2016.
- LENKA, S.K.; BOUTAOUI, N.; PAULOSE, B.; VANGPASEUTH, K.; NORMANY, J.; ROBERTES, S.; WALKER, E.L. Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidata* suspension culture cells. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1-10, 2012.
- LIPKO, A.; SWIEZEWSKA, E. Isoprenoid generating systems in plants—A handy toolbox how to assess contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthetic process. **Progress in Lipid Research**, v.63, p.70-92, 2016.
- LORETO, F.; SCHNITZLER, J.P. Abiotic stresses and induced BVOCs. **Trends in Plant Science**, v.15, p.154-166, 2010.
- LUO, X.; LUO, W.; LIN, C.; ZHANG, L.; LI, Y. Andrographolide inhibits proliferation of human lung cancer cells and the related mechanisms. **International Journal of clinical and Experimental Medicine**, v. 7, p. 4220-4225, 2014.
- MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Biotransformação de Limoneno: Uma Revisão das Principais Rotas Metabólicas. **Química Nova**, v. 30, p. 383-387, 2007.
- MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 152-160, 2007.
- MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review in Plant Biology**, v..63, p.431-450, 2012.
- MIURA, K.; TADA, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 12, 2014.
- MORANT, A.V.; JØRGENSEN, K.; JØRGENSEN, C.; PAQUETTE, S.M.; S'ANCHEZ-P'EREZ, R. et al. β -glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v.69, p.1795–1813, 2008.
- NAKAMURA, A.; SHIMADA, H.; MASUDA, T.; OHTA, H.; TAKAMIYA, K.-I. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 506, p. 61-64, 2001.
- NIINEMETS, U.; KÄNNASTE, A.; COPOLOVICI, L. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 262, p. 1-15, 2013.
- NORLANDER, G. Host finding in the pine weevil *HYLOBIUS ABIETIS*: effects of conifer volatiles and added limonene. **Entomologia Experimentalis and Applicata**, v. 59, n. 3, p. 229-237, 1991.

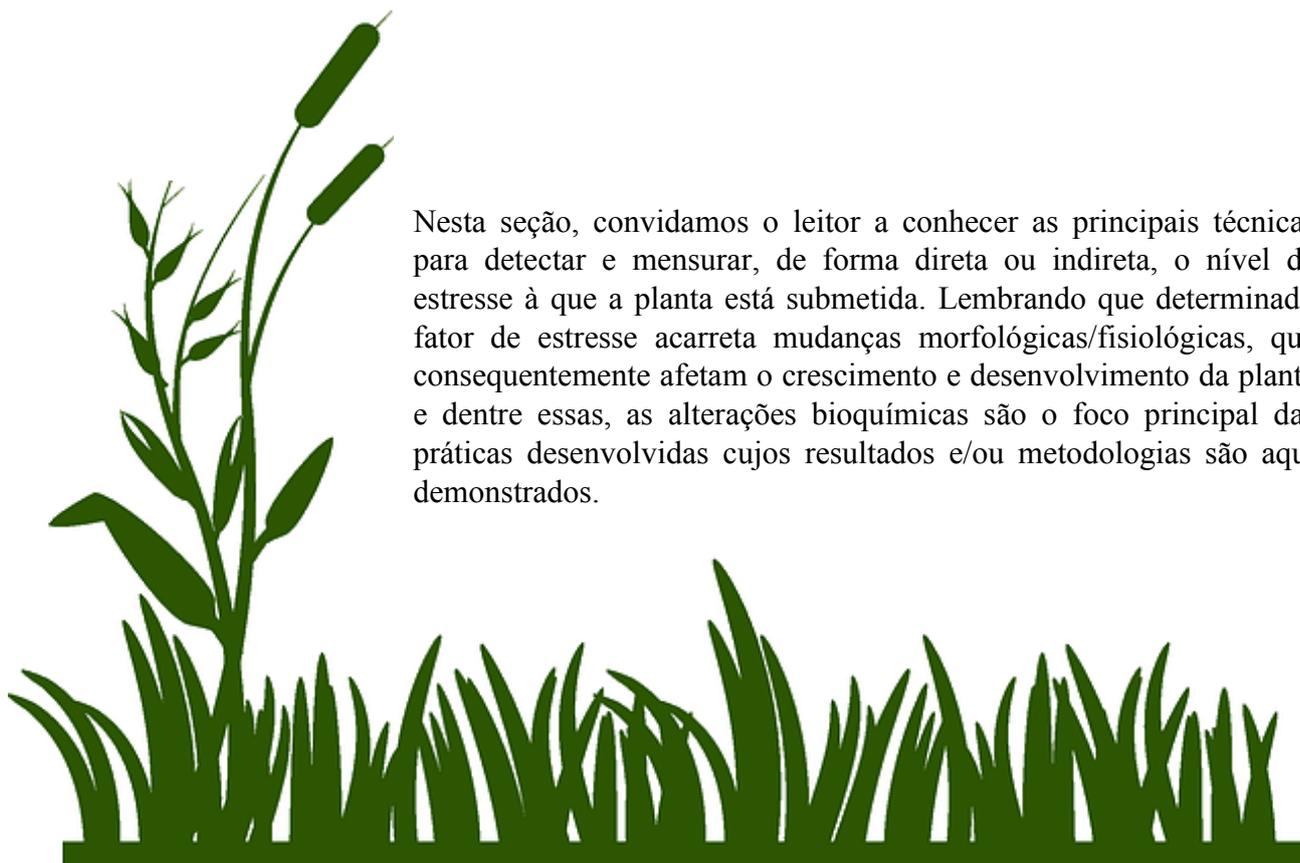
- OLIVOTO, T.; NARDINO, M.; CARVALHO, I.R.; FOLLMANN, D.N.; SZARESKI, V.J.; FERRARI, M. PELEGRIN, A.J.; SOUZA, V.Q. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: a review. **African Journal of Agricultural Research**, v.12, n.2, p. 71-84, 2017.
- PALMER-YOUNG, E.C.; VEIT, D.; GERSHENZON, J.; SCHUMAN, M.C. The Sesquiterpenes(E)- β -Farnesene and (E)- α -Bergamotene Quench Ozone but Fail to Protect the Wild Tobacco *Nicotiana attenuata* from Ozone, UVB, and Drought Stresses. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-22, 2015.
- PHILLIPS, M.A.; D'AURIA, J.C.; GERSHENZON, J.; PICHERSKY, E. The *Arabidopsis thaliana* type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. **Plant Cell**, v. 20, n. 3, p. 677-96, 2008.
- PICHERSKY, ERAN; LEWINSOHN, EFRAIM. Convergent evolution in plant specialized metabolism. **Annual Review in Plant Biology**, v.62, p.549-566. 2011.
- PICMANOVA, M. et al. A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by the comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species, **Biochemical Journal**, p.375-389, 2015.
- PINTO-ZEVALLOS, D.M.; MARTINS, C.B.C.; PELLEGRINO, A.C.; ZARBIN, P.H.G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p.1395-1405, 2013.
- PIOTROWSKI, M. The C-N-hydrolase group. Department Of Plant Physiology. RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM. 2015. Disponível em <<http://homepage.ruhr-uni-bochum.de/Markus.Piotrowski/Index.html>> acesso em 27 de outubro de 2016.
- PULIDO, P.; PERELLO, C.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. New insights into plant isoprenoid metabolism. **Molecular Plant**, v. 5, n. 5, p. 964-7, 2012.
- RAJNIAK, J.; BARCO, B.; CLAY, N.K.; SATTELY, E.S. A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. **Nature**, v.525, p.376–379, 2015.
- REDOVNIKOVIĆ, I.R.; GLIVETIĆ, T.; DELONGA, K.; VORKAPIĆ-FURAČ, J. Glucosinolates and their potential role in plant. **Periodicum Biologorum**, v.110, n. 4, p. 297-309, 2008.
- RENAULT, H.; BASSARD, J.-E.; HAMBERGER, B.; WERCK-REICHHART, D. Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 27-34, 2014.
- ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids - A Review. **Analyst**, v. 122, n. 2, p. 11R-34R, 1997.

- ROHDICH, F.; ZEPECK, F.; ADAM, P.; HECHT, S.; KAISER, J.; LAUPITZ, R.; GRAWERT, T.; AMSLINGER, S.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, n. 4, p. 1586-91, 2003.
- RUNGUPHAN, W.; QU, X.; O'CONNOR, S. E. From integrating carbon-halogen bond formation into medicinal plant metabolism. **Nature**, vol. 468, p. 461-464, 2010.
- SATTELLE, D.B. Acetylcholine receptors of insects. **Advances in Insect Physiology**, v.15, p.215–315, 1980.
- SCHNITZLER, J.P.; LOUIS, S.; BEHNKE, K.; LOIVAMAKI, M. Poplar volatiles - biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. **Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 302-16, 2010.
- SCHWAB, W.; WUST, M. Understanding the Constitutive and Induced Biosynthesis of Mono- and Sesquiterpenes in Grapes (*Vitis vinifera*): A Key to Unlocking the Biochemical Secrets of Unique Grape Aroma Profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 49, p. 10591-603, 2015.
- SHEN, Q.; LI, L.; JIANG, Y.; WANG, Q. Functional characterization of ent-copalyl diphosphate synthase from *Andrographis paniculata* with putative involvement in andrographolides biosynthesis. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 1, p. 131-7, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p.918, 2013.
- THEIS, N.; ADLER, L.S. Advertising to the enemy: enhanced floral fragrance increases beetle attraction and reduces plant reproduction. **Ecology**, v. 93, p. 430-443, 2012.
- THOLL, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 148, p. 63–106, 2015.
- THULASIRAM, H.V.; ERICKSON, H.K.; POULTER, C.D. Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis. **Science**, v. 316, p. 73-76, 2007.
- TRIVERDI, M.; SHAIKH, S.; GWINNUT, C. Tutorial de anestesia da semana farmacológica dos opioides (parte 1). Sociedade Brasileira de Anestesiologia, p.1-5, 2013.
- UNSICKER, S.B.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 4, p. 479-85, 2009.
- VICKERS, C.E.; GERSHENZON, J.; LERDAU, M.T.; LORETO, F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 283-91, 2009.

- VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. In: **Annual Review of Phytopathology**, v.47, p.177-206, 2009.
- VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; GEVRENOVA, R.; BORIE, N.; HARAKAT, D.; WENG, A.; THAKUR, M.; ZAHARIEVA, M.; HENRY, M. Acylated triterpenoid saponins from roots of *Gypsophila trichotoma*. **Planta Medica**, v. 78, n. 11, 2013.
- VRANOV'A, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 665-700, 2013.
- WEATHERS, P.J.; ELKHOLY, S.; WOBBE, K.K. Artemisinin: The biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 4, p. 309-317, 2006.
- WESTON, L.A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 283-297, 2013.
- WIDHALM, J.R.; DUDAREVA, N. A Familiar Ring to It: Biosynthesis of Plant Benzoic Acids. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 83-97, 2015.
- WINK, M.; WITTE, L. Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell suspension cultures. **Z Naturforsch**, v.40, p. 767-775, 1985.
- YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; SAITO, K. Functional genomics for plant natural product biosynthesis. **Natural Product Report**, v.26, n.11, p.1466–1487, 2009.
- ZHANG, M.; SU, P.; ZHOU, Y.-J.; WANG, X.-J.; ZHAO, Y.-J.; LIU, Y.-J.; TONG, Y.-R.; HU, T.-Y.; HUANG, L.-Q.; GAO, W. Identification of geranylgeranyl diphosphate synthase genes from *Tripterygium wilfordii*. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 12, p. 2179-88, 2015.
- ZIEGLER, JÖRG; FACCHINI, PETER J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. **Annual Review in Plant Biology**, v.59, p.735-769, 2008.
- ZULAK, K.G., LISCOME, D.K., ASHIHARA, H., FACCHINI, P.J. Alkaloids. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites: Occurrence Structure, and Role in the Human Diet*. Blackwell, Oxford, p.102–136, 2006.

SEÇÃO 2

PRINCIPAIS METODOLOGIAS PARA ESTUDO DE ESTRESSES EM PLANTAS



Nesta seção, convidamos o leitor a conhecer as principais técnicas para detectar e mensurar, de forma direta ou indireta, o nível de estresse à que a planta está submetida. Lembrando que determinado fator de estresse acarreta mudanças morfológicas/fisiológicas, que consequentemente afetam o crescimento e desenvolvimento da planta e dentre essas, as alterações bioquímicas são o foco principal das práticas desenvolvidas cujos resultados e/ou metodologias são aqui demonstrados.

CAPÍTULO 7

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS TOTAIS

ANTONIO HIGO MOREIRA DE SOUSA; DANY ROBERTA MARQUES CALDEIRA; LUZ MARÍA RUÍZ MACHUCA; RAFAEL DOS SANTOS LIMA; TATIANE BORTOLETTO GOMES DA SILVA; TÚLIO BARROSO QUEIROZ; MARIA VITÓRIA BARROS SIFUENTES; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

Atuando na maioria dos processos biológicos, as proteínas executam inerentes funções regulatórias, enzimáticas, nutritivas, de reserva, transportadoras, de armazenamento, estruturais, protetoras, de defesa, hormonais, além de uma variedade de outros papéis de suma importância, uma vez que toda atividade celular é dependente de uma ou mais proteínas (DARNELL *et al.*, 1990).

Nos vegetais e animais as proteínas apresentam um importante papel na formação e reparação de órgãos e tecidos. Nos vegetais, a produção de proteínas relaciona-se diretamente com estresses abióticos sofridos pela planta, como a seca, frio, salinidade, alcalinidade, nutrientes e tensões mecânicas (LIU; ZHANG, 2016). Como exemplo, a deficiência hídrica e salina, resulta em rompimento da integridade da membrana e desnaturação das proteínas (BRAY, 1997; HEIDE; POOLMAN, 2000; MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

Estes compostos desempenham também um importante papel na defesa química de doenças em plantas, atuando como parâmetro na identificação das adaptações de defesa utilizadas para a sobrevivência (PAL *et al.*, 2016). Para condições de temperaturas abaixo de zero, as proteínas anti-congelantes, também conhecidas como proteínas de ligação ao gelo, têm sido utilizadas para produzir plantas resistentes a geadas (DUMAN; WISNIEWSKI, 2014). Em condições de salinidade, o uso de rizobactérias em arroz estimulou a produção de proteínas relacionadas à patogênese (quitinase), aumentando sua capacidade de resistência (GARCIA-CRISTOBAL *et al.*, 2015).

Assim, sob estresse, observa-se alterações nas concentrações de determinadas proteínas. Entre as análises que são realizadas para a determinação dos efeitos do estresse nos vegetais está a determinação da atividade enzimática. No entanto, antes da determinação enzimática, realiza-se a determinação de proteínas solúveis totais. A determinação de proteínas solúveis totais é, de fato, muito importante para se obter a atividade biológica do objeto de estudo em unidades de atividade enzimática de $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína.

Existem várias metodologias espectrofotométricas para a determinação de proteínas totais, e a escolha delas depende do objetivo e de suas aplicações (ZAIA *et al.*, 1998).

Neste trabalho determinou-se a proteína solúvel de uma amostra vegetal utilizando o método de Bradford (1976), baseado em uma mudança espectral do reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250*, que dá absorção máxima a 595 nm (cor azul), quando interage com proteínas.

Esse método é baseado na interação entre o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (reativo de Bradford) e macromoléculas de proteínas constituídas por aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre o corante e essa macromolécula de proteína provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica absorvendo em 595 nm, no pH de reação (ZAIA *et al.*, 1998). O corante BG-250 apresenta dois picos de absorção: vermelho ($A_{\text{max.}} = 465 \text{ nm}$) e azul ($A_{\text{max.}} = 595 \text{ nm}$) com predominância da forma vermelha de absorção, no entanto, quando há reação do BG-250 com a proteína a amostra converte-se para a forma azul, absorvendo em 595 nm.

A reação completa-se em aproximadamente dois minutos e mantém-se estável por cerca de uma hora, entretanto, recomenda-se que as leituras sejam efetuadas após 15 minutos de incubação. Além disso, esse método não permite que compostos fenólicos interfiram na medida das proteínas.

O método de Bradford (**Figura 7.1**) não é recomendado no caso de amostras de proteínas com baixo peso molecular e também se deve atentar para o grau de pureza do corante *BG-250* que varia conforme a origem, sendo assim, recomenda-se que padronize as condições de reação para cada lote do corante adquirido (ZAIA *et al.*, 1998).

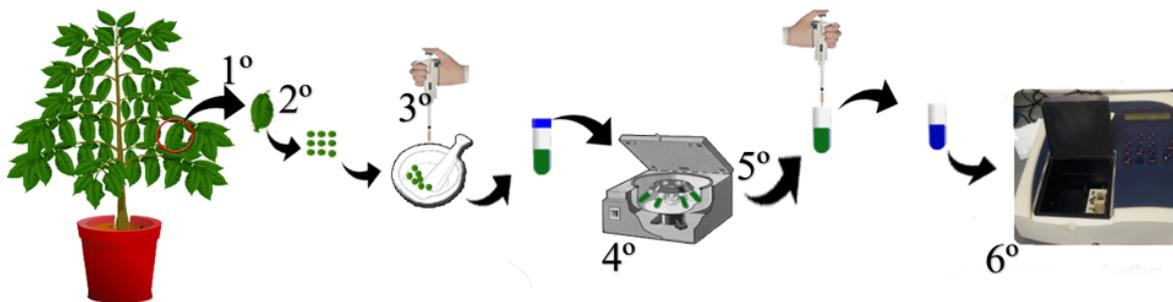


Figura 7.1. Resumo simplificado do método de Bradford. 1º Coleta de material; 2º Repetições da amostra; 3º Processamento do material; 4º Centrifugação da amostra; 5º Adição do reativo Bradford; 6º Leitura das absorvâncias. *Fonte:* Autores (2016).

2. Materiais Utilizados e Preparo das Soluções

2.1. Solução Coomassie Brilliant Blue G-250

- 100 mg de corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*
- 50 mL de etanol 95%
- 100 mL de ácido fosfórico 85%

2.2. Solução de Albumina de Soro Bovino - BSA (1 mg mL^{-1})

- 0,88 g de NaCl (PM = 58,45)
- 100 mL de H₂O
- 100 mg de proteína
- 100 mL de solução salina 0,15 M

2.3. Preparo da solução Coomassie Brilliant Blue G-250

- Dissolva 100 mg do corante em 50 mL de etanol 95%;
- Adicione 100 mL de ácido fosfórico (85%) e misturar bem em becker;
- Diluir com água destilada até 1L em balão volumétrico;

- Filtrar (papel de filtro analítico) duas vezes após completa dissolução e armazenar em frasco escuro em geladeira.

2.4. Preparo da solução de Albumina de Soro Bovino - BSA (1 mg mL^{-1})

- Dissolver 0,88 g de NaCl (PM = 58,45) em 100 mL de H₂O para obter solução salina 0,15 M;
- Dissolver 100 mg de proteína (BSA) em 100 mL de solução salina 0,15 M;
- Dividir em alíquotas de 1,0 mL e Armazenar em freezer.

3. Obtenção do Extrato

3.1 Materiais utilizados

- 500 mg de tecido vegetal
- Nitrogênio líquido.
- Tampão fosfato 0,1M, pH 6.7
- Reativo de Bradford
- *Coomassie Brilliant Blue G-250*
- Albumina de soro bovino - BSA
- Água destilada

3.2 Preparo do extrato

- Moeu-se 500 mg de tecido vegetal seguindo os métodos para coleta, preparação e extração em tecidos vegetais;
- Adicionou-se 2 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6.7 ao tecido vegetal moído (**Figura 7.2**);
- O material macerado foi centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm, sendo ao final separado o sobrenadante, que se constituiu no extrato bruto (**Figura 7.3**);
- Formaram-se duas fases: o sobrenadante e o precipitado.

