

## **ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS E ELETROFORESE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM FOLHAS E RAÍZES DE PLANTAS DE MILHO E CAPIM-MARMELADA SOB A AÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE MUCUNA E DO L-DOPA**

Bruno Ribeiro Gomes (PIBIC/Fundação Araucária), Wanderley Dantas dos Santos (Orientador) e-mail: wanderley.dantasdosantos@gmail.com

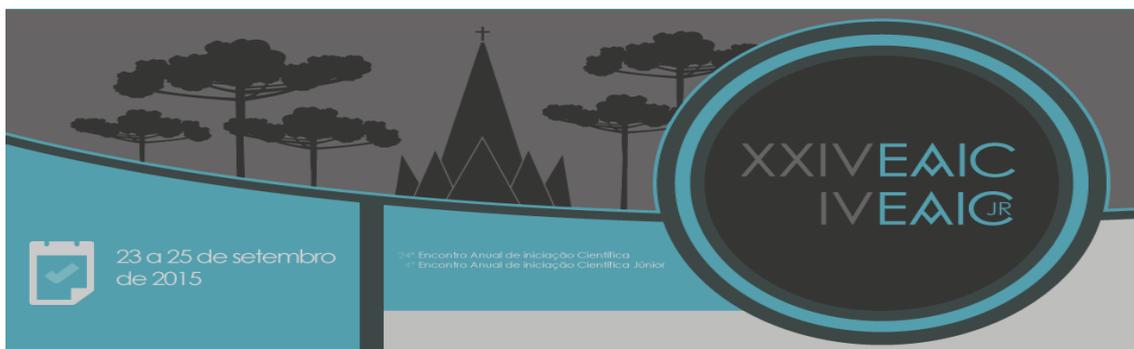
Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Bioquímica/Maringá, PR.

### **Botânica e Fisiologia vegetal**

**Palavras-chave:** L-DOPA, Eletroforese, Mucuna.

### **Resumo:**

*Mucuna pruriens*, conhecida como mucuna preta, é um exemplo de planta de cobertura do solo bem-sucedida. É uma leguminosa muito cultivada como adubação verde, por ser boa fixadora de nitrogênio e rica em nutrientes. Tem sido relatado que vários agentes químicos secundários são produzidos pelas sementes, folhas e raízes de mucuna. O principal composto fitotóxico encontrado é o L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA). Este composto é liberado da mucuna, e em diversas outras espécies, para o solo e inibe o crescimento de plantas vizinhas, mas o conhecimento sobre o mecanismo de ação do L-DOPA é escasso. Nas plantas, L-DOPA está associado à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet}$  e  $^{\bullet}OH$ . Sendo assim, o presente projeto propõe avaliar através de eletroforese, a atividade de enzimas envolvidas na eliminação de ROS, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase solúvel (POD), bem como realizar análises morfo-anatômicas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV), em folhas de plantas de milho e capim-marmelada, tratadas com extrato de mucuna e L-DOPA sintético. A avaliação dos parâmetros propostos podem contribuir para diagnosticar a interação alelopática entre estas espécies e compreender a bioquímica envolvida nesta interação.