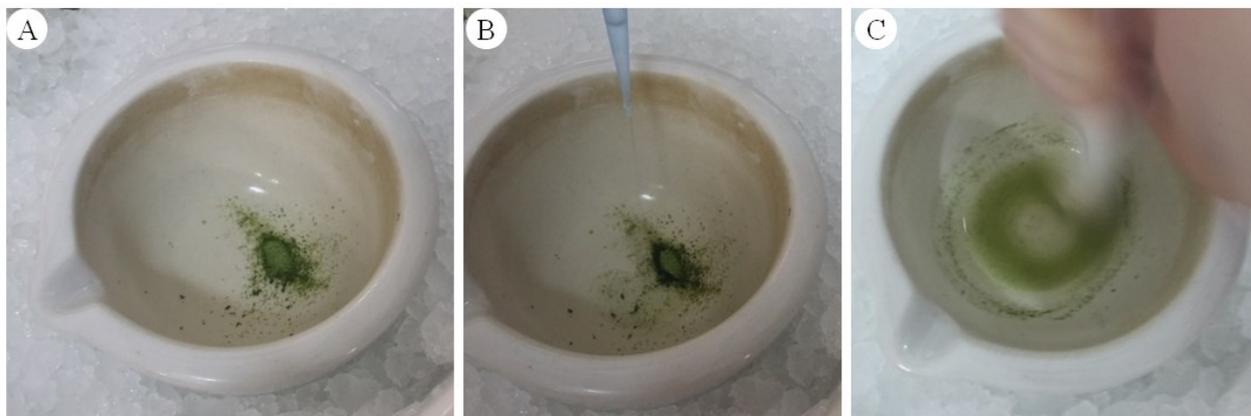


Figura 7.2. Obtenção do extrato. **A** - Tecido foliar macerado disposto em almofariz. **B** - Inserção de 2 ml de tampão fosfato. **C** - Homogeneização da mistura. *Fonte:* Autores (2016).

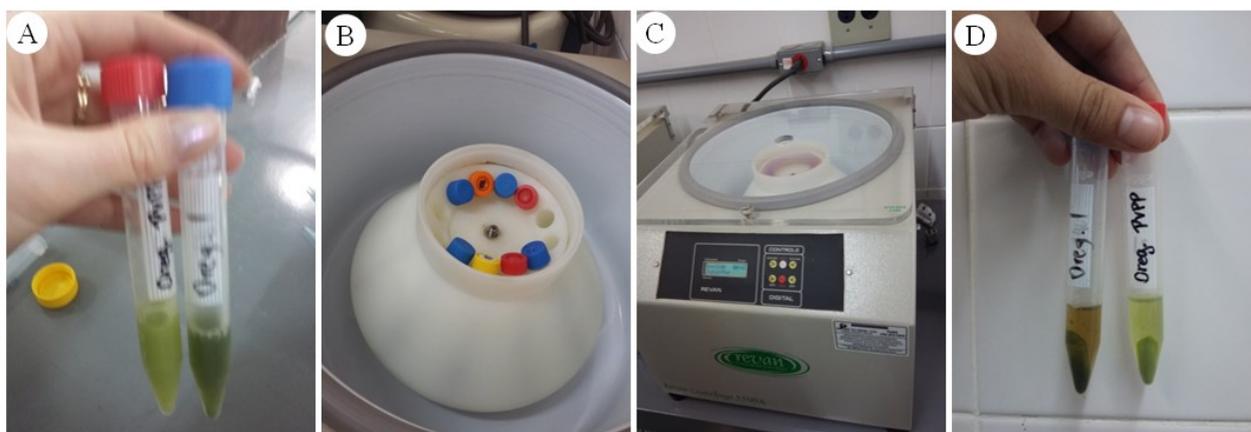


Figura 7.3. Detalhamento do processo de centrifugação do extrato obtido. **A** - Mistura homogeneizada em tubo de Falcon com tampa. **B e C** - Centrifugação do material. **D** - Material centrifugado. *Fonte:* Autores (2016).

Observação¹: durante todo o processo de extração, o material foi manipulado com nitrogênio líquido e em recipiente colocado sobre uma camada de gelo, para manter o material em baixa temperatura.

- Após a centrifugação, pipetou-se três alíquotas de 100 μ L (triplicata) do extrato (sobrenadante) + 5 mL do reativo de Bradford;
- Agitou-se a mistura para homogeneizar e deixou em repouso por 15 minutos;
- Feito isso efetuou-se a leitura no espectrofotômetro a 595 nm (**Figura 7.4**).

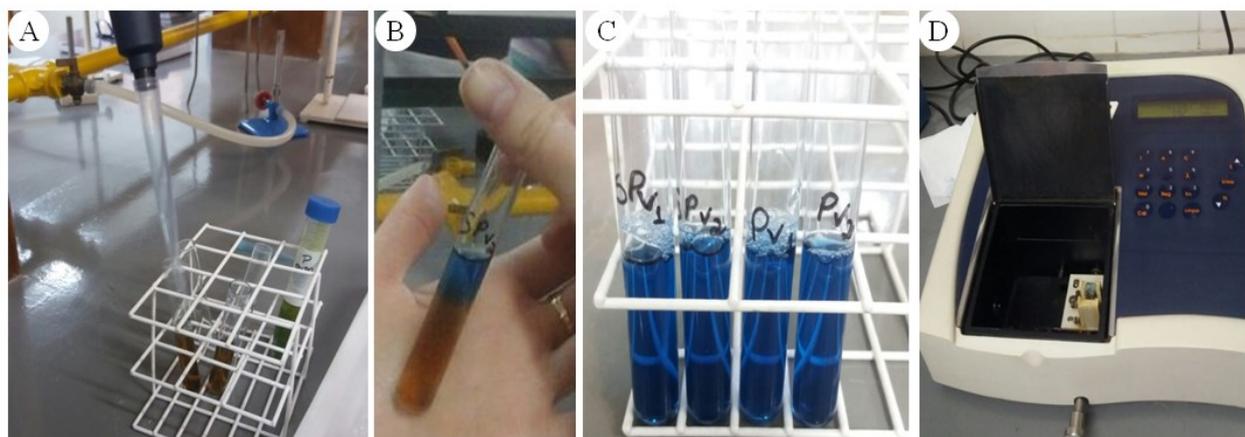


Figura 7.4. Procedimento final e incorporação do reativo de Bradford. **A** - 5 mL de Reativo de Bradford pipetado em três alíquotas de 100 μ L (triplicata) de extrato. **B** - Homogeneização da mistura. **C** - Amostras homogeneizadas. **D** - Leitura das absorbâncias em espectrofotômetro. *Fonte:* Autores (2016).

4. Obtenção da Curva Padrão

Para se obter a equação da reta e gerar a curva padrão típica, comparou-se as leituras obtidas em espectrofotômetro dos extratos coletados com a curva padrão. Dessa forma, de modo geral, foram preparadas onze amostras padrões com diferentes concentrações de BSA (Albumina de Soro Bovino), nos quais todos contem 5 mL de corante *Coomassie Brilliant Blue* e as seguintes variações dos demais componentes de ensaio:

Neste trabalho, foram utilizadas as concentrações de 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μ g de BSA (Tabela 12.1.). Todas as concentrações foram preparadas em duplicatas. Após 15 minutos de preparo, as amostras foram levadas para o espectrofotômetro para realizar as leituras a 595 nm.

Tabela 7.1. Materiais e reagentes utilizados.

Identificação		Componentes do ensaio		
Tubo N ^o	Concentração µg	BSA µL	H ₂ O µL	Bradford (mL)
1	0	0	100	5.0
2	10	10	90	5.0
3	20	20	80	5.0
4	30	30	70	5.0
5	40	40	60	5.0
6	50	50	50	5.0
7	60	60	40	5.0
8	70	70	30	5.0
9	80	80	20	5.0
10	90	90	10	5.0
11	100	100	0	5.0

É importante ressaltar que na preparação da solução, o primeiro componente a ser pipetado foi o corante *Coomassie Brilliant Blue*, seguido da água destilada e por último a BSA.

Observação^{2,3}: Determinar poucas amostras de cada vez para que as leituras não demorem; Utilizar preferencialmente cubetas de vidro ou plástico (metacrilato) e não de quartzo para evitar a adesão do complexo corante-proteína nas mesmas.

5. Análise dos Dados

Em um último momento, os dados foram tabulados em uma planilha padrão, no qual a fórmula $y = ax + b$ foi substituída pelos valores obtidos anteriormente durante a leitura das absorbâncias, no qual: y é valor da média de cada amostra; a e b são valores das duplicatas de cada padrão; e x é a quantidade encontrada de proteína por amostra em µg (**Figura 7.5**).

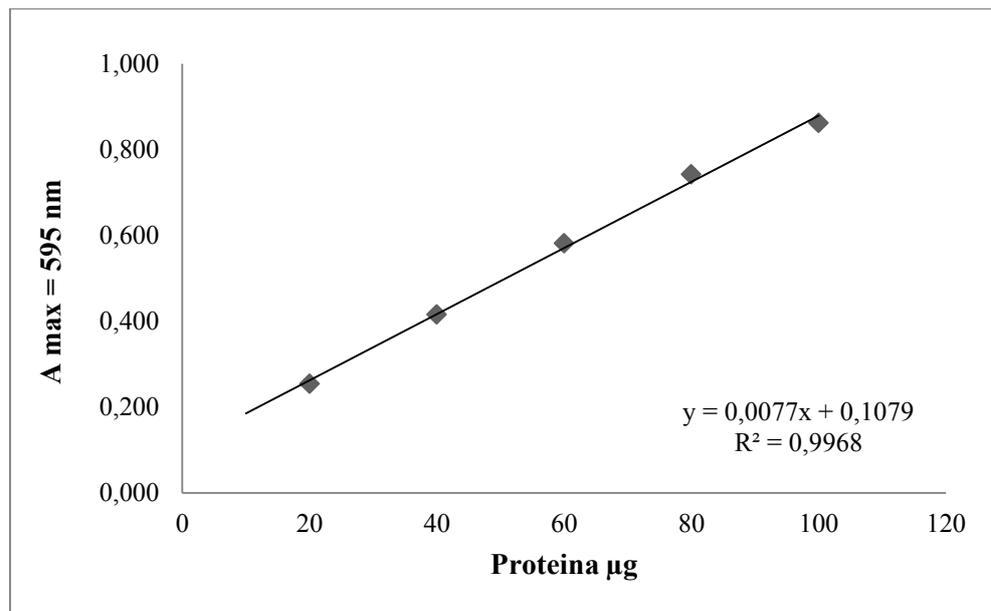


Figura 7.5. Curva padrão típica, obtida a partir de BSA.

6. Referências Bibliográficas

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in plant science**, v.2, n.2, p.48-54, 1997.
- DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D.. Molecular Cell Biology. Scientific American Books, New York. P. 738-743, 1990.
- DUMAN, J.G.; WISNIEWSKI, M.J. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 106, p. 60-69, 2014.
- GARCÍA-CRISTOBAL, J.; GARCÍA-VILLARACO, A.; RAMOS, B. GUITIERRES-MAÑERO, J.; LUCAS, J.A. Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress challenge. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, n. 1, p. 72-79, 2015.
- HEIDE, T.; POOLMAN, B. Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.97, n.13, p.7102-7106, 2000.

- LIU, Q.; ZHANG, S., LIU, B. 14-3-3 proteins: Macro-regulators with great potential for improving abiotic stress tolerance in plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 1, p. 9-13, 2016.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, n.2, p.139-158, 2005.
- PAL, T.; JAISWAL, V.; CHAUHAN, R. S. DRPPP: A machine learning based tool for prediction of disease resistance proteins in plants. **Computers in Biology and Medicine**, v. 78, p. 42-48, 2016.
- ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

CAPÍTULO 8

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE HÍDRICO

EDHIELLE VANESSA DE LIMA SOARES; JAQUELINE PINHEIRO DA SILVA; JÉSSICA KARINE BURIM CARDOSO; RENATA BRUNA DOS SANTOS COSCOLIN; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

Todos os processos fisiológicos da célula são afetados pelo fornecimento de água de forma direta ou indireta, sendo o conteúdo de água na planta variável em função das flutuações de umidade do solo, do ar e das taxas de transpiração da planta (MARENCO; LOPES, 2009). Ainda segundo os autores, a água tem diversas funções dentro da planta, sendo as mais importantes: constituinte de protoplasma; é utilizada como solvente de substâncias; faz parte de várias reações químicas como reagente e produto; mantém as estruturas moleculares; mantém a turgidez e é termorreguladora.

A água no contínuo solo-planta-atmosfera é transportada de acordo com gradiente de potencial hídrico, do maior para o menor, e quase toda a água que passa através das plantas é proveniente do solo, sendo absorvida pelas raízes. Assim, o sistema radicular constitui a principal entrada de água para as plantas superiores. (MARENCO; LOPES, 2009). Essa absorção ocorre principalmente pelas raízes mais finas, que se encontra em íntimo contato com um maior volume de solo por unidade de volume de raiz (KERBAUY, 2012) e a capacidade de absorção de água varia segundo a espécie e fatores como aeração do solo, temperatura e grau de suberização das raízes.

As plantas que apresentam déficit hídrico sofrem mudanças na anatomia, fisiologia e bioquímica, com diminuição de área foliar e crescimento de raiz, fechamento de estômatos, acúmulo de carboidrato em raízes, transporte de água na raiz via aquaporinas, entre outros mecanismos de defesa. Já para plantas que estão sob condições contrárias, com excesso de água, os mecanismos de defesa que podem ser citados são: fechamento dos estômatos, enrolamento de folha, remobilização de reservas, enraizamento rápido e profundo.

Portanto, estudos das relações hídricas nas plantas e das interações causadas pelo déficit hídrico ou pelo excesso de água em relação aos processos fisiológicos, são de grande importância. A partir do conhecimento relacionado a variação do volume de água em uma espécie, em diferentes fases de desenvolvimento, torna-se possível deduzir sobre o funcionamento dos processos fisiológicos e suas consequências.

2. Referencial Teórico

2.1. Conteúdo relativo de água

O CRA (conteúdo relativo de água) é um critério de avaliação do estado hídrico de uma planta, definido como a quantidade de água do tecido vegetal no momento, comparada com a quantidade máxima que ele pode reter (CAIRO, 1995). Sua utilização é apontada como eficiente no estudo da adaptação de plantas à seca, bem como na comparação de materiais em programas de melhoramento (JONES, 2007).

Barr (1962) *apud* Broetto (2016) realizou a determinação da metodologia para análise do conteúdo relativo de água, onde são cortados discos da folha com 1,5 cm de diâmetro e colocados em frascos herméticos, pré-pesados e guardados em refrigerador. Posteriormente, os frascos são pesados para obtenção da massa da amostra foliar, sendo a amostra imediatamente hidratada para que atinja a turgescência completa entre 3 e 4 horas, sob uma luz e temperatura ambiente. Depois de hidratadas, as amostras são bem secas com o auxílio de um papel toalha e pesadas, obtendo, assim, o seu peso totalmente turgido. Após a obtenção dos valores de peso turgido, as amostras são secas em estufa a 80 °C por 24 horas e pesadas, determinando assim sua matéria seca.

2.2. Pigmentos foliares

O déficit hídrico é normalmente caracterizado pela perda de clorofila, tendo como consequência o declínio na capacidade fotossintética das plantas. Portanto, realizar a análise de pigmentos fotossintéticos é uma ferramenta importante para avaliação da sanidade e integridade das partes internas da célula durante o processo de

fotosíntese (SILVA *et al.*, 2014) fornecendo uma técnica eficiente na detecção e quantificação de plantas tolerantes ao estresse hídrico.

De acordo com a metodologia proposta por Lee, Bremmeier e Smith (1987), para realizar a análise de pigmentos foliares, coleta-se discos de folhas, evitando o corte nas nervuras da mesma, assim como em áreas afetadas por insetos. Esses discos são colocados em tubos identificados com solução de Dimetilformamida (DMF) e DMF ácido, guardados em refrigerador para que a solução extraia os pigmentos por aproximadamente 30 horas. Assim, após esse período os discos não apresentarão cor e a solução terá absorvido os pigmentos. Essa solução é colocada no espectrofotômetro para medida do comprimento de onda emitido pela solução. Essa metodologia também fornece formulas padronizadas para cálculo da concentração da clorofila a e b, carotenoides, feofitina a e b e antocianinas.

A técnica de leitura SPAD (Soil Plant Analysis Development) também pode ser citada como uma técnica eficiente para determinação de pigmentos foliares. Esse método, segundo Silva *et al.* (2011), é um método rápido, simples e não destrutivo, que fornece leituras que se correlacionam com o teor de clorofila presente na folha.

2.3. Determinação de matéria fresca e matéria seca

O estresse hídrico gera uma série de consequência para as plantas, como a redução da área foliar e do crescimento do caule, assim como redução da produção de matéria seca de diversas plantas. Assim, a determinação da matéria fresca e matéria seca total são essenciais para determinação do estresse hídrico da planta, além de ser a metodologia mais utilizada em experimentos para esse fim.

Silva *et al.* (2002), ao analisar o efeito do estresse hídrico sob uma planta medicinal realizou a determinação da matéria fresca total através do corte das plantas a 3 cm do solo, separando caule, folhas e galhos e pesando-as imediatamente, para determinação da massa da matéria fresca. Para a matéria seca, 10% da massa de matéria fresca foi colocado em estufa a 70 °C e, quando obteve massa constante, foi pesado, sendo o valor total obtido através do cálculo proporcional.

2.4. Determinação de área foliar

A alteração da área foliar é uma das principais consequências do estresse hídrico nas plantas, uma vez que a área foliar determina seu uso de água e o potencial de produtividade, sendo severamente inibido quando exposta ao estresse (SILVA *et al.*, 2011). Esse índice também auxilia na verificação da superfície fotossintética da planta a fatores ambientais (MAGALI *et al.*, 2010).

Portanto, técnicas para avaliação da área foliar da planta é necessário para determinação da consequência causada pelo estresse. A área foliar pode ser determinada com métodos destrutivos ou não destrutivos. Sendo os métodos destrutivos mais simples e precisos e normalmente realizados por cópias da folha, uso de planímetros ou mesmo através de aparelhos que quantificam área foliar. E os métodos não destrutivos utilizam equipamentos potâteis que expressam imediatamente os resultados.

2.5. Determinação do potencial hídrico

Uma das formas mais comuns de se verificar o estado hídrico das plantas é pela determinação de seu potencial hídrico. Existem vários métodos para a determinação desse potencial: o método psicrométrico, que se utiliza da pressão de vapor; o método higrométrico, que é uma variação do psicrométrico com maior tempo para a sua determinação; o método densimétrico, que se fundamenta no equilíbrio da água entre tecido vegetal e o meio; o método gravimétrico, que se baseia nas mudanças de massa, volume ou comprimento dos tecidos e o método da câmara de pressão, que é o mais aplicado (TAIZ; ZEIGHER, 2004).

A câmara de pressão, também conhecida por *Bomba Scholander* consiste em um equipamento portátil, de baixo custo e que pode ser levado para realização de leituras no campo. Nesse método, uma amostra (folha) será colocada na câmara e receberá uma pressão exercida pelo ar comprimido do equipamento, até a exsudação da seiva pelo pecíolo. Dessa forma, a pressão exercida corresponde ao potencial hídrico das células foliares (SCHOLANDER *et al.*, 1965).

2.6. *Análise de proteínas solúveis totais, catalase, ascorbato peroxidase, polifenoloxidase e peroxidase.*

O estresse hídrico promove uma redução na concentração de proteínas totais solúveis, pois a restrição hídrica favorece a ação de enzimas proteolíticas que degradam as proteínas que são utilizadas como fonte de reserva pelas plantas (NEVES *et al.*, 2012).

Como consequência do estresse hídrico, também há um aumento da atividade da enzima peroxidase, pois a deficiência de água no solo promove um aumento dos radicais livres no meio celular e essa enzima aumenta sua atividade numa tentativa de manter a integridade celular (JADOSKI, 2002; LIMA, 2013). Já as enzimas ascorbato peroxidase, catalase e polifenoloxidase são antioxidantes e fazem parte da defesa primária contra radicais livres, podendo quebrar H_2O_2 em H_2O e O , suas observações são importantes para entender se a planta é capaz de reagir frente ao estresse, já que estresses abióticos podem interferir em suas atividades (CARNEIRO *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2004). Estudos realizados por Sousa *et al.* (2015) mostraram que o estresse hídrico reduziu a atividade da ascorbato peroxidase e da polifeniloxidase.

2.7. *Análise do aminoácido L-prolina*

A prolina é um aminoácido presente nos organismos vivos que atua como osmoprotetora, sendo esse um ajuste osmótico que a célula realiza para tolerar condições adversas e conservar a integridade celular (MUNNS, 2002). Dessa forma, a prolina atua mantendo a turgescência da célula e, além disso, consiste em uma fonte de energia acessível que pode ser usada no crescimento e desenvolvimento do tecido vegetal (KAVI KISHOR *et al.*, 2005). Estudos realizados por Queiroz (2006), Marin (2008) e Lima (2013) trabalhando com diferentes espécies, correlacionaram a deficiência hídrica com um aumento na quantidade de prolina das células vegetais.

2.8. *Teor de sacarose, amido e açúcares solúveis totais*

Dentre as reações químicas que o estresse hídrico provoca estão a diminuição da fotossíntese e aumento da transformação do amido pelas enzimas α e β amilase em sacarose. A quebra dessa molécula ocorre como tentativa de se conseguir um equilíbrio

osmótico nas células, já que o amido é uma substância osmoticamente inativa. Barbosa *et al.* (2013) verificaram essa diminuição de amido e aumento de sacarose em plantas jovens de Acapú (*Vouacapoua americana* Aubl.) com o passar do tempo sob deficiência hídrica. Resultados semelhantes foram encontrados por Sales *et al.* (2012) na cultura da cana-de-açúcar.

2.9. Défice de pressão de vapor

O déficit de pressão de vapor (DPV) é outra medida que pode ser calculada para o entendimento do estado hídrico das plantas. Ele pode ser calculado como a diferença entre a pressão de saturação de vapor d'água (e_s) e a pressão parcial de vapor (e_a) (PEREIRA; ANGELOCCI; SENTELHAS, 2002). Essa estimativa está diretamente relacionada com o fechamento dos estômatos, sob condições de estresse, a fim de reduzir a transpiração e por consequência acaba reduzindo também o CO_2 da transpiração (OLIVEIRA; FERNANDES; RODRIGUES, 2005).

Altos valores de DPV são relacionados com a elevação da temperatura foliar. Estudos comprovaram que o DPV é maior com o aumento das temperaturas ao longo do dia, assim como são maiores em estação de seca, quando comparados com as estações chuvosas (COSTA; MARENCO, 2007; MACHADO FILHO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2005).

2.10. Crescimento radicular

As raízes possuem uma grande importância para obtenção de água nas plantas, sendo assim, a planta aumenta o crescimento radicular para buscar água. Quando há menor disponibilidade hídrica, o crescimento radicular irá depender de uma mínima pressão de turgor mantida nas células, e essa pressão deve ser bastante para que ocorra o alongamento das paredes celulósicas e o crescimento celular. Assim, é verificado um rápido ajuste osmótico que auxiliam na manutenção do alongamento celular e na pressão de turgor (MAGALHÃES FILHO, 2008).

Uma técnica utilizada para avaliação do sistema radicular das plantas é o scanner de raiz, Root Scanner CI-600, onde são inseridos tubos de acrílico no solo em plantas aleatórias na parcela, para que a raiz cresça ao longo do tubo. De tempos em tempos, são capturadas imagens por esse equipamento que serão analisadas pelo *software*

Rootsnap CI-690, disponibilizando a variável comprimento total, área de contato, diâmetro médio e volume.

2.11. Caracterização estomática

Em condições xéricas, a folha tem necessidade de aproveitar o delimitado tempo com alta umidade relativa para fazer as trocas gasosas, resultando numa melhor eficiência quanto maior for a área estomática útil (MEDRI; LLERAS, 1980). De modo que a restrição hídrica pode causar a limitação estomática, e dificultar o processo de fotossíntese (KERBAUY, 2008). Segundo Grizi *et al.* (2008), em condições de deficiência hídrica, a planta realiza adaptações e aumenta o número de estômatos por área.

A contagem do número de células estomáticas pode realizada pelo método de moldes. Segundo Prado e Casali (2006) devem ser coletadas folhas menos pilosas para a melhor verificação do aparato estomática, e aplicada uma camada de esmalte incolor na face abaxial e adaxial da folha. Após 20 minutos, retira-se com uma pinça a película formada na folha e colocá-la em lâmina para observação das duas faces em microscópio. Identificando-se através da contagem o número de estômatos em pelo menos cinco campos diferentes para cada epiderme analisada.

Referente às relações hídricas e trocas gasosas, sabendo-se que a assimilação de CO₂ é realizada através dos estômatos no processo fotossintético ocorrendo também a liberação de água, por meio da transpiração, sendo o movimento estomático a principal forma de controlar as trocas gasosas nas plantas superiores (SILVA *et al.*, 2010). Esse movimento de abertura e fechamento dos estômatos está associado principalmente com a intensidade de luz e o estado de hidratação da folha (COSTA; MARRENCO, 2007). Com a redução na disponibilidade de água no solo ocorre uma queda no potencial da água nas folhas das plantas, acarretando à perda de turgescência e à redução da condutância estomática (SHALHEVET, 1983), à redução da transpiração, e conseqüentemente, a taxa de fotossíntese. Para análise da condutância estomática (gs) (mol de H₂O m⁻² s⁻¹) utiliza-se o Analisador de Gás Infravermelho (IRGA).

2.12. Trocas gasosas, Fotossíntese e Transpiração

A concentração de CO₂, a intensidade luminosa, a taxa de nitrogênio da folha, a temperatura, e a umidade do solo são fatores que podem afetar o desempenho fotossintético dos vegetais (MARENCO; LOPES, 2005). Com relação às trocas gasosas, a disponibilidade reduzida de água provoca à redução da condutância estomática e da transpiração, devido ao fechamento estomático, e conseqüentemente, à redução das taxas de fotossíntese (MARIANO *et al.*, 2009). Devido ao decréscimo na concentração intracelular de CO₂, ocasionado pelo fechamento dos estômatos (BJORKMAN, 1989).

Para análise de variáveis como transpiração (E), condutância estomática (gs), medida da assimilação fotossintética de CO₂ (A), temperatura foliar, CO₂ interno (Ci), Radiação fotossinteticamente ativa (PAR), utiliza-se um equipamento chamado de O analisador de gases infravermelho (IRGA).

O dióxido carbônico absorve na faixa de comprimentos de onda do infravermelho, em torno do comprimento de onda (λ) de 4,25 μm . O analisador de gases infravermelho (IRGA), basicamente é composto por um emissor de infravermelho, uma célula de medição, também chamada de caminho óptico, um filtro óptico e um detector. Entre a célula de medição e o detector tem-se um filtro, que é necessário para que se selecione a faixa de comprimento de onda específica que atinge o detector (MORENO, 2012).

Observação¹: Ver capítulo 13 “Utilização do Analisador de Gases por Infravermelho para avaliação de trocas gasosas em plantas: check list de preparação”

2.13. Medição da máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II

Distintos fatores podem causar modificações no arranjo fotossintético, podendo serem estudados os seus efeitos a partir da fluorescência da clorofila a. Em condições de restrição hídrica, em função do fechamento estomático, ocorre a redução da concentração de CO₂ no interior da célula, em decorrência aos decréscimos na assimilação do CO₂ e na eficiência quântica do fotossistema II (BAKER, 1993).

O principal método utilizado é realizado mediante a análise da fluorescência da clorofila, que permite verificar o nível de excitação da energia que é conduzida para a fotossíntese, oferecendo aporte necessário para a avaliação da inibição ou o dano durante o processo de transferência de elétrons do PSII. Considerado um método simples, eficiente, sensível e não destrutivo, que possibilita avaliar a eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII), em estudos com danos ou reparos causados no sistema fotossintético das plantas por distintos tipos de estresse (MARTINAZZO *et al.*, 2012).

Para essa avaliação da fluorescência da clorofila é utilizado um equipamento chamado fluorômetro portátil (LI-1600, USA). Que permite mensurar em folhas intermediárias dos ramos e pré-adaptadas ao escuro por 30 min, as variáveis fluorescência inicial (F_o), máxima (F_m), variável (F_v), eficiência quântica do FSII (F_v/F_m) e a razão (F_v/F_o). Verificando por meio da razão F_v/F_m^{-1} , em que F_v é a fluorescência variável e F_m , a fluorescência máxima, o nível dos danos causados ao conjunto fotossintético e sua eficiência fotoquímica do fotossistema II (CARMO ARAÚJO *et al.*, 2010). O decréscimo na relação F_v/F_m indica uma redução característica na eficiência quântica potencial do fotossistema II na planta, quando submetida às condições de ambientes stressantes (KRAUSE; WEIS, 1991).

3. Referências Bibliográficas

- BAKER, N.R. Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. In: SMITH, J.A.C.; GRIFFITHS, H. (Eds.). *Water deficits plant responses from cell to community*. Oxford: Bios Scientific Publisher, p. 221-235, 1993.
- BARBOSA, R.R.N.; FREITAS, J.M.N.; SILVA, D.A.S.; OLIVEIRA NETO, C.F.; LOBATO, A.K.S.; COSTA, R.C.L. Concentrações de amido e sacarose em folhas de plantas jovens de acapú (*Vouacapoua americana* aubl.) submetidas ao déficit hídrico. **Anais: 65 reunião anual SBPC.**, 2013.
- BARR, H.D.; WEATHERLEY, P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 15, p. 413-428, 1962.
- BJORKMAN, O. Some viewpoints on photosynthetic response and adaptation to environmental stress. In: BRIGGS, W.R. (ed.). *Photosynthesis*. New York: Alan Liss, p. 45-58, 1989.

- BROETTO, F. Método para extração e análise de pigmentos foliares. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.4, 2016.
- CAIRO, P.A.R. Curso básico de relações hídricas de plantas. Vitória da Conquista: UESB, p.32, 1995.
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.D.A; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.637-643, 2004.
- CARMO ARAÚJO, S.A.; VASQUEZ, H.M.; CAMPOSTRINI, E.; NETTO, A.T.; DEMINICIS, B.B.; SILVA LIMA, É. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.), em estresse hídrico. **Animal Sciences**, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2010.
- CARNEIRO, M.M.C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P.V.; TEIXEIRA, S.B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M.A.; MORAES, D.M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 752 - 761, 2011.
- COSTA, G.F.; MARENCO, R.A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta amazônica**, v. 37, n. 2, p. 229-234, 2007.
- GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café 'Catuaí' e 'Siriema' submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.6, p.1730-1736, 2008.
- JADOSKI, S. O. Alterações morfo-fisiológicas em plantas de pimentão sob deficiência hídrica. 2002. 126p. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem). Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2002.
- JONES, H.G. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p.119-130, 2007.
- KAVI KISHOR, P.B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R.N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K.R.; RAO, K.R.S.; SREENATH, R.A.O, REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.
- KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. 2ª edição, São Paulo: Guanabara Koogan, p.452, 2008.
- KERBAUY, G.B., Fisiologia Vegetal. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.431p, 2012.

- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto v.42, p.313-349, 1991.
- LEE, D.W.; BREMMEIER, S.; SMITH, A.P. The selective advantage of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. **Biotropica**, v. 19, p. 40-49, 1987.
- LIMA, G.S. Deficiência hídrica em plantas de pimentão (*Capsicum annum* L.) fertirrigadas e seus efeitos sobre a produção de massa e parâmetros bioquímicos. 86f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem). Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2013.
- MACHADO, E.C.; SCHIMIDT, P.T.; MEDINA, C.L.; RIBEIRO, R.V. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesq. agropec. bras.**, v.40, n.12, 2005.
- MACHADO FILHO, J.A.; CAMPOSTRINI, E.; YAMANISHI, O.K.; FAGUNDES, G.R. Variação sazonal das trocas gasosas em folhas de mamoeiro cultivado em condições de campo. **Bragantia**, Campinas, v.65 n.2, 2006.
- MAGALHÃES FILHO, J.R.; AMARAL, L.R.; MACHADO, D.F.S.P.; MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira ‘valência’ sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, v. 67, n.1, p. 75-82, 2008.
- MALAGI, G.; CITADINI, I.; SCARIOT, S.; REIS, L. Método não destrutivo para determinação da área foliar da videira, cultivar BRS-Violeta. Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.4, p. 1250-1254, 2010.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa: Editora UFV, p. 451, 2005.
- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. Filosofia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral/ Ricardo A. Marengo, Nei F. Lopes. 3 ed., atual. ampl. –Viçosa, MG, Ed. UFV, 2009.
- MARIANO, K.R. et al. Fotossíntese e tolerância protoplasmática foliar em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. submetida ao déficit hídrico. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 72-77, 2009.
- MARIN, A. Efeito sinérgico do estresse hídrico e da toxidez de alumínio no acúmulo de prolina em *Cajanus cajan* (L.) millsp. cultivado em hidroponia. f. 125. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. Jaboticabal, 2008.
- MARTINAZZO, E.G.; SILVA, D.M.; BIANCHI, V.J.; BACARIN, M.A. Fluorescência da clorofila a em plantas de pessegueiro da cultivar maciel enxertada sobre diferentes porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, p.678-685, 2012.

- MEDRI, M.E.; LLERAS, E. Aspectos da anatomia ecológica de folhas de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Acta Amazonica**, v.10, p.463-493, 1980.
- MORENO, L. X. Desenvolvimento de sistema para análise de fluxo de CO₂ do solo pelo método de absorção de radiação infravermelha.. 82 f. Dissertação (Área de Concentração em Física Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 2012.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 25, n. 2, p. 239 – 250, 2002.
- NEVES, M. G.; SILVA, J.N.; SILVA, J.L.S.; SOUZA, L.C.; SIQUEIRA, J.A.M.; OLIVEIRA, L.M. et al. Teores de Prolina, Aminoácidos e Proteínas Solúveis Totais em Resposta a Deficiência Hídrica e Concentrações de Silício em Plantas de Milho. **Anais: Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2012.
- OLIVEIRA, A.D.; FERNANDES, E.J.; RODRIGUES, T.J.D. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em Feijão. **Engenharia Agrícola**, v.25, p.86-95, 2005.
- PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia: fundamentos e aplicações práticas. Guaíba: ed. Agropecuária, p. 247-267, 2002.
- PRADO, H.B.A.; CASALI, C.A. Fisiologia vegetal: Práticas em relações hídricas, fotossíntese e nutrição mineral. Barueri: Manole, p. 448, 2006.
- QUEIROSZ, R.J.B. Quantificação da trealose e da prolina livre em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica do solo. 70f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP. Jaboticabal, 2006.
- SALES, C.R.G.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, D.F.S.P.; MACHADO, R.S.; DOVIS, V.L.; LAGÔA, A.M.M.A. Trocas gasosas e balanço de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares. **Bragantia**, v. 71, n. 3, p.319-327, 2012.
- SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMMINGSEN, E.A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, n. 3668, p. 339-346, 1965.
- SHALHEVET, J. Plants under salt and water stress. In: FOWDEN, L.; MANSFIELD, T.; STODDART, J. Plant adaptation to environmental stress. London: Chapman & Hall, cap 7, p.133-54, 1983.
- SILVA, S.R.S.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; CASALI, V.W.D.; NASCIMENTO, E.A.; PINHEIRO, A.L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, v.24, n.5, p. 1363-1368, 2002.

- SILVA, C.D.S.; SANTOS, P.A.A.; LIRA, J.M.S.; SANTANA, M.C.; SILVA JUNIOR, C.D. Curso diário das trocas gasosas em plantas de feijão-caupi submetidas à deficiência hídrica. **Revista Caatinga**, v.23, p.7-13, 2010. .
- SILVA, E.M.B.; SILVA, T.J.A.; CABRAL, C.E.A.; KROTH, B.E.; REZENDE, D. Desenvolvimento inicial de gramíneas submetidas ao estresse hídrico. **Revista Caatinga**, v. 24, n.2, p 180 – 186, 2011.
- SILVA, M.A.; SANTOS, C.M.; VITORINO, H.S.; RHEIN, A.F.L. Pigmentos fotossintéticos e índices SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v.30, n.1, p 163 – 181, 2014.
- SOUSA, C.C.M.; PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; OLIVEIRA FILHO, R.A.; SOUZA, M.A.L.M.; PEREIRA FILHO, J.V. Crescimento e respostas enzimáticas do feijoeiro caupi sob estresse hídrico e nematoide de galhas. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v.19, n.2, p.113–118, 2015.
- TAIZ, L.; ZEIGHER, E. Fisiologia Vegetal. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED Editora S.A, 2004.

CAPÍTULO 9

COLETA DE MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO

RICARDO DE LIMA VASCONCELOS; ROBERTA DANIELA DA SILVA SANTOS; MARCELA CAETANO LOPES; JOSIANE TURATO DA SILVA PEREIRA; JÉSSICA MAIARA DE SOUZA FERRARI; DÁVILLA ALESSANDRA DA SILVA ALVES; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

As enzimas são substâncias biológicas que aceleram as reações nos organismos vivos, e são utilizadas desde tempos imemoriais, na fabricação de pães, bebidas e outros alimentos no decorrer da História. De acordo com Monteiro e Silva (2009) o uso de técnicas, como isolamento, purificação e cristalização proporcionou uma evolução no conhecimento dessas substâncias, ao ponto que a União Internacional de Bioquímica, em 1956, por meio da Comissão Internacional de Enzimas optou por dividi-las em seis classes de catálise:

- 1) Oxirredutases: reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons;
- 2) Transferases: translocam amina, fosfato, acil, carboxil, entre moléculas;
- 3) Hidrolases: reações de hidrólise de ligação covalente;
- 4) Liases: adição ou remoção de grupos a duplas ligações;
- 5) Isomerases: interconversão entre isômeros óticos ou geométricos;
- 6) Ligases: condensação de duas moléculas, dependente de energia, geralmente ATP.

As Oxirredutases (Desidrogenases, Mono e Dioxigenases e Peroxidases) promovem oxidação e redução de álcoois, epoxidação, hidroxilação de Alcenos e Alcanos; Transferases (Quinases) responsáveis pela fosforilação depende de ATP; Hidrolases (Esterases, Lipases, Amidases, Fosfatases e Epóxido Hidrolases) favorecem a hidrólise e formação de ésteres, amidas, fosfato e hidrólise de Epóxidos; Liases (Carboxilases, Amônia-liases, Hidroliases) permitem a adição e eliminação de ligações

duplas; Isomerasas (Racemases, Epimerases) possibilitam a isomerização (racemização, epimerização e rearranjos) e Ligases (Aldolases, Transaldolases, Glicosidades e Transaminases) viabilizam reações aldólicas, formação de ligação glicosídica, formação de ésteres sulfato e ligação C-N (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

Em relação aos catalisadores químicos, estes apresentam as seguintes vantagens: são produtos naturais biológicos e biodegradáveis, alta especificidade, não são consumidos nas reações, aumentam a velocidade do processo ao promover redução na energia de ativação, são estereoseletivas e atuam em pH e temperaturas brandas (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Contudo, em especial, o estudo das enzimas de origem vegetal é uma das vertentes mais promissoras, com amplo potencial de crescimento, pois na prática todas as reações complexas e de influência para o desenvolvimento vegetal são dependentes de reações e combinações adequadas, seja na sua estrutura proteica ou no sítio ativador, em especial, o pH e a temperatura são os elementos condicionantes para a máxima resposta da relação substrato-enzima. As **Figuras 9.1 e 9.2**, representam o processo de catálise sob ótimas condições físico-químicas e estruturais.

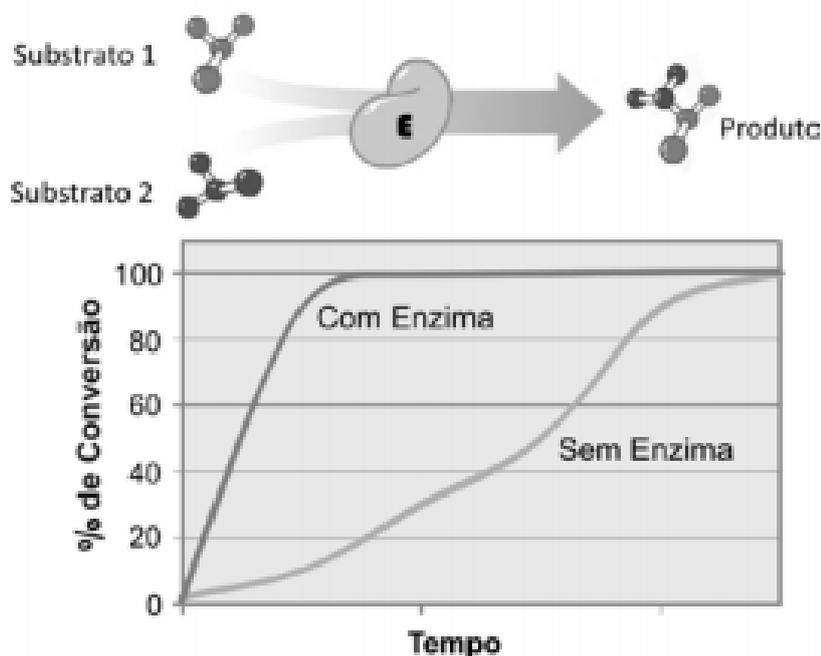


Figura 9.1. Representação e curva de conversão de substrato em produto catalisado na presença e ausência de enzima. E=enzima. *Fonte:* Monteiro e Silva (2009).