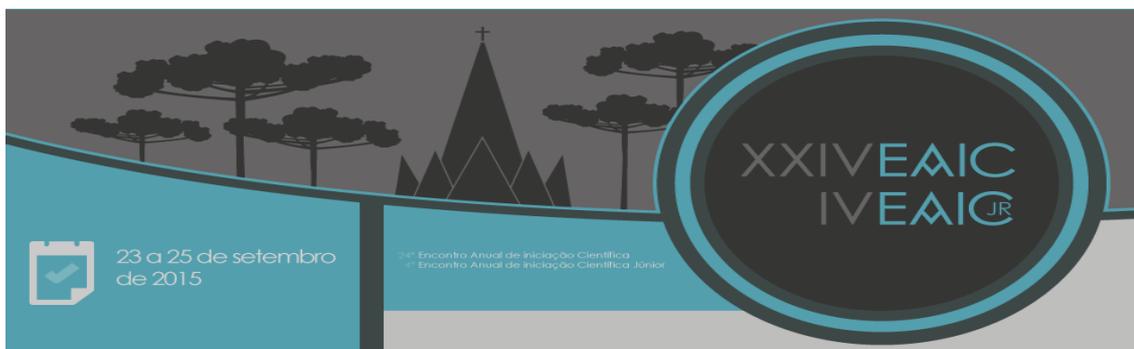
## Introdução

*Mucuna pruriens* é uma leguminosa muito utilizada em consórcio com o milho, sorgo e milheto, podendo proporcionar benefícios como a fixação de nitrogênio, redução da infestação de pragas e plantas infestantes, entre outros. Entretanto, pode ocorrer efeitos negativos no desenvolvimento das plantas consorciadas devido a interações alelopáticas. A mucuna contém em suas folhas, sementes e raízes grandes quantidades de L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina). Capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*) é uma invasora conhecida por causar prejuízos à produtividade e à qualidade de grãos, sendo uma das espécies de daninhas de maior ocorrência na região Sul do Brasil (Fleck, 1996). Muitos dos processos deletérios sofridos pela interação de plantas com aleloquímicos, é mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) como o  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet}$  e  $\bullet OH$ , geradas pelo mal funcionamento das vias metabólicas. Normalmente, as enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD, podem eliminar estes compostos sem dificuldades. Todavia, quando este sistema de defesa falha, se estabelece o estresse oxidativo. L-DOPA está envolvido na produção de ROS a partir de sua auto-oxidação, ou oxidação auxiliado por algumas enzimas.

## Materiais e métodos

**Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE):** Folhas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo EDTA, ditioneitol e PVP. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante armazenado a  $-80^{\circ}C$ , até a análise em gel de poliacrilamida. Para a determinação da POD, os géis foram incubados em tampão de fosfato (pH 7,5) e guaiacol, e posteriormente adicionado  $H_2O_2$  (10 mM) deixando na solução até o aparecimento de bandas. Para a SOD, os géis foram incubados em tampão fosfato de potássio (pH 7,8), com EDTA, nitroazul de tetrazólio (NBT) e riboflavina. A mistura de reação foi mantida sob iluminação, por 30 minutos (Beauchamp and Fridovich, 1971). Para a CAT, os géis foram incubados com  $H_2O_2$  e, em seguida, colocados em uma solução de  $FeCl_3$  e  $K_3Fe(CN)_6$  como solução reveladora. A dosagem de proteínas foi realizada conforme o método de BRADFORD (1976) e obtidas em mg% da amostra.

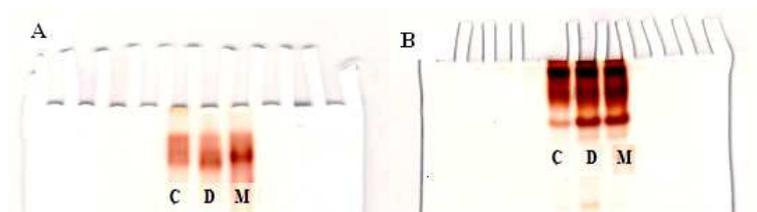
**Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET):** Para as análises em MEV, pequenas secções de folhas foram fixadas em glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio. Em seguida, as amostras foram desidratadas com etanol e secadas ao ponto crítico, tendo como meio de desidratação o  $CO_2$ . Posteriormente, foi realizada a metalização com ouro e as análises efetuadas ao microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu



SS550). O processo que compreende a execução da microscopia eletrônica de transmissão (MET) será executada em breve.

## Resultados e Discussão

O gel de eletroforese da POD apresentou bandas mais intensamente coradas nos tratamentos com L-DOPA e extrato de folhas de mucuna. Este efeito foi observado também na análise da atividade da POD solúvel por espectrofotometria, realizada em trabalhos anteriores. Estes resultados confirmam a ativação da POD do milho e capim-marmelada tratadas com L-DOPA e mucuna. Os tratamentos, entretanto, ativaram isoperoxidasas distintas no milho (Fig. 1 A) sugerindo que outros componentes podem ter papel importante no estresse oxidativo da planta. Por outro lado, os padrões de ativação das isoperoxidasas de plantas de capim-marmelada tratadas com L-DOPA e extrato de mucuna foram bastante similares. A eletroforese das enzimas CAT e SOD estão em andamento.

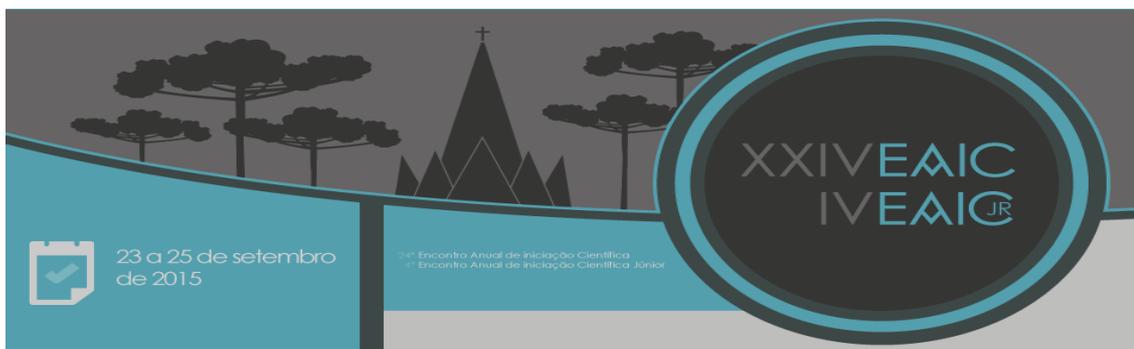


**Figura 1** – Gel de eletroforese de POD de milho (Fig. A) e capim-marmelada (Fig. B). Controle (C), mucuna (M) e L-DOPA (D).