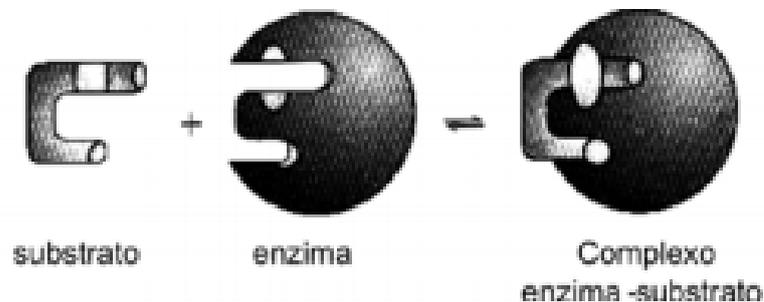


Figura 9.2. Modelo estrutural representativo da relação substrato-enzima (chave-fechadura-Emil Fischer). *Fonte:* Monteiro e Silva (2009).

Sob temperatura acima da ideal a enzima será desnaturada, ou seja, expressará uma nova conformação estrutural, o que impedirá sua atividade de forma eficiente. Todo o processo catalítico é dependente de condições ideais de pH, para que a enzima atue de forma máxima, obtendo-se o maior conteúdo possível do produto final, deste modo verifica-se que as enzimas tendem a apresentar sua máxima atividade em condições de neutralidade, porém isso dentro de uma faixa de especificidade de pH.

Quanto mais divergente essa faixa de pH, menores serão a ação da enzima e o valor obtido do produto final, por isso, é fundamental avaliar as melhores condições de atividade enzimática em relação ao pH.

Em relação ao efeito do pH na atividade enzimática, será equivalente a quantidade de compostos que apresentam condições de dissociação e poderá ser interpretada por meio da natureza das substâncias que compõem os grupos radicais de aminoácidos.

Para reduzir os riscos de problemas de atividade enzimática, ou mesmo manutenção de seu máximo desempenho, o uso de soluções tampões se mostra como alternativa confiável e válida em avaliações de tecidos de natureza vegetal, animal ou de microrganismos. As soluções tampão, são substâncias químicas que atuam dentro de um determinado pH que propiciam ambiente adequado para que ocorra as reações substrato-enzima de modo que resulte no maior volume/contéudo de produto final, ou seja, maior eficiência da enzima.

Durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, seja sob condições apropriadas ou estressantes, existe um grande fluxo de produção e consumo de enzimas, portanto essas substâncias refletem condições muito intrínsecas as quais o vegetal está exposto, a correta avaliação do complexo enzimático proporciona de forma segura as reais exigências das plantas, portanto o estudo de enzimas se tornou uma ferramenta que auxilia no manejo dos cultivos.

2. Preparo de Tampões

São soluções utilizadas para manutenção da faixa de pH ótimo para determinado processo laboratorial, sua composição é constituída por uma associação de ácido fraco (ácido conjugado) e o seu respectivo sal (base conjugada) ou de uma base fraca (base conjugada) e um ácido conjugado.

É válido destacar, que a escolha da solução tampão deve ser coerente com a avaliação a ser realizada, pois o tampão que possui poder tamponante diferente do exigido pelo protocolo inviabiliza toda técnica, um exemplo é o uso de tampão de natureza ácida, para avaliações que requerem tampões de caráter básico.

Para obtenção do tamponante de pH baixo utiliza-se fortes ácidos, como o ácido clorídrico, e para pH alto o uso de bases fortes como hidróxido de potássio ou potassa cáustica.

Para $\text{pH} < 3$ ou $\text{pH} > 11$, as soluções devem apresentar concentrações moderadas de ácidos ou bases fortes, e misturas de ácidos fracos ou bases fracas, com seus respectivos complementos para $3 < \text{pH} < 11$ (CAMÕES, 2007).

Quando se produz uma solução tamponante ela necessariamente não resultará no pH esperado, porque essa grandeza é dependente exclusivamente da interação que ocorre entre os compostos (ácido-base), e não apenas de suas concentrações, assim para que se atinja o valor de pH pretendido, adiciona-se uma solução de ácido ou base diluídos.

Uma solução tampão de determinado poder tamponante, pode ser obtida com o uso de diferentes substâncias (quantidades ou concentrações dissolvidas), tendo em vista, a necessidade de simplificação, o emprego do peso molecular do composto,

proporciona uma expressão mais correta da natureza dos elementos constituintes da solução tampão.

A seguir, alguns ácidos e bases mais utilizados para produção de soluções tampão, com suas respectivas fórmulas e pesos moleculares: Ácido Clorídrico = HCl (36,46 g mol⁻¹); Ácido Nítrico = HNO₃ (63,01 g mol⁻¹); Ácido Perclórico = HClO₄ (100,46 g mol⁻¹); Ácido Fosfórico = H₃PO₄ (98 g mol⁻¹); Hidróxido de Sódio = NaOH (39,99 g mol⁻¹); Hidróxido de Potássio = KOH (56,10 g mol⁻¹); Hidróxido de Cálcio = Ca(OH)₂ (74,09 g mol⁻¹); Hidróxido de Magnésio = Mg (OH)₂ (58,31 g mol⁻¹).

3. Métodos para Coleta de Amostras Vegetais (Folhas e outros Órgãos)

As folhas, em geral são a expressão máxima do metabolismo vegetal, onde ocorre boa parte de todas as grandes reações responsáveis pelo crescimento e produtividade da planta.

Portanto sua adequada coleta e avaliação são capazes de expressar sua condição nutricional, fisiológica e bioquímica. Geralmente, o estudo do comportamento bioquímico nas plantas coincide com os períodos de avaliação nutricional ou próximos, para tal, segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), deve-se atentar ao tipo de folha, época de coleta e número adequado, podendo citar alguns exemplos: soja, a primeira folha amadurecida a partir da ponta do ramo, pecíolo excluído, 30 folhas por ha; milho deve-se coletar a folha oposta e abaixo da espiga, no surgimento do “cabelo”, 30 folhas por ha; citros coletam-se folhas do ciclo da primavera, de ramos frutíferos, 3^a ou 4^a folha a partir do fruto na época do verão, 20 folhas por ha; eucalipto, folha recém-maduras, primários, no verão-outono, 18 folhas por ha.

E o mesmo autor comenta que a coleta (amostra composta) deve ser realizada em condições de solo, topografia, tempo de cultivo uniformes, e evitando-se coleta após chuva intensa, adubação foliar e trinta dias antes da última adubação no solo, folhas com danos mecânicos ou por pragas, com tecidos mortos, contaminadas com defensivos e com solo (mesmo após lavagem simples).

Depois de serem tomados esses cuidados, as folhas corretamente higienizadas (apenas água destilada ou bidestilada em abundância) devem ser acondicionadas em recipientes: envelopes de papel alumínio, tubos *Falcon* (25 ou 50 mL) ou os microtubos *eppendorfs* devidamente identificados e com informações do tipo do material vegetal, data de coleta, etc. Além disso, é importante utilizar recipientes que sejam compatíveis com o volume e/ou número de amostras, para evitar subaproveitamento das análises ou dos locais de armazenamento e é altamente recomendável o uso de tintas não solúveis em água, pois reduz problemas de identificação das amostras.

O congelamento da amostra após a coleta deve ser rápido para reduzir ou paralisar os processos deletérios que afetam qualquer avaliação da sua integridade, o uso de nitrogênio líquido (-196 °C) é capaz de minimizar danos qualitativos. Para reduzir a possibilidade de acidentes durante o congelamento das amostras, ressalta-se retirar o excesso de nitrogênio nos tubos *Falcon* antes do fechamento do recipiente e para os tubos *eppendorf* deve-se fazer um pequeno orifício na tampa, para que não haja explosão devido à pressão do nitrogênio, e neste tipo de recipiente as amostras podem ser na forma de discos foliares, utilizando-se um cortador de diâmetro definido. O armazenamento dos recipientes contendo as amostras deverá ser em equipamento de refrigeração (-80 °C), para que se reduza ao máximo os danos na integridade molecular do tecido.

O transporte de nitrogênio líquido requer muito cuidado, pois se acondicionado em recipiente incorreto, há possibilidade de vazamento, e se houver pessoas no ambiente e este for fechado, poderá ocorrer asfixia química, assim, o ideal é o uso do botijão criogênico para evitar acidentes. Para o manuseio do nitrogênio líquido, é necessário luvas e óculos de proteção, pinças para manipulação das amostras e sob nenhuma circunstância descartar o nitrogênio líquido na tubulação, pois tal ato provocará danos irreversíveis no sistema.

4. Procedimentos e Extração de Enzimas em Tecidos Vegetais

4.1. Preparo da amostra para extração

É de suma importância frisar que todo processo de extração é um elo dentro de uma cadeia, e refletirá as tomadas de decisão, até mesmo daquelas feitas antes da implantação da pesquisa. Sendo importante que, antes do início da extração, todas as soluções tampão e reagentes estejam previamente preparados e próximos para que não ocorram problemas durante o procedimento laboratorial.

Geralmente a solução tampão requer refrigeração, podendo ser armazenada em geladeira. Para tanto, o frasco deve constar: nome do tampão, molaridade, pH e data de preparo; o ideal é que a solução tampão seja feita no máximo um dia antes da extração, pois deste modo, tem-se um controle na qualidade.

A manipulação do material exige utensílios adequados e limpos (usar água destilada ou bidestilada, devendo ser secos com papel toalha) para seu acondicionamento e extração (maceração), sendo muito utilizado o *graal*, o pistilo e pinças, o uso de luvas é sempre importante, devido a possibilidade de contaminação do material, em especial para a obtenção de extratos enzimáticos. Assim, todos os instrumentos que serão utilizados no decorrer da extração enzimática deverão ser mantidos sob refrigeração (4 °C), podendo-se usar gelo, sendo este arrefecimento aplicado também no momento da extração.

No processo de maceração, a amostra deve permanecer em nitrogênio líquido no *graal*, que com auxílio do pistilo ocorrerá à desintegração do material, até a obtenção de um pó fino, lembrando que a maceração deve ser encerrada quando não for mais perceptível nenhum elemento original, como nervuras. A seguir, esse macerado, será disposto em freezer (-80 °C), conservando suas características bioquímicas para futuras análises, devendo ser identificados de forma legível. Contudo, para avaliações isotópicas, é necessária uma maior pulverização da amostra, para esse fim, o uso de moinho criogênico proporciona vários níveis de moagem e de tempos de pré-resfriamento e resfriamento.

4.2. Obtenção do extrato bruto

A quantidade de material vegetal requerida para maceração depende da espécie e da análise a ser feita. Comumente são utilizadas 300 mg, pesadas em balança analítica, sendo a amostra triturada e congelada, deve estar imersa em solução tampão (com molaridade e pH intrínsecos) ao longo da maceração. Para que se obtenha a máxima expressão da atividade enzimática, o uso da solução tampão correta para determinada enzima, é essencial, pois sua finalidade é promover uma estabilização do pH da amostra.

O uso da solução tampão se dá em duas fases: a primeira aplica-se a metade do volume exigido no processo de extração, a seguir o extrato deve ser transferido para um tubo *Falcon* (corretamente pesado), a outra metade da solução tampão deve ser destinada a retirar os resíduos do *graal*, possibilitando uma análise de praticamente todo material.

Quando a natureza do material vegetal a ser macerado é fibrosa (raízes e cascas), pode-se empregar uma pequena porção (ponta de uma espátula) de material granular inerte (areia lavada) para auxiliar na trituração, salienta-se que toda a técnica deve ocorrer sempre na presença da solução tampão.

Em posse do extrato obtido, o mesmo será pipetado (atenção quanto ao seu volume) para tubos *Falcon*, adicionando-se a solução de extração e/ou outras substâncias necessárias, em seguida, devem ser levadas a centrífuga devidamente programada. Neste aparelho, as amostras devem ser obrigatoriamente distribuídas de forma equilibrada, para que todas possam estar sujeitas as mesmas condições, não reduzindo a qualidade ou a condensação do pellet, este procedimento também evita que possa ocorrer danos no equipamento.

4.3. Uso de antioxidantes

Existem diversas substâncias que possuem função antioxidante (carvão ativado, ácido ascórbico, PVP e PVPP, entre outros), as quais são capazes de reduzir ou controlar a produção de elementos (compostos fenólicos) que podem interferir na leitura dos resultados, pois em contato com determinadas substâncias antioxidantes formam precipitados, que afetam negativamente os resultados, especialmente por métodos

ópticos. Portanto, para que se tenham resultados sem a influência ou com reduzido percentual de compostos fenólicos, o uso de substâncias antioxidantes é indispensável.

4.4. Centrifugação

É uma das fases em que os resultados alcançados representarão o adequado preparo físico e bioquímico do material, pois nessa etapa, sob a ação da gravidade as diferenças de densidade dos componentes se acentuarão, propiciando uma sedimentação dos componentes com maior peso (partículas sólidas, *pellets*).

Como já mencionado, as amostras devem ser ordenadas de forma equilibrada nos orifícios do rotor da centrífuga. A velocidade será expressa em g (gravidade) ou em RPM. Portanto deve-se observar o protocolo de extração enzimática utilizado para que possam ser feitas as adaptações necessárias. A centrífuga realiza todo o processo sob temperatura constante e programável.

As extrações normalmente são feitas a 4°C, sob 10 e 12.10³ vezes a gravidade, mas pode ser aplicada as ultracentrifugações que apresentam velocidade superiores a 50.10³ e chegando a 500.10³ vezes a gravidade, sendo utilizadas em técnicas que exigem a determinação do peso molecular dos componentes e o tamanho das partículas proteicas.

É possível que a fase de separação seja muito lenta, sendo influenciada pelo tamanho, o peso molecular ou o tipo de ligação entre as substâncias (coloides). O próximo passo é extrair com pipeta automática a fase líquida (sobrenadante) do tubo, acondicionando em *eppendorf* e armazenando em ultrafreezer para leituras no espectrofotômetro.

5. Preparo de Soluções

Segue abaixo alguns exemplos de preparo de solução tampão mais empregados em técnicas de extração enzimática:

I. Preparo do Tampão Fosfato Monossódico/Dissódico - 50 mM, pH 7,3 (1 L)

- **Solução A**

Fosfato Monossódico (NaH_2PO_4 , $\text{PM} = 119,98 \text{ g L}^{-1}$)

$$1\text{M} \rightarrow 119,98 \text{ g L}^{-1}$$

$$50 \cdot 10^{-3} \text{ M} \rightarrow X$$

$$X = 5,999 \text{ g L}^{-1}$$

- **Solução B**

Fosfato Dissódico (Na_2HPO_4 , $\text{PM} = 141,96 \text{ g L}^{-1}$)

$$1\text{M} \rightarrow 141,96 \text{ g L}^{-1}$$

$$50 \cdot 10^{-3} \text{ M} \rightarrow X$$

$$X = 7,098 \text{ g L}^{-1}$$

Dissolva os reagentes em 500 mL de água destilada, faça aferição do pH (observe, se o equipamento está calibrado), após constatar o pH esperado, complete até perfazer 1 litro (água destilada).

II. Solução tampão de KOH (PM = 56,10) a 0,05 M (500 mL)

Obtenha os números de moles:

- Litros x M $0,5 \times 0,05 = 0,025$ moles de KOH.

- Número de moles x PM $0,025 \times 56,10 = 1,4025 \text{ g}$

$$56,10 \text{ (PM)} \rightarrow 1 \text{ M}$$

$$X \rightarrow 0,05 \text{ M}$$

$$X = 2,805 \text{ g L}^{-1} \text{ ou } 1,4025 \text{ g em } 0,5 \text{ L.}$$

III. Concentração da solução de KOH (0,05 M, 0,5 mL) em porcentagem peso – volume (% p/v):

- Deve-se padronizar essa relação, portanto, % p/v = peso em gramas de um soluto por 100 mL de solução: $2,805 \text{ g L}^{-1} = 0,2805 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1} = 0,28\% \text{ (p/v)}$.

IV. Solução extratora para Glutamina Sintetase (GS) Tris – HCl – 200 mM, com pH 7,5 (1 L)

$$\text{Tris – HCl (PM)} = 157,56$$

$$1 \text{ M} \rightarrow 157,56 \text{ g}$$

$$0,25 \text{ M} \rightarrow X$$

$$X = 39,39 \text{ g}$$

Para preparo de 100 mL:

$$39,39 \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ mL}$$

$$X \rightarrow 100 \text{ mL}$$

$$X = 3,939 \text{ g}$$

Portanto, em resumo, é fundamental: na amostragem, coletar um número suficiente/representativo do material; no preparo da amostra, eliminar os elementos que possam interferir no resultado e isolar as substâncias de interesse; identificar, separar e quantificar a substância a ser estudada; analisar os dados por meio de métodos algébricos / estatísticos para estimação de quantidade e erros e por fim a avaliação dos resultados determinará as decisões perante as respostas obtidas.

6. Referências Bibliográficas

CAMÕES, M.F. Soluções tampão de pH. Química, n. 104, p. 53 - 56, 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, p.319, 1997.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Processos Químicos**, n.5, p. 9-23, 2009.

OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742 – 756, 2009.

CAPÍTULO 10

ATIVIDADE DA ENZIMA NITRATO REDUTASE

BRENO KENNEDY; GABRIEL HENRIQUE GERMINO; LEANDRO BIANCHI; EDILSON RAMOS GOMES; DAYANNE FABRÍCIO BRESSAN; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

A atmosfera terrestre é composta de diversos gases, como oxigênio, gás carbônico, metanol e nitrogênio. Cerca de 0,04% do nitrogênio estaria na forma combinada, sendo 57% na forma orgânica e 43% na forma inorgânica, sendo que na forma orgânica 4% fazem parte dos seres vivos, 94% são encontrados em vegetais, 4% na biomassa microbiana e 2% nos animais (SIQUEIRA; FRANCO, 1988).

O fornecimento de nitrogênio gasoso pode ser originado a partir de queimas industriais, incêndios florestais e atividades vulcânicas na forma de amônio (NH_4^+), ou através da oxidação do N_2 pelo oxigênio (O_2) ou pelo próprio ozônio (O_3) na presença de descargas elétricas ou de radiação ultravioleta, gerando o nitrato (NO_3^-). Para a absorção em plantas, os principais compostos são aqueles altamente oxidados, dos quais o nitrato é o principal deles. Porém, após a absorção, para serem incorporados nos tecidos celulares, esses compostos precisam ser reduzidos na forma de amônio ou amina (NH_2^-) (CORDEIRO, 2004).

Após ser absorvido pelas plantas o nitrato (NO_3^-) é convertido em amônio (redução assimilatória), sendo o processo catalisado por duas enzimas diferentes. Primeiramente o nitrato é convertido a nitrito (NO_2^-) em uma reação irreversível em que dois elétrons são transferidos do NADH para o nitrito, por intermédio da enzima nitrato redutase (MARENCO; LOPES, 2005).

A nitrato redutase pode ser classificada como NADH específica, ocorrendo mais em plantas e algas, como NAD(P)H biespecífica presente em fungos e podendo ocorrer em algas e plantas, e como NADPH específica, exclusivas de fungos (GUERRERO; VEJA; LOSADA., 1981).

Posteriormente ocorre a redução do nitrito para amônio que é intermediada pela enzima nitrito redutase, a qual transfere seis elétrons da ferredoxina reduzida para o nitrito para produzir NH_4 e ferredoxina oxidada (MARENCO; LOPES, 2005).

Duas enzimas participam da incorporação do amônio em nucleotídeos e aminoácidos, o glutamato sintetase (GOGAT) capaz de formar moléculas de glutamato e a glutamina sintetase (GS) que desempenha o papel de formar a glutamina através da condensação do glutamato e da amônia (LARCHER, 2000).

Por ser considerada como fixadora de nitrogênio, a nitrato redutase possui um papel muito importante nas plantas, sendo utilizada como parâmetro para o déficit hídrico causado por fatores abióticos, pois sua atividade é controlada pela quantidade de água e pela concentração de acidez no solo (SHARMA; DUBEY, 2005). Ao decorrer do dia, essa enzima é altamente expressa no final da noite e no começo do dia, o que torna importante sua quantificação nas folhas em períodos com no mínimo duas horas de luz (YANG; MIDMORE, 2005).

2. Extração da Enzima Nitrato Redutase

2.1. Materiais utilizados:

- Tampão fosfato de potássio
- Nitrato de Potássio
- *n*-propanol
- *n*-naftil etileno diamina
- Sulfanilamida

2.2. Preparo das soluções

- **Tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0**

Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) PM = 174,18g

1 mol L⁻¹ → 174,18g

0,1 mol L⁻¹ → X

X = 17,418g em 1 L de H₂O destilada

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) $\text{PM} = 136,09\text{g}$

$1 \text{ mol L}^{-1} \rightarrow 136,09\text{g}$

$0,1 \text{ mol L}^{-1} \rightarrow X$

$X = 13,609 \text{ g em } 1 \text{ L de H}_2\text{O destilada}$

 KH_2PO_4 (monobásico, $\text{PM}=136,09$) = **$13,609 \text{ g L}^{-1}$**

K_2HPO_4 (bibásico, $\text{PM}= 174,18$) = **$17,41 \text{ g L}^{-1}$**

** pH final = 7 (o ajuste do pH deve ser feito conforme a ordem apresentada)

- **N-propanol (1%)**

Para preparar 50 mL de solução, pipetar 500 μL de N-propanol em um balão e completar para 50 mL com água destilada.

- **Tampão de extração**

O tampão para extração e avaliação da NR é composto por:

- 1) Tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0
- 2) KNO_3 (0,1 M): 1 M $\text{KNO}_3 = 101,1 \text{ g mol}$
- 3) N-propanol (1%)

Para produzir 250 mL:

2,527 g de KNO_3

2,5 mL da solução de *n*-propanol

Dissolver no tampão fosfato de potássio até atingir 250 mL em balão volumétrico (0,1 M pH 7).

- **Solução N-Naftil 0,02%** = (N-(1-naphthyl) ethelenediamine dihydrochloride: 0.02% (peso/volume) em água destilada): Dissolver 10 mg de N-(1-naphthyl) ethelenediamine dihydrochloride em água destilada completando o volume final para 50 mL.

Observação': Esta solução precisa ser preparada no dia da análise.

- **Solução de sulfanilamida 1% (Massa/Volume) em HCl 1,5N**

HCl 1,5N

Como: densidade = 1,19 g mL⁻¹ (T=37%) PM: 36,48

Então: em mL de solução de HCl: 1,19 X 0,37 = 0,4403 g de HCl em mL do reagente.

NHCl = 0,4403/36,48 = 0,01207

M = 0,01207/ 1,0 X 10⁻³L = 12,07 Molar

Acrescentar a solução de KH₂PO₄ à solução de K₂HPO₄ até atingir pH final de 7,0. Completar o vol. para 1L.

Portanto para preparar 1,0L de uma solução a 1,5N

N1 x V1 = N2 x V2

12,07 x V1 = 1,5 x 1,0

V1 = 0,1242 L de HCl

- Colocar 0,1242 L de HCl em balão volumétrico e completar para 1L com água destilada

Para preparar 100 mL de solução de sulfanilamida:

- Acrescente 12,4 mL de HCl em 87,6 mL de água destilada
- Dissolva 2 g de sulfanilamida

Cuidado:

As soluções que possuem alta concentração de ácido clorídrico (HCl) são corrosivas e podem ocasionar queimaduras graves. O vapor é extremamente irritante para olhos, peles e sistema respiratório. Recomenda-se que o preparo dessa solução seja realizado dentro de uma capela ventilada, lembrando que sempre que se for realizar a diluição de ácidos, deve-se adicionar o ácido à água, e não o contrário.

*Observação*²: Esta solução precisa ser preparada no dia da análise.

3. Teste Enzimático

3.1. Planejamento para coleta de amostras:

- I. Para o dia da coleta as plantas precisam passar por exposição mínima de 2 horas a luz solar, para ativação da nitrato redutase;
- II. As folhas coletadas não devem ser muito jovens ou velhas, o local ideal para a coleta é o terço médio da planta, evitando também folhas predadas, doentes ou com injúrias;
- III. É necessário para esta análise que o material vegetal estar *in natura*, evitando desta o contato o congelamento das amostras;
- IV. Para a coleta do material é ideal que se desenvolva uma “armadilha de gelo” que consiste em colocar gelo em uma caixa de isopor e isolar com algum material como papelão, evitando-se o contato direto das amostras com o gelo.

3.2. Preparo das amostras:

1. Para todo o manuseio das folhas devem-se utilizar luvas, evitando contaminação das amostras;
2. As folhas devem ser lavadas em água destilada e secas em papel toalha (**Figura 10.1**);

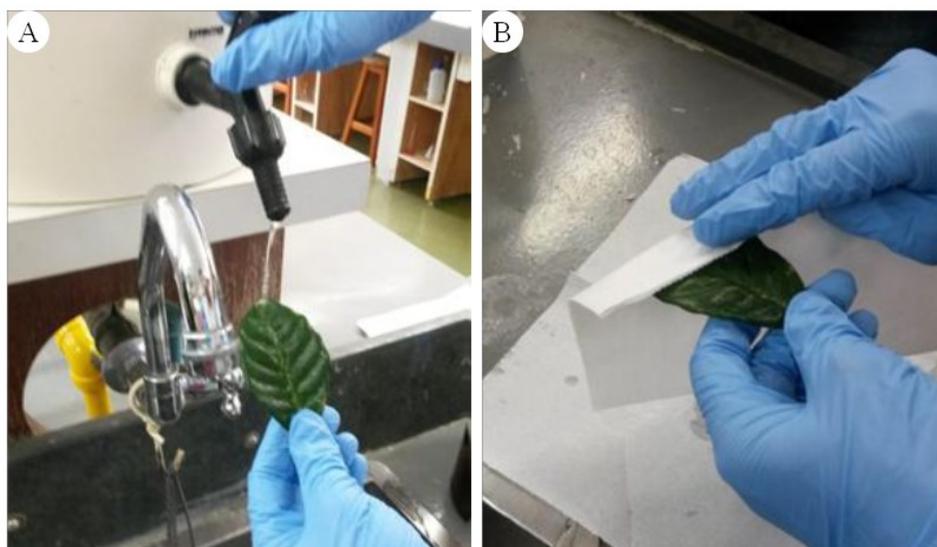


Figura 10. 1. Limpeza de impurezas depositadas na fase adaxial das folhas. *Fonte:* Autores (2016).

3. Devem-se desprezar as extremidades das folhas assim como a nervura central (**Figura 10.2**);

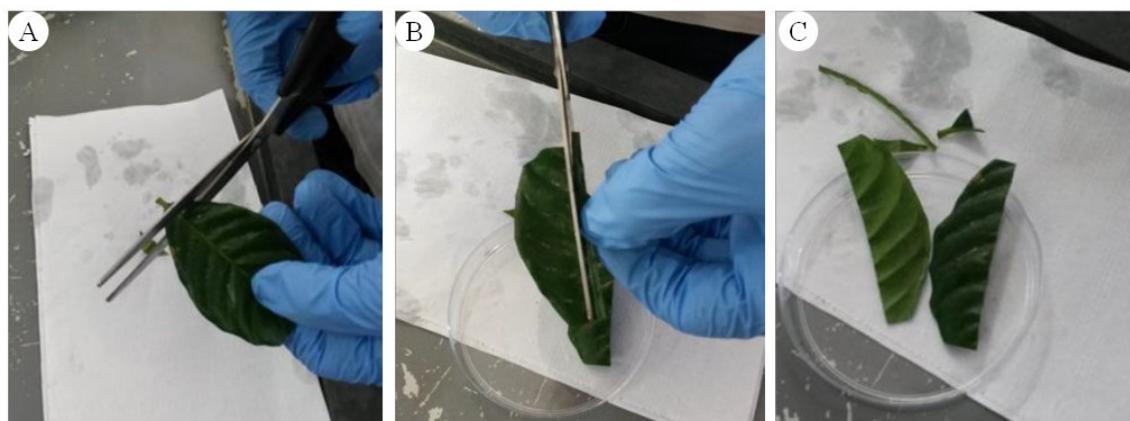


Figura 10.2. Separação das lâminas foliares. **A-** Retirada das extremidades. **B-** Retirada da nervura central. **C-** Lâminas Separadas. *Fonte:* Autores (2016).

4. Com auxílio de tesoura ou estilete, cortar 200 mg de segmentos, o mais fino possível, das lâminas foliares (**Figura 10.3**);

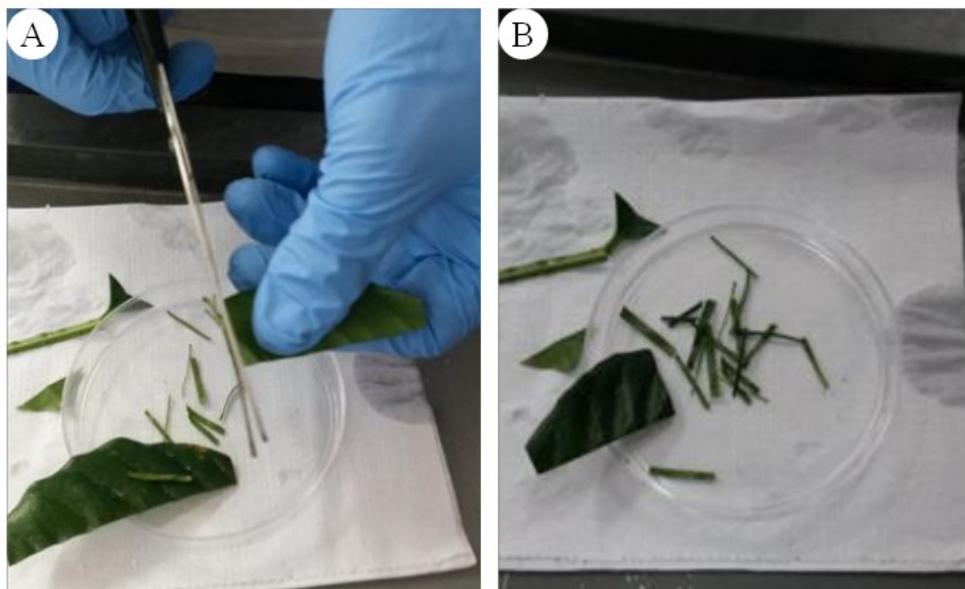


Figura 10.3. A - B -Corte dos segmentos foliares que serão utilizados para a análise. *Fonte:* Autores (2016).

4. Ensaio Enzimático

1. Obtenção da curva de referência;

2. Os segmentos devem ser colocados em tubos de ensaio com tampa de borracha especial para infiltração à vácuo, acrescentar 10 mL do tampão de extração (Fig. 5A), contendo:

- 10 mL de Tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0
- 1 mL de KNO_3 0,1 M
- 1 mL de n-propanol (1 % v/v);

3. Primeiro período de incubação (à vácuo): Será composto por 3 períodos de indução do vácuo com duração de 2 minutos, apresentando intervalos com duração de 1 minuto entre eles (para infiltração do KNO_3 (**Figura 10.4 - A**)).

*Observação*³: Um sinal de que a infiltração está acontecendo corretamente deve-se observar se está ocorrendo formação de bolhas nas bordas dos segmentos foliares (**Figura 10.4 - B**).

*Observação*⁴: Deve-se evitar que as folhas se depositem no fundo dos tubos. Para isso aconselha-se a desferir pequenas batidas no fundo, forçando desta forma os segmentos a retornarem a linha superficial da solução tampão (**Figura 10.4 - C**).

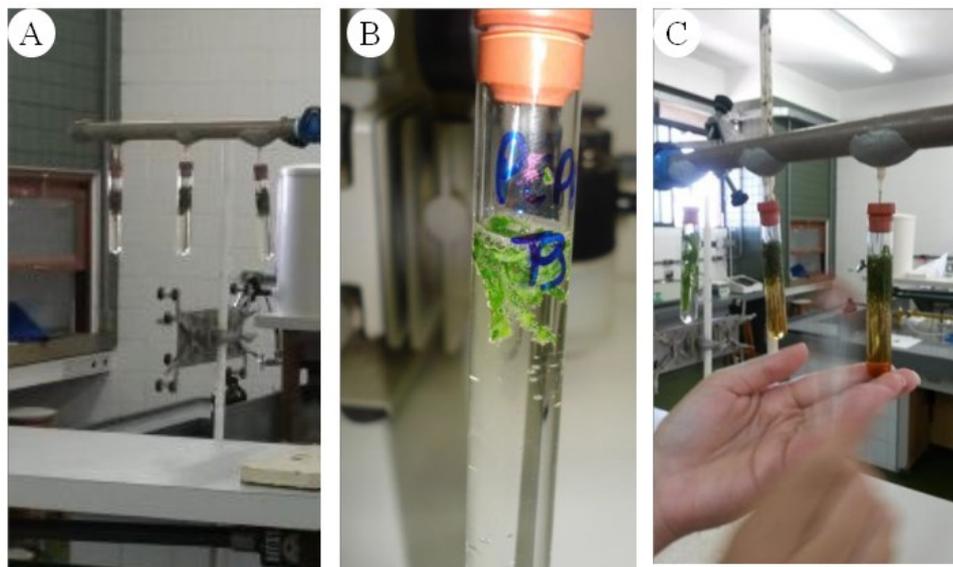


Figura 10.4. Ensaio Enzimático. **A-** Estante para incubação à vácuo. **B-** Segmentos foliares suspensos apresentando bolhas nas bordas dos segmentos. **C-** Batidas nos tubos para que as folhas retornem a superfície. *Fonte:* Autores (2016).

4. Segundo período de incubação (em banho-maria): Os tubos devem ser transferidos para banho-maria à 30°C, mantendo as amostras em agitação evitando a exposição desta à luz por período de 1 hora;

5. Pipetar 1 mL das amostras dos tubos de ensaio para tubos de ensaio limpos.

6. Após pipetar as amostras adicionar:

- 1 mL da solução de sulfanilamida
- 1 mL da solução de N-Naftil;

7. Terceiro período de incubação (banho-maria de curta duração): Durante este terceiro momento os tubos ficarão à 30°C, mantendo as amostras em agitação evitando a exposição desta à luz por período de 15 minutos;

Observação ⁵: Após este período de incubação as amostras adquirirão um cromóforo violáceo, diferindo na intensidade conforme o tratamento imposto (Figura 10.5).



Figura 10.5. Amostras prontas para análise em espectrofotômetro, após terceiro período de incubação. *Fonte:* Autores (2016).

8. Montar branco para zerar espectro:

- 10 mL de Tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0
- 1 mL de água destilada
- 1 mL de n-propanol (1 % v/v);

9. Ler em espectrofotômetro a 540 nm para determinação da concentração de NO_2 ($\mu\text{M NO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$).

5. Detectando Possíveis Erros Durante a Análise

1. Em hipótese alguma a vidraria poderá ser lavada com sabão detergente. Deve-se planejar esta análise colocando os tubos em água fervente e secos. O problema do uso de detergente na limpeza dos tubos é o fato de que os mesmos podem apresentar em sua composição o nitrito, resultando em uma atividade enzimática que não condiz com a condição das amostras analisadas.

2. Plantas que apresentam grande produção de compostos fenólicos, podem ser um problema para esta análise. Pois compostos fenólicos desenvolvem auto-oxidação do tecido vegetal. Efeito este facilmente notado devido mudança na coloração da solução durante a incubação à vácuo (**Figura 10.6**).

Durante todo o processo da análise a solução deve estar límpida até o momento da terceira incubação, momento este em que a solução apresenta um cromóforo violáceo. Isto poderá ser evitado tomando-se as precauções:

- Fazendo testes com segmentos mais largos da lâmina foliar;
- Minimizando ao máximo o tempo que vai do início do processamento das amostras (corte das folhas) até o momento da primeira incubação.

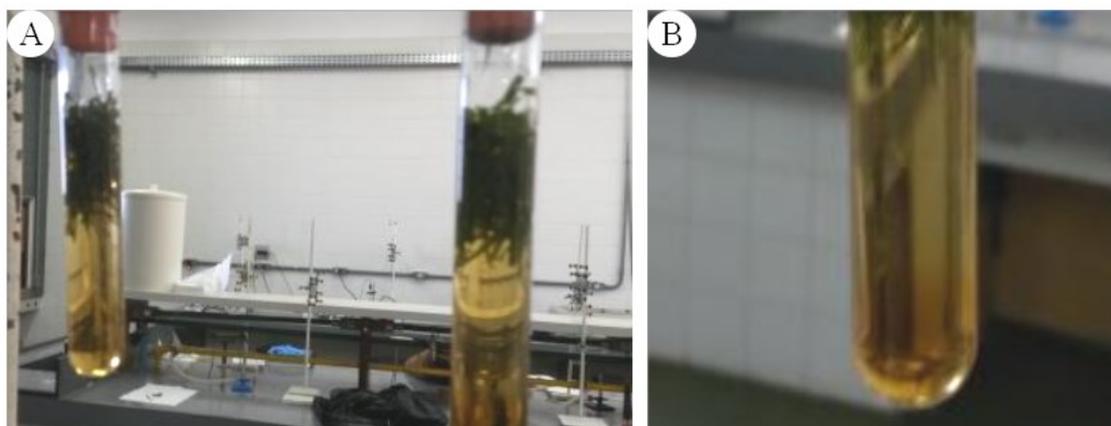


Figura 10.6. A - B - Amostras auto-oxidadas mediante ação dos fenóis, ácido cafeico e ácido clorogênico. *Fonte:* Autores (2016).

6. Curva Padrão de Nitrito (NO_2)

- **Solução estoque de 10 mM de NaNO_2**
69 mg de nitrito de sódio (NaNO_2)
Dissolver em água destilada até atingir o volume de 100 mL.

- **Solução de Nitrito para a curva padrão:**

Pipetar 1,25 mL (ou 1250 µL) da solução estoque de NaNO₂ e completar com água destilada para um volume final de 500 mL.

Logo após, realizar a incubação como apresentado na Técnica a partir da primeira incubação em banho-maria. Organize uma planilha com dados obtidos com os resultados das leituras de concentração de nitrito (**Tabela 10.1**), possibilitando assim, calcular a atividade da NR nos segmentos foliares, com a unidade final em nM NO₂ h⁻¹ g⁻¹ MF.

Tabela 10.1. Soluções preparadas com diferentes concentrações de nitrito para obtenção da curva padrão.

Tubo	Volume da solução de nitrito (mL)	Volume de água destilada (mL)	Concentração final de NO₃ (nmol)
0	0	10	0
1	1	9	25
2	2	8	50
3	4	6	100
4	6	4	150
5	8	2	200
6	10	0	250

7. Referências Bibliográficas

CORDEIRO, L. Fixação de nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 158-160, 2004.

GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M.; LOSADA, M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, n. 1, p. 169-204, 1981.

LARCHER, W. Ecologia vegetal, São Carlos: RiMa Artes e Textos, p.531, 2000.

- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Editora Universidade Federal de Viçosa, p. 306-308, 2005.
- SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 8, p. 854-864, 2005.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do Solo- Fundamentos e Perspectivas. Brasília, Ministerio da Educacao e Cultura, p. 241, 1988.
- YANG, Z.; MIDMORE, D.J. A model for the circadian oscillations in expression and activity of nitrate reductase in higher plants. **Annals of Botany**, v. 96, n. 6, p. 1019-1026, 2005.