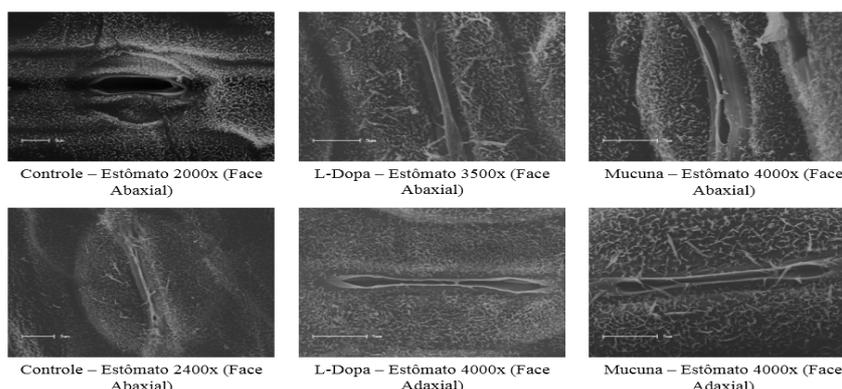
As imagens obtidas por MEV (Fig. 2 e 3) evidenciam estômatos presentes nas faces abaxial (inferior) e adaxial (superior) da folha. Estas imagens (e outras omitidas aqui) evidenciam ostíolos abertos na face abaxial de ambos os controles (milho e capim-marmelada), porém, fechados nos tratamentos com L-DOPA e extratos de folhas de mucuna. Esses resultados estão em acordo com a redução na taxa de fixação de  $\text{CO}_2$  e na condutância estomática em plantas tratadas com L-DOPA e extrato de mucuna, observadas em experimentos anteriores. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) está em andamento.

## Conclusões

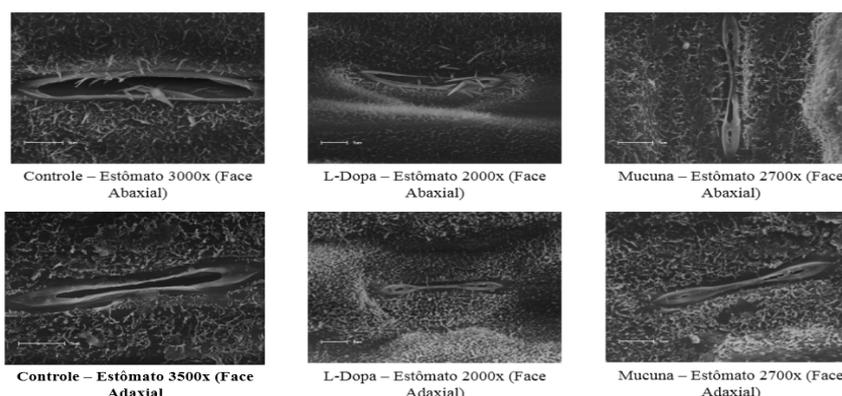
Até o presente, conclui-se que o gel de eletroforese da enzima POD apresentou maior atividade nos tratamentos com L-DOPA e mucuna, em relação aos controles. Os géis da SOD e CAT estão em andamento e serão incluídos ao relatório final do PIBIC. O fechamento dos ostíolos observado



nas microscopias obtidas por MEV, corroboram com os resultados evidenciados através da análise de parâmetros fotossintéticos.



**Figura 1** – Micrografias obtidas por MEV mostrando estômatos típicos em folhas de capim-marmelada tratadas ou não com L-DOPA e extrato de mucuna. Barras 5µm.



**Figura 2** – Micrografias obtidas por MEV mostrando estômatos típicos em folhas de milho em plantas tratadas ou não com L-DOPA e extrato de mucuna. Barras 5 µm.

## Agradecimentos

Ao CNPq, CAPES e à Fundação Araucária do Estado do Paraná

## Referências

FLECK, N. G. Interferência de papuã (*Brachiaria plantaginea*) com soja e ganho de produtividade obtido através do seu controle. **Pesq. Agropec. Gaúcha**, v. 2, n. 1, p. 63-68, 1996.

BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v.44, 276-87, 1971.