CAPÍTULO 11

EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE PIGMENTOS FOLIARES

RENAN LIMA DE SOUSA; ADOLFO BERGAMO ARLANCH; EDHIELLE SOARES; JÉSSICA KARINE BURIM CARDOSO; JAQUELINE PINHEIRO; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

A fotossíntese é um processo pelo qual plantas e certos tipos de bactérias geram compostos orgânicos na presença de luz, sendo o principal mecanismo de entrada de energia no mundo dos seres vivos. Consiste na oxidação da água e na redução do CO₂ para formar compostos orgânicos, como carboidratos (MARENCO; LOPES, 2013). Nos eucariotos fotossintetizantes, a fotossíntese acontece na organela subcelular conhecida como cloroplasto (TAIZ; ZEIGER, 2013). Ainda segundo os autores, os aspectos mais marcantes da estrutura do cloroplasto é seu extenso sistema de membranas internas conhecidas como tilacoides.

Todos os organismos fotossintéticos pigmentos orgânicos, localizadas nas membranas dos tilacoides, capazes de absorver a radiação visível que iniciará as reações fotoquímicas da fotossíntese. Em plantas superiores, os principais pigmentos fotossintéticos são a clorofila a e b e os carotenoides (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As clorofilas A (pigmento predominante) e B (pigmento acessório) são componentes das membranas fotossintéticas e ocorrem numa razão de aproximadamente três para um, respectivamente, que estão presentes nas algas verdes e nas folhas de plantas superiores (CARVALHO, 2005). Os carotenoides têm espectros de absorção de luz na região entre 400 nm a 550 nm, tendo uma íntima associação com as clorofilas (TAIZ; ZEIGER, 2004). A energia absorvida por esses pigmentos pode ser transferida para a clorofila A durante a fotossíntese. Além disso, os carotenoides protegem as moléculas de clorofilas e as proteínas contra a foto-oxidação quando expostos a luz excessiva (DUARTE, 2003).

Segundo Santos *et al.* (2008), esses pigmentos são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, em forma de ATP e NADPH, sendo assim, são relacionados com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, ao seu

crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes. Ainda segundo o autor, a clorofila a é o pigmento utilizado para realizar a etapa fotoquímica, o primeiro estágio do processo fotossintético. Os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (BUCHANAN ; GRUISSEM ; JONES, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A determinação do conteúdo de pigmentos foliares representa importante ferramenta de avaliação em estudos de fisiologia vegetal, quer seja para caracterização do material, que seja para a distinção entre tratamentos ou interação entre plantas e fatores ambientais (LAMBERS; CHAPIN, 1998). Em sua maioria, os métodos empregados baseiam-se na absorbância e refletância dos pigmentos constituintes das folhas, podendo ser de caráter destrutivo ou não (SANTOS, 2008).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo extrair pigmentos foliares em plantas de café utilizando o DMF e assim determinar o teor de pigmentos contidos na planta em estudo.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Fotossíntese

Etimologicamente, fotossíntese significa síntese com a ajuda da luz; na realidade, consiste no conjunto de reações pelo qual as plantas iluminadas sintetizam sua própria matéria orgânica. O processo fundamental para a vida (COLL *et al.*, 2001).

Em plantas superiores, o mesófilo das folhas é o tecido fotossintetizador mais ativo, pois contém os cloroplastos, organelas ricas em pigmentos clorofílicos, especializadas na absorção de luz. A fotossíntese consiste na oxidação da água e na redução do CO₂ para formar compostos orgânicos, como os carboidratos (MARENCO; LOPES, 2009). Compreendido, segundo Cool *et al.* (2001), como um processo de oxirredução em que o doador de elétrons, a água, se oxida, e um aceptor, o dióxido de carbono, e outro aceptor adequado (nitrato ou sulfato), se reduzem.

No início do sec. XX, um pesquisador inglês chamado Blackman, verificou que a fotossíntese é um processo constituído de duas etapas interdependentes. As reações

dependentes de luz, responsáveis pela transformação da energia solar em química, integrantes da etapa fotoquímica da fotossíntese, e a etapa bioquímica, constituída pelas reações enzimáticas de fixação de do CO₂ e síntese de carboidratos (KERBAUY, 2012).

3.2. Fase fotoquímica

A reação primária da fotossíntese ocorre em membranas internas de cloroplastos, chamados de tilacóides. No qual ocorre a transferência de elétrons entre uma forma especial de clorofila e uma molécula receptora específica. Ao receberem luz, os elétrons da moléculas de clorofila são excitados. Tornam-se excitados, assim oxidados, e as moléculas receptoras tornam-se reduzidas (KERBAUY, 2012).

De todo o processo, o fundamental é o estudo da assimilação de energia luminosa e sua transformação em energia química. Os efeitos da luz sobre os seres vivos se devem, primeiramente, a sua absorção por moléculas componentes dos organismos.

Os pigmentos presentes na membrana do tilacóides absorvem energia e transferem para sítios bem definidos, denominado de centro de reação. Com dois centros de reação, absorvendo em 680 nm e outro em 700 nm, que se relacionam por meio de transportadores de elétrons. O espectro de absorção corresponde a quantidade de energia luminosa captada por uma molécula ou substância em razão do comprimento de onda de luz (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por sua vez, a molécula de clorofila absorve energia luminosa em 680 nm no espectro visível, e transfere os elétrons provenientes da água para a cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese (KLUGE, 2005).

As clorofilas absorvem mais energia eletromagnética na faixa de 400 a 500 nm e de 600 a 700 nm; contudo, absorve pouca luz na faixa de 500 a 600 nm , isto é, na região do verde ou amarelo (MARRENCO; LOPES, 2013). Assim, moléculas denominadas pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, e carotenóides), segundo Taiz e Zeiger (2013), parecem verde ao olho humano porque absorvem luz principalmente nas porções vermelha e azul dos espectros.

3.3. Fase bioquímica

A reação secundária da fotossíntese acontece no estroma dos tilacóides. Segundo Marrenco e Lopes (2013), essa fase é fortemente influenciada pela temperatura, e

também, dependente da luz, pois algumas enzimas envolvidas tornam-se inativas na ausência de luz.

Todos eucariotos fotossintetizante reduzem o CO₂ a carboidrato, pelo mesmo mecanismo, o ciclo fotossintético de redução de carbono, que inicialmente foi descrito para plantas C₃. Posteriormente, outras rotas metabólicas associadas a fixação fotossintética do CO₂, tal como o ciclo C₄ de assimilação de carbono, são auxiliares e dependentes do ciclo de Calvin (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A rota metabólica pela qual o CO₂ é fixado e reduzido a carboidratos é denominado de ciclo de Calvin. No ciclo de Calvin-Benson, o CO₂ e a água são combinados enzimaticamente com uma molécula aceptora contendo cinco átomos de carbono (Rubisco) para gerar duas moléculas de um intermediário com três carbonos. Este intermediário (3-fosfoglicerato) é reduzido a carboidrato, utilizando o ATP e NADPH gerados fotoquimicamente. O ciclo é terminado com a regeneração do acceptor de cinco carbonos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

3.4. Pigmentos fotossintetizantes

Todas as células fotossintéticas contêm ao menos um tipo de clorofila e se localizam nos tilacóides dos cloroplastos (COLL *et al.*, 2001). As moléculas de clorofila são formadas por complexos oriundos da porfirina, que tem como átomo central o Mg (magnésio). Constituídas por uma estrutura macrocíclica assimétrica completamente insaturada formada por quatro anéis de pirrol. Esses anéis são numerados de 1 a 4 ou de “a” a “d”, segundo o sistema de numeração de Fisher (SCHOEFS, 2002).

Os pigmentos que atuam na fotossíntese são as clorofilas a e b, os carotenóides e as ficobilinas. A clorofila a é o pigmento envolvido na fase fotoquímica, à medida que os demais compõem os chamados pigmentos acessórios (KLUGE, 2005), que contribuem com a absorção de radiação luminosa e a transferência da energia radiante resultante para os centros de reação (TAIZ; ZIEGER, 2004). Todos os organismos fotossintéticos oxigênicos que produzem oxigênio a partir da água durante a fotossíntese (exceto as bactérias fotossintéticas), contém clorofila a presente em quantidade menor em relação a clorofila b (entre um terço ou pela metade) (COLL *et al.*, 2001). Taiz e Zieger (2004) citam os principais pigmentos acessórios, a clorofila *b*, encontrada em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias, a clorofila *c*, em feófitas e diatomáceas, e a clorofila *d*, em algas vermelhas.

4. Métodos de Extração de Pigmentos Foliaves

Para a determinação do conteúdo de pigmentos foliares é realizada a extração de solutos foliares, seguido pela determinação espectrofotométrica, utilizando comprimentos de onda da região do vermelho do espectro de luz visível (RAJCAN; DWYER; TOLLENAAR, 1999). Os métodos empregados na extração do conteúdo de pigmentos foliares podem ser de caráter destrutivo ou não, baseando-se na absorbância e reflectância destes (LICHTENTHALER, 1987). E segundo Streit *et al.* (2005), entre os métodos, o destrutivo é o mais comum, o que utiliza solventes classificados como polares (acetona, metanol, etanol, acetato de etila e dimetilformamida) são mais eficientes comparados àqueles classificados como apolares (hexano e éter petróleo).

Para a prática realizada, segue o material necessário:

- Para coleta: lâmina, sacolas plásticas, caixa de isopor.
- Para laboratório: cortador circular, tubos de ensaio, soluções (DMF e HCl), pipetas, beakers, papel absorvente, luvas, cubetas de vidro e espectrofotômetro.
- Foram coletadas folhas de cafeeiro e colocadas rapidamente em sacolinhas plásticas previamente identificadas por repetições de cada um dos tratamentos e levadas para o laboratório para o preparo da extração de pigmentos.

1. Os tubos de ensaio foram cobertos com papel alumínio (**Figura 11.1 - A**) e identificados, contendo: o tratamento e/ou repetição da amostra, em seguida os tubos foram organizados em uma grade (**Figura 11.1 - B**).

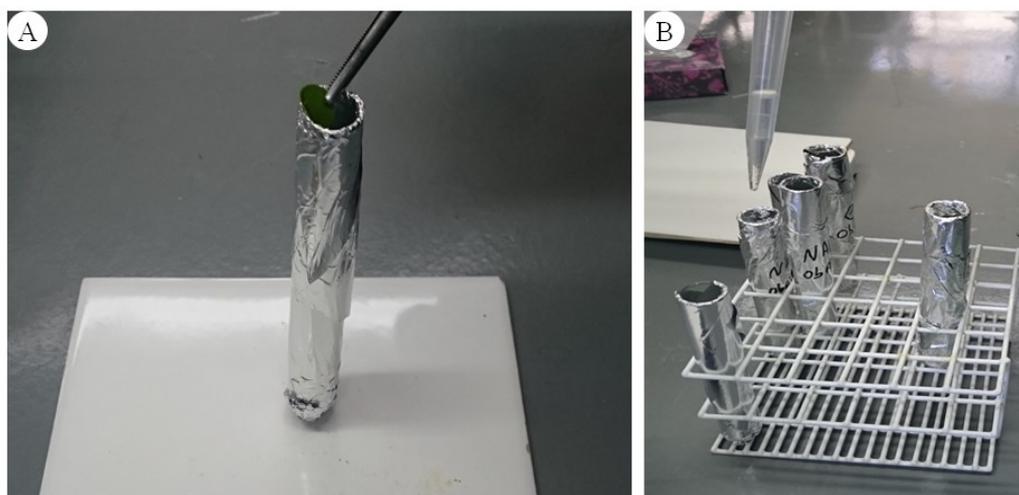


Figura 11.1. Preparação dos tubos e identificação dos tratamentos. **A** - Tubos de ensaio cobertos com papel alumínio. **B** - Tubos organizados em uma grade. *Fonte:* Autores (2016).

2. Foi adicionado o volume de 2 mL de N-Dimetilformamida em cada tubo e foram cortados os discos (**Figura 11.2**) na secção media da folha (evitou-se grandes nervuras).

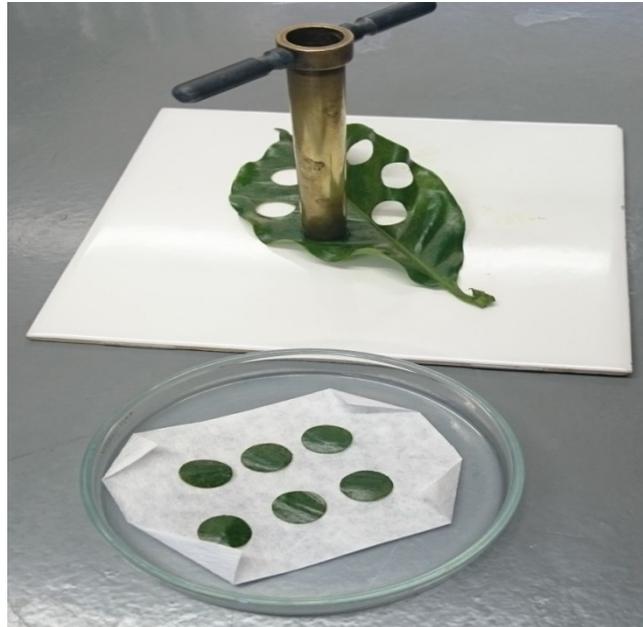


Figura 11.2. Discos cortados para aplicação de N-Dimetilformamida. Fonte: Autores (2016).

3. Cada disco foi colocado no interior do tubo (**Figura 11.3**) contendo a solução de extração e finalmente cobriu-se totalmente (grade+tubos) com papel alumínio e armazenado no escuro por 24 horas.



Figura 11.3. Discos imersos na solução de extração. Fonte: Autores (2016).

➤ *Leitura do extrato no Espectrofotômetro*

Antes de iniciar com as leituras foram colocados 2 mL de DMF puro na cubeta de vidro para zerar o aparelho, posteriormente depositou-se 2 mL da solução contida nos tubos (solução com coloração verde) em cada cubeta, limpam-se as laterais e prosseguiu-se a colocá-las no espectrofotômetro para obter as leituras (**Figura 11.4**).



Figura 11.4. Leitura no espectrofotômetro. *Fonte:* Autores (2016).

A clorofila foi lida nos comprimentos de onda λ 480, 646,8 e 663,8 nm (A); após as medidas, os extratos foram colocados em um Becker (B) e descartados de maneira apropriada.

Para o cálculo das concentrações de clorofila *a* e clorofila *b* utilize as formulas correspondentes (1 e 2) descritas por Lee, Bremmeier e Smith (1987). Assim, utilizando-se a área do disco foliar usado, calcular a concentração de cada compost por unidade de área foliar (planilha Excel).

Fórmulas para os cálculos:

- Clorofila *a*: $12 \times \text{Absorbância a } 663,8 \text{ nm} - 3,11 \times \text{Absorbância a } 646,8 \text{ nm}$;
- Clorofila *b*: $20,78 \times \text{Absorbância a } 646,8 \text{ nm} - 4,88 \times \text{Absorbância a } 663,8 \text{ nm}$.

4. Referências Bibliográficas

- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Photosynthesis. In: Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville American Society of Plant Physiologists, p.568-629, 2000.
- CARVALHO, A.P.F. Estudo de características foliares de espécies de lenhosas de cerrado e sua relação com os espectros de refletância. 2005. 142 f. Tese (Doutorado). Curso de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCÍA, B. S.; TAMÉS, R. S. Transporte por el floema. In: *Fisiología vegetal*. Madrid, Ediciones Pirámide, p. 103-120, 2001.
- DUARTE, C.C. Detecção óptica da eficiência quântica da fotossíntese. 109 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
- KERBAUY, G.B. *Fisiologia vegetal*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 431, 2012.
- KLUGE, R.A.; LCB – 311. *Fisiologia Vegetal: apontamentos de aulas teóricas de fotossíntese*. ESALQ / USP, 2005.
- LAMBERS, J.; CHAPIN, F.S.; PONS, T.L. *Plant physiological ecology*. New York, Springer-Verlag, p.540, 1998.
- LEE, D. W.; BREMMEIER, S.; SMITH, A P. The selective advantage of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. **Biotropica**, v. 19, p. 40-49, 1987.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.
- MARRENCO, R.A.; LOPES, N.F. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Viçosa: UFV, p. 486, 2013.
- RAJCAN, I.; DWYER, L.; TOLLENAAR, M. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. **Field Crops Research**, v. 63, p. 13-17, 1999.
- SANTOS, R.P; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v. 55, n. 4, p.356-364, 2008.
- SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.361-371, 2002.
- STREIT, M.N. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.
- TAIZ, L.; ZIEGLER, E. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre : Artmed, p. 693, 2004.
- TAIZ, L.; ZIEGLER, E. *Fisiologia vegetal*. 5.ed. Porto Alegre : Artmed, p. 954, 2013.

CAPÍTULO 12

CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA (CRA) E PERDA DE ELETRÓLITOS

ENRIQUE ALONSO ZUÑIGA; LUIS GOMES; JÉSSICA DE LIMA; EDILSON RAMOS GOMES;
RENATA BRUNA DOS SANTOS COSCOLIN; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

Os tecidos verdes da maioria dos vegetais apresentam um conteúdo médio de água entre 80 e 90%. Em células maduras, o citoplasma ocupa somente 5 a 10% do volume total da célula, sendo o restante preenchido pelo vacúolo (MARENCO; LOPES, 2009).

Segundo Marengo e Lopes (2009), a célula possui processos que são afetados de forma direta ou indireta pelo fornecimento de água. Ainda segundo os autores, o conteúdo de água na planta varia em função das flutuações de umidade do ar e do solo, das taxas de transpiração da planta. A água tem diversas funções dentro da planta, sendo as mais importantes: constituinte de protoplasma; solvente de substâncias; reagente e produto de várias reações químicas; mantém as estruturas moleculares; mantém a turgidez; é termorreguladora, entre várias outras funções.

Na maioria das plantas, o xilema constitui a parte mais longa da rota de transporte de água. Em uma planta de 1 m de altura, mais de 99,5% da rota de transporte de água encontra-se dentro do xilema; em árvores altas, o xilema representa uma fração ainda maior da rota (TAIZ; ZEIGER, 2013). Já na trajetória da folha para a atmosfera, a água é puxada do xilema para as paredes celulares do mesófilo, de onde evapora para os espaços intercelulares da folha. De acordo com os autores, o vapor de água sai, então, da folha através da fenda estomática.

Uma série de fatores pode afetar a quantidade de água que é consumido pelas plantas, tais como: a espécie; a fenologia da planta; características do solo e as condições climáticas. Sendo assim, a planta possui duas estratégias básicas para resistência a seca: o "evitamento" e a tolerância à desidratação (LEVIT, 1972). O

"evitamento" caracteriza-se pela desidratação que atua na manutenção do conteúdo relativo de água (CRA) nos tecidos, durante o período de déficit hídrico. Plantas que apresentam essa característica de estratégia de tolerância apresentam tecidos que podem tolerar a desidratação, até certo ponto, sendo o baixo conteúdo relativo de água crítico e, apresentam ajuste osmótico. Essa estratégia de tolerância permite às plantas manter a atividade metabólica com a evolução do déficit hídrico e declínio do CRA (LAWN; LIKOSWE, 2008).

Várias características são relacionadas com a tolerância à seca em plantas cultivadas. A utilização de métodos como a determinação da umidade gravimétrica do solo (Ug) e o conteúdo relativo de água (CRA) são apontados como eficazes no estudo da adaptação de plantas à seca, bem como na comparação de materiais em programas de melhoramento (JONES, 2007).

O CRA é provavelmente a medida mais adequada da condição hídrica das plantas em termos de consequência fisiológica da deficiência hídrica celular (BROETTO, 2016). Outra técnica adequada para detectar consequências fisiológicas do déficit hídrico na planta é da perda de eletrólitos. Esse parâmetro irá identificar possíveis variações na permeabilidade da membrana após um drástico estresse hídrico.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o conteúdo relativo de água presente na planta, além da definição da perda de eletrólitos. Ambos os parâmetros para detectar as consequências do déficit hídrico sofrido pela mesma.

2. Revisão Bibliográfica

Segundo Smit e Singels (2006) a deficiência hídrica devido à perda de água da planta para a atmosfera é uma das principais causas responsáveis pelas perdas econômicas em culturas de todo o mundo. Nesse sentido, o entendimento a respeito do déficit hídrico é de extrema importância.

O conteúdo relativo de água (CRA) é um critério usado para estimar o estado hídrico de determinada planta, definido como a quantidade de água do tecido vegetal no momento, comparada com a quantidade máxima que ele pode armazenar (CAIRO, 1995).

A perda de eletrólitos, também é um fator usado para estimar o estado hídrico vegetal, pois sob condições de deficiência hídrica, as membranas celulares sofrem danos

ocasionados pela formação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que desencadeia processos peroxidativos e conseqüentemente a perda de eletrólitos de turgescência (QUEIROZ *et al.*, 2002).

Sendo assim, os índices de CRA e perda de eletrólitos são importantes parâmetros avaliados para medir a condição de uma planta sob estresse hídrico. Dessa forma, trata-se de uma ferramenta muito usada durante as avaliações fisiológicas dos mais diversos experimentos que visam melhorar as respostas fisiológicas das plantas frente a um estresse hídrico.

Mendes (2011) utilizou características biométricas e fisiológicas para avaliar a resposta de clones de eucalipto que foram tratados com diferente disponibilidade hídrica e adubação potássica. Ele verificou que para estudos de deficiência hídrica os parâmetros fisiológicos são mais representativos, portanto, são mais importantes para serem avaliados durante estudos de estresse hídrico.

Pesquisas que associam déficit hídrico e diferentes formas de adubação são bastante debatidas. Bezerra (2015) utilizou dos índices de CRA e perda de eletrólitos para verificar a resposta de plantas de cana de açúcar tratadas com silício ao estresse hídrico e verificou que a restrição hídrica afetou tanto no potencial de água da folha quanto o extravasamento de eletrólitos. Ele conseguiu mostrar que plantas nutridas com silício apresentaram menores efeitos do déficit hídrico, indicando que o uso de adubos silicatos pode ser uma alternativa para plantas sujeitas ao estresse hídrico.

Nesse mesmo sentido, Catuchi *et al.* (2012) realizaram um trabalho avaliando as respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação com potássio e sob diferentes regimes hídricos e utilizaram o CRA como uma das variáveis analisadas para medir a resposta das plantas, entretanto, não verificaram diferenças significativas entre os tratamentos. Já Fioreze *et al.* (2013) utilizando a mesma cultura, com adubações de cálcio e cinetina, verificaram que os tratamentos promoveram a manutenção do CRA e reduziram a perda de eletrólitos celulares sob condições de estresse ambiental.

Cruz (2015) realizou um trabalho para verificar o resultado de concentrações de NaCl no solo em plantas jovens de cana-de-açúcar no qual o CRA apresentou diferenças significativas entre os tratamentos para o fator salinidade. Além disso, o CRA foi indicado por James e Cooper (2008) como fator de avaliação que pode auxiliar na detecção de variações genéticas, sendo capaz de mostrar diferenças entre grupos de cultivares com relação a estudo de tolerância a seca.

O CRA e extravasamento de eletrólitos podem ser usados para acompanhamento da recuperação de plantas que estavam sob estresse. Carvalho (2005) avaliou plantas estressadas de *Schizolobium amazonicum* e *S. parahyba*, da família Fabaceae e observou que as plantas reagiram bem, aumentando o CRA de 70 para 95%, em poucos dias de reidratação. Esse resultado indica que a falta de água não causou danos que fossem irreversíveis em plantas de guapuruvu e que estas puderam se recuperar e foram capazes de continuar absorvendo água e realizando o transporte para a parte aérea. Respostas semelhantes foram encontrados por Albuquerque *et al.* (2013) que trabalhou com mogno-africano e verificou por meio do CRA e outros parâmetros, que as plantas se reestabeleceram do estresse hídrico depois de três dias de reidratação.

Existem trabalhos que utilizam o CRA como parâmetro de avaliação para fins de avaliação de conservação pós-colheita. Pietro *et al.* (2012) e Spricigo *et al.* (2010) trabalharam com conservação e qualidade pós-colheita de flores e verificaram que os tratamentos mais promissores foram aqueles com menor atividade respiratória e menor perda de CRA entre outros.

Dessa forma, pode-se afirmar que o conteúdo relativo de água e perda de eletrólitos são importantes fatores para a avaliação do nível de estresse em que uma planta se encontra e que possuem diversas aplicações.

3. Avaliação do Conteúdo Relativo de Água

1. Coletaram-se folhas totalmente expandidas e foram depositadas dentro de sacolas plásticas herméticas, em seguida as amostras foram levadas para o laboratório para determinar as análises de CRA.
2. Utilizou-se um cortador de disco (**Figura 10.1-A**) e cortaram-se rapidamente seis discos (amostras) da secção media da folha (evitou-se nervuras), os quais foram pesados em balança analítica digital para determinar a massa de matéria fresca (**Figura 12.1- B**).

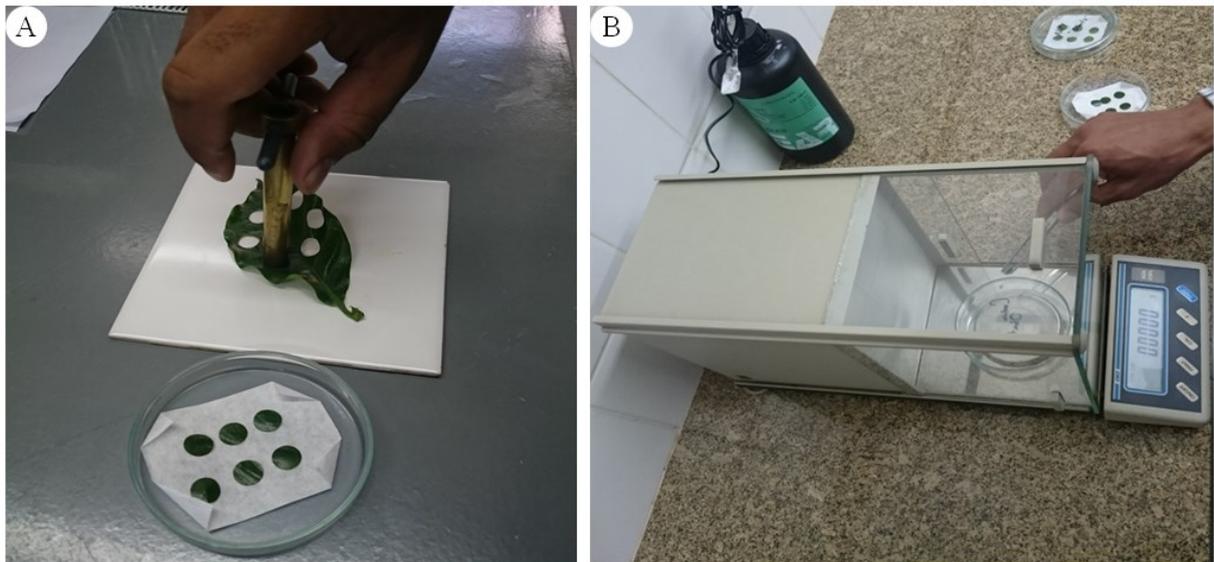


Figura 12.1. Avaliação do conteúdo relativo de água. **A-** Secção da folha em discos com área conhecida. **B-** Determinação da matéria fresca. *Fonte:* Autores (2016).

3. Posteriormente, colocaram-se os discos em placas de petri (**Figura 12.2-A**) com papel filtro saturado com água deionizada (**Figura 12.2-B**) por um período de 3 a 4 horas.

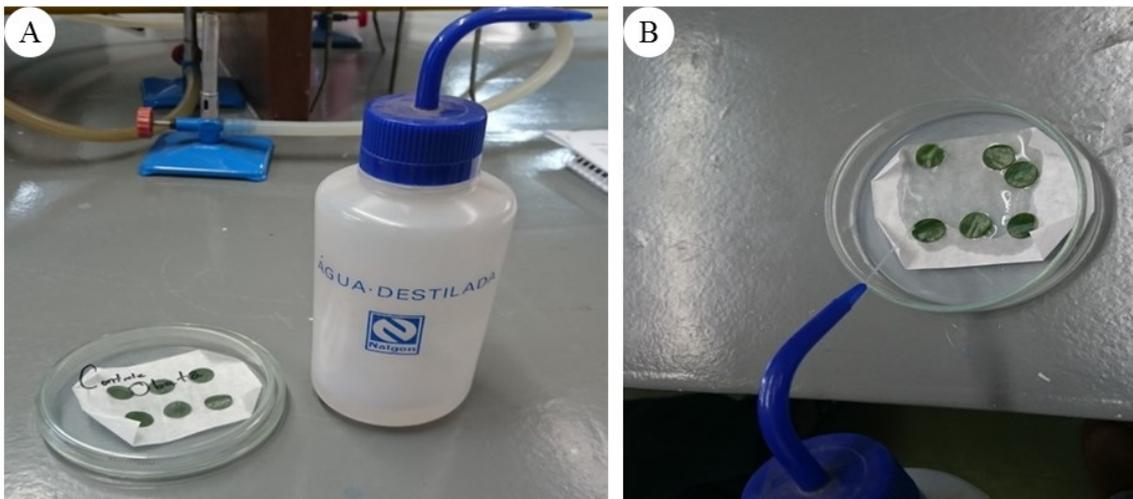


Figura 12.2. Imersão dos discos em água deionizada. **A** – Discos colocados em placas de petri. **B** - Papel filtro saturado com água *deionizada*. *Fonte:* Autores (2016).

4. Depois da embebição, os discos foram secos superficialmente com papel toalha (**Figura 12.3-A**) e obtido o peso totalmente túrgido (**Figura 12.3-B**).

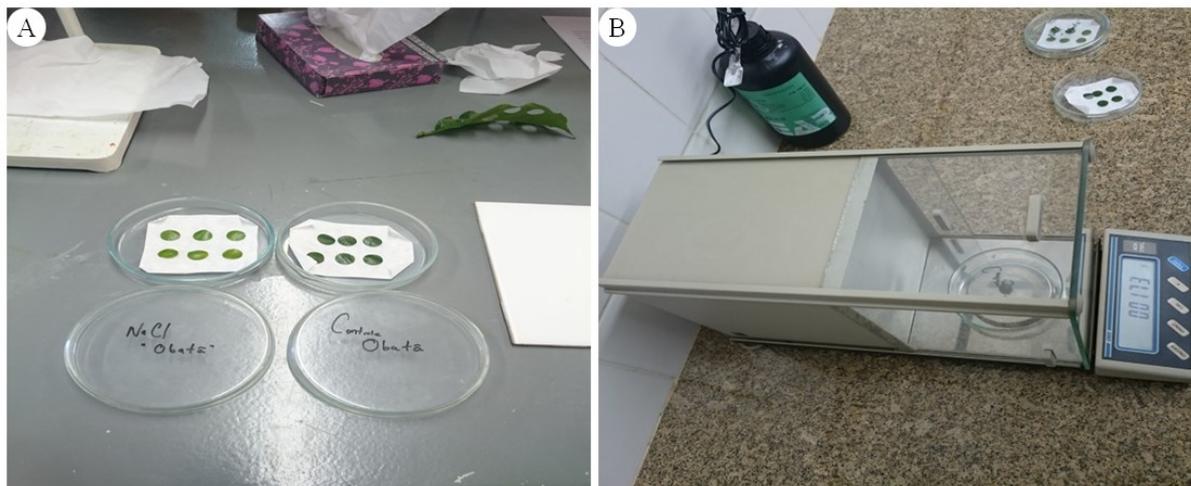


Figura 12.3. Obtenção do peso túrgido dos discos. **A-** Discos sendo secos superficialmente com papel toalha. **B-** Obtenção do peso túrgido. *Fonte:* Autores (2016).

5. Os discos permaneceram por 24 horas em estufa de secagem (**Figura 12.4**) a 80 °C para finalmente determinar a massa de matéria seca. O CRA pode ser obtido conforme a metodologia apresentada por JAMAUX *et al.* (1997): $CRA = [(wf - wd) / (wt - wd) - 1] \times 100$.

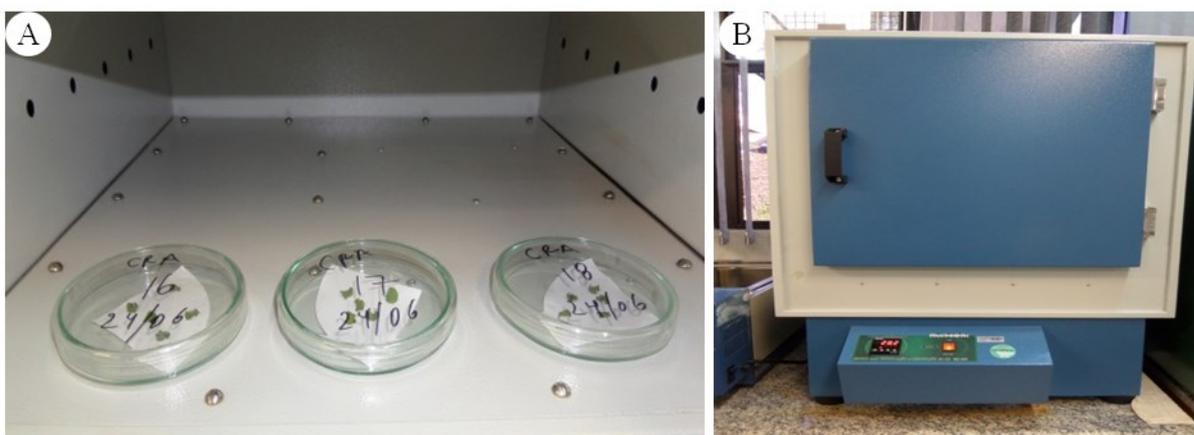


Figura 12.4. A-b- obtenção do massa de matéria seca dos *discos*. *Fonte:* Autores (2016).

4. Avaliação da Perda de Eletrólitos

Para o cálculo da perda de eletrólitos pode-se utilizar a metodologia descrita por Lafuente *et al.* (1991). Foram coletadas folhas de cafeeiro e colocadas em sacolinhas

plásticas previamente identificadas por repetições de cada um dos tratamentos (com e sem estresse salino) e levadas para o laboratório.

1. Cortaram-se 30 discos foliares de 2 mm de diâmetro e transferiram-se para um Becker com 10 mL de uma solução 0.3 M de manitol (**Figura 12.5**).



Figura 12.5. Discos imersos em solução de manitol. *Fonte:* Autores (2016).

2. Prosseguiu-se a colocar os Beckers num agitador, os quais foram mantidos sob agitação por 24 horas (**Figura 12.6**).



Figura 12.6. Beckers em agitador por um período de 24 horas. *Fonte:* Autores (2016).

3. Após o tempo de agitação (24 h), mediu-se a condutividade elétrica (CE 1) da solução (A) com auxílio de condutivímetro digital (B). (**Figura 12.7**).

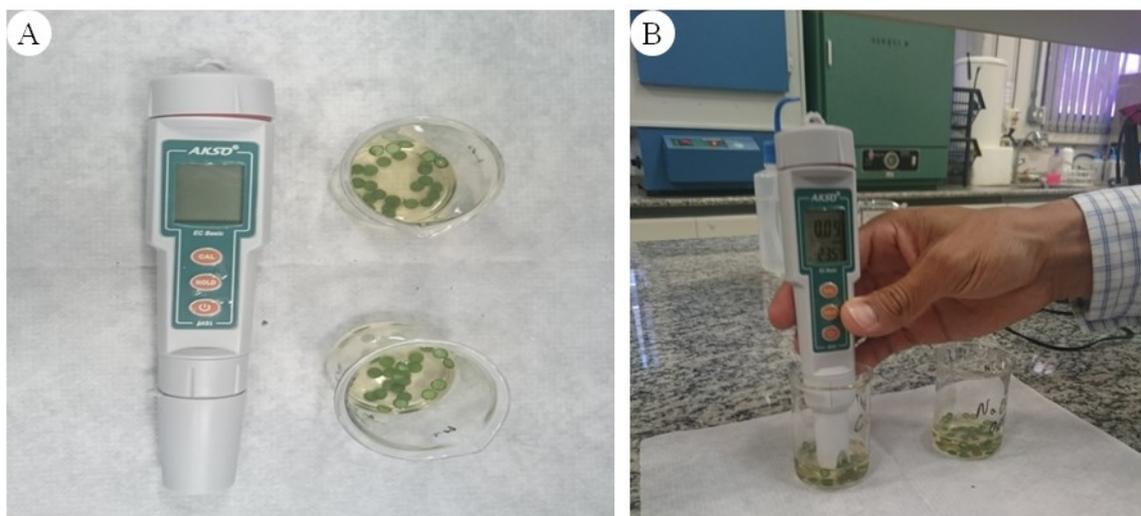


Figura 12.7. A-B- Medição da condutividade elétrica da solução. *Fonte:* Autores (2016).

4. Foram pesados os Beckers (solução de Manitol+discos) em balança digital (**Figura 12.8-A**) e em seguida a solução foi fervida por 10 minutos em placa aquecedora (**Figura 12.8-B**). Quando os Beckers estavam a temperatura ambiente foram pesados novamente, repondo com água destilada a diferença de volume evaporado.

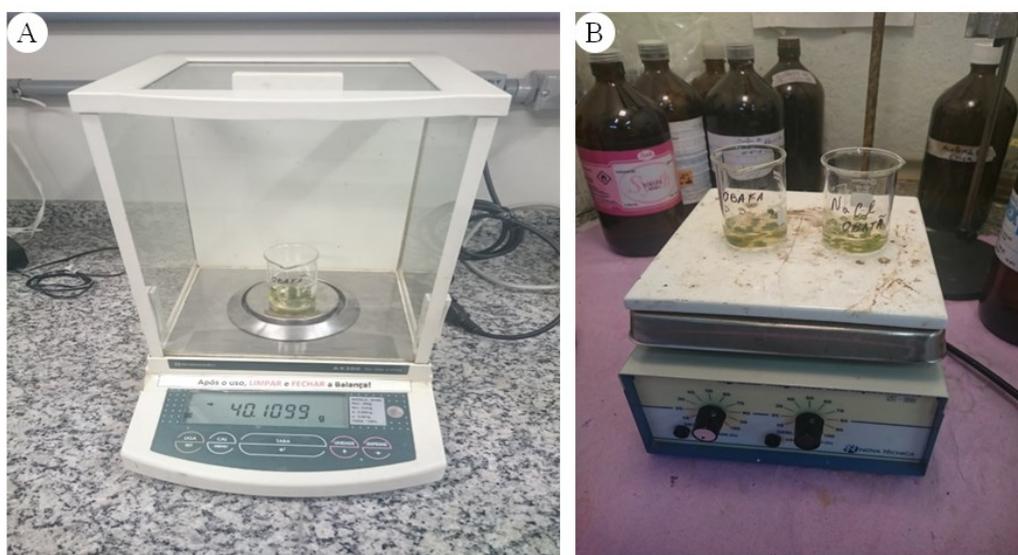


Figura 12.8. A- beckers pesados. B - aquecimento da solução. *Fonte:* Autores (2016).

5. Novamente, foram colocados sob agitação durante 30 minutos e prosseguiu-se com a nova leitura da condutividade elétrica.

A perda de eletrólitos se expressa em %, e pode ser calculada com a seguinte fórmula: $PE (\%) = (CE 1 / CE 2) \times 100$, onde PE é a perda de eletrólitos expressa em porcentagem; CE1 é a primeira leitura de eletrólitos e CE2, a segunda leitura.

5. Referências Bibliográficas

- ALBUQUERQUE, M. P. F. et al. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a déficit hídrico e reidratação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.1, p. 9-16, 2013.
- BEZERRA, B.K. L. Adubação com silício e tolerância ao déficit hídrico em cana-de-açúcar. 74f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.
- BROETTO, F. Método para extração e análise de pigmentos foliares. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.4, 2016.
- CAIRO, P.A.R. Curso básico de relações hídricas de plantas. Vitória da Conquista: UESB, p.32, 1995.
- CARVALHO, C.J.R. de. Respostas de plantas de *Schizolobium amazonicum* [*S. parahyba* var. *amazonicum*] e *Schizolobium parahyba* [*Schizolobium parahybum*] à deficiência hídrica. **Revista Árvore**, v.29, p.907-914, 2005.
- CATUCHI, T.A.; GUIDORIZZI, F.V.C.; GUIDORIZI, K.A.; BARBOSA, A.M.; SOUZA, G.M. Respostas fisiológicas de cultivares de soja à adubação potássica sob diferentes regimes hídricos. **Pesq. agropec. bras.**, v.47, n.4, p.519-527, 2012.
- CRUZ, F.J.R. Rspostas bioquímicas e fisiológicas de plantas jovens de cana-de-açúcar sob diferentes concentrações de NaCl no solo.106f. Tese (Doutorado em Agronomia / Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.
- FIGLIARELLI, S.L.; RODRIGUES, J.D.; CARNEIRO, J.P.C.; SILVA, A.A.; LIMA, M.B. Fisiologia e produção da soja tratada com cinetina e cálcio sob déficit hídrico e sombreamento. **Pesq. agropec. bras.**, v.48, n.11, p.1432-1439, 2013.
- JAMAUX, I.; STEINMETZ, A.; BELHASSEN, E. Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. **New Phytologist**, v.137, p. 117-127, 1997.
- JAMES A.T.;R.J.; COOPER M. Genotypic variation for drought stress response traits in soybean. In.Variation in soybean and wild *Glycine* spp. for epidermal conductance, osmotic potential and relative water content. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 59 p. 656 – 669, 2008.
- JONES, H.G. Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.119-130, 2007.

- LAFUENTE, M.T.; BELVER, A.; GUYE, M.G.; SALVEIT, M.E. Effect of the temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons. **Plant Physiology**, v. 95, p. 443-449, 1991.
- LAWN, R.J.; LIKOSWE, A.A. Genotypic differences in leaf area maintenance contribute to differences in recovery from water stress in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.59, p.1075-1085, 2008.
- LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. New York, Academic Press. p.698, 1972.
- MARENCO, R.A; LOPES, N.F. Filosofia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral/ Ricardo A. Marengo, Nei F. Lopes. 3 ed., atual. ampl. Viçosa, MG, Ed. UFV, 2009.
- MENDES, H.S.J. Comportamento de clones de eucalipto em resposta a disponibilidade hídrica e adubação potássica.55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.
- PIETRO, J.; MATTIUZ, B.; MATTIUZ, C. F.M.; RODRIGUES, T.J.D. Manutenção da qualidade de rosas cortadas cv. Vega em soluções conservantes. **Hortic. bras.**, v. 30, n. 1, 2012.
- QUEIROZ, C.G.S.; GARCIA, Q.S.; LEMOS FILHO, J.P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, p. 59-63, 2002.
- SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, v. 98, p. 91-97, 2006.
- SPRICIGO, P.C.; MATTIUZ, B.; PIETRO, J.; MATTIUZ, C.F.M., OLIVEIRA, M.E.M. Inibidor da ação do etileno na conservação pós-colheita de *Chrysanthemum morifolium* ramat cv. Dragon. **Ciênc. agrotec.**, v. 34, n. 5, p. 1184-1190, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5. ed. Santarém ER (Tradução). Porto Alegre, Artmed, p. 954, 2013.

CAPÍTULO 13

UTILIZAÇÃO DO IRGA - ANALISADOR DE GASES POR INFRAVERMELHO PARA AVALIAÇÃO DE TROCAS GASOSAS EM PLANTAS: *CHECK LIST* DE PREPARAÇÃO

DIOGO CAPELIN; GABRIEL SILVA DANELUZZI; RICARDO FERRAZ DE OLIVEIRA;
DAYANNE FABRÍCIO BRESSAN; CARLA VERÔNICA CORRÊA; THAIS ARRUDA COSTA
JOCA; MICHELY DA SILVA ALVES; FERNANDO BROETTO.

1. Introdução

Dada a relevância da fotossíntese como o processo natural responsável por coletar a energia solar e transformá-la em energia química disponível para os demais organismos vivos, ela pode ser considerada um dos processos mais importantes e significativos para a manutenção da vida no planeta (PAVLOVIC, 2012).

As limitações à fotossíntese podem ser desencadeadas por diversos processos, como problemas difusivos, que englobam o grau de abertura dos estômatos, e a condutância mesofílica, que regulam a disponibilidade de CO₂ para a enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco). Podem também ser desencadeadas por processos fotoquímicos que incluem a captação luminosa, e bioquímicos, que estão relacionados a outras enzimas do ciclo de Calvin (SHARKEY *et al.*, 2007).

Técnicas que avaliam simultaneamente as trocas de gases realizadas entre as plantas e a atmosfera e a fluorescência da clorofila são um meio para determinar tais limitações (LONG; BERNACCHI, 2003).

Além disso, a medida das trocas gasosas é uma ferramenta importante para a verificação do estado fisiológico das plantas. Assim, plantas submetidas a qualquer tipo de estresse apresentam taxa de assimilação de CO₂ (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), entre outras variáveis, diferentes de plantas em condições não estressantes.

Os equipamentos disponíveis no mercado para análises de trocas gasosas em plantas são sistemas abertos, portáteis e com opção para controle de umidade, temperatura, luz, e CO₂, entre eles LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, EUA), GFS-3000 (WALZ, Effeltrich, Alemanha), LCpro-SD e LCi-SD (ADC Bioscientific, Hoddesdon, Inglaterra) e CIRAS-3 (PP Systems, Amesbury, EUA). De modo geral eles são referidos como analisadores de gases por infravermelho ou IRGA (*Infrared gas analyzer*).

Além das avaliações descritas acima, os analisadores podem de CO₂ realizar leituras relacionadas a fluorescência da clorofila que fornecem informações acerca do estado do fotossistema II (FSII), ou seja, o quanto ele está usando da energia absorvida pelas clorofilas, ou em que extensão ele está sendo danificado por um eventual excesso de luz. O fluxo de elétrons através do FSII é um indicativo, em muitos casos, do desempenho fotossintético da planta (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

A partir das técnicas utilizadas para a avaliação da fluorescência da clorofila obtêm-se as variáveis: fluorescência mínima da clorofila (F_o), fluorescência máxima da clorofila (F_m), fluorescência em amostra adaptada à luz (F_s) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir delas outras são calculadas: fluorescência variável (F_v), o máximo rendimento quântico do FS II (F_v/F_m), o rendimento quântico efetivo do FSII ($\Delta F/F_m'$), dissipação fotoquímica (q_p), dissipação não fotoquímica (NPQ), a taxa de transporte de elétrons (ETR), entre outras variáveis (MAXWELL; JOHNSON, 2000; ROHACEK, 2002).

De modo geral, os módulos que constituem os analisadores são: console, câmara de medidas, cabos, tubos de químicos e baterias recarregáveis. Para avaliações corretas e confiáveis, é indispensável uma checagem de componentes, parâmetros e da funcionalidade dos sensores antes do início das medições. Para tanto está descrito abaixo um passo-a-passo de instruções baseado no manual do analisador, modelo LI-6400XT, fabricado pela LI-COR Inc.

2. Check List de Preparação do IRGA (MODELO LI-6400XT – VERSÃO 6.3.2, Li-COR)

Antes de ligar o equipamento, a primeira etapa consiste na verificação visual dos químicos, encontrados na parte externa no aparelho. A soda calcária (*Soda lime*) responsável por remover o CO₂, deve estar na cor branca, e o dessecante (*Drierite*) estar na cor azul quando seco. Caso o dessecante esteja rosa (quando úmido) é recomendado fazer a secagem do mesmo, pois neste caso, está impróprio para uso. É importante ressaltar que a *soda lime* tem maior durabilidade que o *drierite*.

Em seguida é necessário fazer a checagem das conexões, conectando o console a câmara de medidas bem como as mangueiras da amostra e da referência.

Em relação às baterias, é importante usar as duas carregadas, com autonomia de aproximadamente 2 horas, dependendo do uso. Sempre monitorar sua voltagem e nunca deixar que a voltagem atinja valores inferiores a 11 volts, pois há risco do aparelho desligar (na configuração padrão esta informação pode ser verificada na linha “i” do *display*). Além disso, é crucial que as baterias sejam mantidas carregadas, prontas para reposição, recarregando-as imediatamente após o uso. Não é recomendado armazenar baterias descarregadas.

Após seguir todas essas etapas, ligue o aparelho, e, na primeira tela “Select a new configuration”, escolha a configuração desejada. Aparecerá a seguinte pergunta: “Is the chambre/IRGA connected?” Aperte Y, caso a câmara esteja efetivamente conectada. Uma vez que o sistema esteja carregado, e enquanto os analisadores de gases estão se aquecendo, deve-se realizar as seguintes verificações no menu *New Msmnts* (Novas Medidas):

I. Forma de fornecimento de ar - Cartucho (CO₂ controlado) ou *buffer*? Se for usar o sistema injetor de CO₂, é necessário instalar um novo cartucho, assim o sistema irá começar a pressurização. Caso contrário, preparar um *buffer* (recipiente de volume entre 3 a 5L por onde o ar externo passa antes de entrar no aparelho a fim de amortizar variações de CO₂ e vapor d’água).

II. Verificação dos sensores quânticos: Os valores relacionados à luz (ParIn_μm e ParOut_μm) estão ambos na linha “g”. É necessário verificar se eles respondem como

esperado quando os sensores de luz são iluminados e sombreados. Para isso, use valores de $PAR = 0$ e $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

III. Verificação do sensor de pressão: A medição de pressão (Prss_Kpa) é mostrada na linha “g”. Verificar se ele mostra valores razoáveis e estáveis, sendo o valor típico de 100 KPa ao nível do mar.

IV. Verificação da ventoinha (*Leaf fan*): Para este procedimento, desligue e ligue a ventoinha (Menu *New Msmnts*, nível 2, f1) e escute o som quando o motor do ventilador é desligado e ligado. Eventualmente, se não houver emissão de nenhum som quando deveria existir som poderá significar um fusível queimado, ventoinha travada por detritos ou outros problemas. Deixe a ventoinha ligada quando terminar. Geralmente utiliza-se a velocidade 5 (*Fast*).

Após o analisador estarm ligado por 10 minutos, continue com os seguintes passos:

I. Checagem do fluxo: Ainda no nível 2 do Menu *New Msmnts*, aperte f2 (*Flow*), selecione *Target*, fixe o fluxo para $1000 \mu\text{mol s}^{-1}$, pressione *Enter*, pressione *Keep*. Observe Flow_μml (linha b). O valor deverá estar em torno de 700 se o cartucho de CO_2 estiver instalado, ou maior se estiver utilizando o *buffer*. Teste se os tubos dos químicos estão causando restrições de fluxo, alterando cada um deles de *full bypass* para *full scrub* (posição máxima na direção *scrub* do parafuso de ajuste), observando o efeito sobre a taxa de fluxo. Normalmente, *scrubbing* vai promover uma queda no fluxo de no máximo 5 a $10 \mu\text{mol s}^{-1}$ por tubo. Quedas maiores podem indicar que os dutos de ar nos tubos dos químicos estão ficando entupidos ou que os tubos de desvio de fluxo estão comprimidos.

Checar o fluxo zero: Ainda no nível 2 do Menu *New Msmnts*, desligue a bomba, apertando f2 (*Flow*), selecionando *Control*, selecionando OFF, pressionando *Enter* e por último, pressionando *Keep*.

Observação¹: Se o *injetor de CO₂* estiver ligado ele será desligado. Aparecerá a mensagem: “*The pump is off*”. Desligue também a ventoinha (*leaf fan*). O fluxo deverá cair para valores entre 0 e $2 \mu\text{mol s}^{-1}$. Religue a ventoinha quando terminar.

II. Ajuste da maçaneta: Com a câmara fotossintética fechada e sem folha, gire a maçaneta até que esta comece a tornar-se justa/apertada. Abra a câmara e vire a maçaneta mais uma meia-volta. Feche a câmara para os próximos passos.

III. Verificação de vazamentos: Selecione o nível 2, aperte f2 (*Flow*). Em *Target*, ajuste o fluxo para $200 \mu\text{mol s}^{-1}$. *Enter. Keep*. Com a câmara fechada e sem folha, assopre próximo a ela. Se estiver devidamente selada, o $\text{CO}_2\text{S}_{\mu\text{ml}}$ não deve variar mais que $1 \mu\text{mol}$. Ajuste o fluxo para $500 \mu\text{mol s}^{-1}$.

IV. Verificação da qualidade dos químicos:

a) *Soda lime* (soda calcária): Com o injetor em OFF (*mixer* - nível 2, f3), observe os valores de $\text{CO}_2\text{R}_{\mu\text{ml}}$ e $\text{CO}_2\text{S}_{\mu\text{ml}}$ na linha “a”. Gire o parafuso de controle da *soda lime* para a posição máxima na direção *scrub* (*full scrub*) e do *drierite* para posição máxima na direção *bypass* (*full bypass*). O valor de $\text{CO}_2\text{R}_{\mu\text{ml}}$ deve rapidamente se aproximar de zero, enquanto $\text{CO}_2\text{S}_{\mu\text{ml}}$ se aproxima de zero um pouco mais lentamente. Se eles estiverem dentro de 0 a $5 \mu\text{mol mol}^{-1}$, a *soda lime* estará adequada para uso. Se, a princípio, $\text{CO}_2\text{R}_{\mu\text{ml}}$ não atingir zero, aguarde ± 10 min e, caso a *soda lime* efetivamente não esteja removendo o CO_2 , pode-se adicionar algumas gotas de água diretamente sobre o químico (1 a 2 mL) para regenerá-lo, desta forma, é possível aumentar sua vida útil.

b) *Drierite*: Observe os valores de $\text{H}_2\text{OR}_{\text{mml}}$ e $\text{H}_2\text{OS}_{\text{mml}}$. Ajuste o parafuso de controle do *drierite* para posição máxima na direção *scrub* (*full scrub*). $\text{H}_2\text{OR}_{\text{mml}}$ deve aproximar-se do zero mais rapidamente que $\text{H}_2\text{OS}_{\text{mml}}$. Se ambos estiverem na faixa de $0,2$ a $0,3 \text{ mmol mol}^{-1}$, o *drierite* está em condições de uso. Espere de 10 a 20 minutos, caso necessário. Após o teste, retornar o botão do dessecante para a posição *bypass*.

V. Verificação do sensor de temperatura da folha: Selecionar a linha “h”. Desconecte o conector do termopar da temperatura da folha (*plug* de cor roxa) e compare a temperatura da folha ($\text{Tleaf } ^\circ\text{C}$) com a do bloco ($\text{Tblock } ^\circ\text{C}$). A diferença entre elas não deve ser superior a $0,1^\circ\text{C}$. Reconecte o termopar, abra a câmara e verifique se “ $\text{Tleaf } ^\circ\text{C}$ ” responde quando o termopar é aquecido quando tocado.

Observação²: Calibração do sensor de temperatura da folha: Se a diferença entre a temperatura da folha e do bloco for superior a 0,1°C há necessidade de calibração. Para calibrar, gire o parafuso localizado na superfície inferior do sensor de medidas (*sensor head*) e acompanhe as leituras de Tleaf °C e Tblock °C na linha “h”, até que a diferença entre elas seja inferior a 0,1°C. Para esta calibração o equipamento deve estar ligado a aproximadamente 30 minutos.

VI. Calibração do injetor de CO₂ (*mixer*) (opcional): No Menu de Calibração (*Calib. Menu*), em *CO₂ mixer* selecione *Calibrate*. Certifique-se de que a *soda lime* esteja em *full scrub*. Clique em “Y” para continuar. Aguarde. Aparecerá um gráfico. Se este for linear crescente, está correto. Aperte “Esc” para continuar.

VII. Calibração da fonte de luz (opcional): No Menu de Calibração (*Calib. Menu*), em *LED Source* (se estiver usando a câmara 6400-02B LED Light Source) ou *LCF Source* (se estiver usando a 6400-40 Leaf Chamber Fluorometer) selecione *Calibrate*. Aperte “Enter” para continuar. Aguarde. Aparecerá uma tabela e a pergunta “Plot this?” Aperte “Y”. Será exibido um gráfico referente aos LEDs vermelhos. Se for uma linha diagonal crescente está correto. Aperte “ESC”. Será exibido um gráfico referente aos LEDs azuis. Gráfico linear e crescente está correto. Aperte “ESC”. “Implement this cal?” Se os gráficos estiverem corretos, aperte “Y”.

VIII. Ajuste da razão estomática: Selecione o nível 3 e aperte f2 (StmRat). Atribua o valor zero para folhas hipoestomáticas ou epiestomáticas; 0,5 quando não souber a distribuição de estômatos e o valor 1,0 para folhas anfiestomáticas.

IX. Ajuste da área foliar: Ainda no nível 3 aperte f1 (Area). Se a folha a ser medida ocupar toda a extensão da câmara fotossintética, o valor da área deve ser igual a 6 cm², caso esteja usando a câmara 2x3 cm. Se estiver usando a LCF (*Leaf Chamber Fluorometer*) a área é de 2 cm². Caso a folha não ocupe a totalidade da área da câmara, o valor correto da área da folha deve ser informado.

X. Ajuste do fluxo: Para espécies C₄, fixe o fluxo em 500 μmol s⁻¹ e para C₃, 350 μmol s⁻¹, embora isso não seja uma regra exata. Caso se queira aumentar a umidade relativa da câmara (RH_S %), diminua o fluxo e vice-versa. A faixa de umidade ideal é entre 50 e 60%. Caso esteja utilizando o *buffer*, é possível colocar um pouco de água no fundo do galão a fim de aumentar a umidade.

XI. Ajuste da quantidade de luz: Selecione o nível 2 e aperte f5 (Lamp OFF). Selecione PAR. Selecione *Target* e aperte *Enter*. Coloque o valor desejado. *Enter. Keep*.

XII. Ajuste do *mixer* (Injetor de CO₂): Selecione o nível 2 e aperte f3 (Mixer OFF). Em *Reference CO₂*, clique em *Target* e atribua o valor desejado. Geralmente, dependendo dos objetivos do estudo, valores próximos a concentração atmosférica de CO₂ são utilizados (380 a 400 μmol mol⁻¹). Aguarde até que o valor desejado seja alcançado antes de seguir para próxima etapa.

XIII. Igualando os IRGAs: Com a câmara fotossintética fechada e sem folha, entre no nível 1 do menu *New Msmnts* e aperte f5 (*Match*). Na tela “IRGA Match Mode” aperte f5 (MATCH IRGAs). Após dez segundos a linha “a” irá mostrar valores iguais para [CO₂_R e CO₂_S] e [H₂O_R e H₂O_S]. Aperte f1 (*exit*).

Observação ³ : O IRGA da amostra se iguala ao da referência.

Observação ⁴ : É recomendando fazer o <i>match</i> no início das medições, a cada troca de folha ou periodicamente se estiver no modo <i>autolog</i> .

Antes de iniciar os registros pressione Open LogFile (f1). Digite o nome do arquivo. *Select*. Na tela “Enter/Edit Remarks”, coloque a observação desejada (opcional) pressione *Enter*. A partir daí a tecla f1 muda para LOG 0, estando habilitada para o registro dos dados. Para fazer o registro, pressione f1 (LOG) ou o botão preto posicionado no lado esquerdo da câmara de medidas. Um *beep* será ouvido quando o registro for realizado. Ao final das leituras pressione Close File (f3) para fechar o arquivo.

Para desligar o equipamento, volte ao menu inicial (OPEN), aperte f1 (Home Menu), selecione a opção *Quit Open* e aperte “Y”. Após este procedimento o equipamento pode ser desligado no botão *on/off* localizado na lateral direita do console. Após desligar o equipamento, é necessário ajustar o parafuso (*knob*) da *soda lime* e do *drierite* para o meio termo entre *full scrub* e *full bypass* para não comprimir e deformar as mangueiras dos tubos dos químicos. Também é aconselhado guardar o aparelho com a câmara fechada, porém com a maçaneta girada ao ponto que não gere compressão sobre as borrachas de vedação da câmara.

3. Referências Bibliográficas

- LI-COR. Using the LI-6400/6400XT: Portable Photosynthesis System. Version 6, 2012.
- LONG, S.P.; BERNACCHI, C.J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2393–2401, 2003.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- PAVLOVIČ, A. The Effect of Electrical Signals on Photosynthesis and Respiration. In: VOLKOV, A. G. (Ed.). *Plant Electrophysiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 33–62, 2012.
- ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationship. **Photosynthetica**, v.40, n.1, p.13-29, 2002.
- SHARKEY, T.D. et al. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 9, p. 1035–1040, 2007.