



CONTEÚDO DE NITROGÊNIO, PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E HIDROXICINAMATOS ESTRUTURAIS EM *Mucuna pruriens*, *Pennisetum glaucum* E *Avena stringosa*

Ailson Francisco dos Santos Lima (PIBIC/FA/UEM), Gabriela Ellen Barreto (Co-autora), Wanderley Dantas dos Santos (Orientador), e-mail: limaailson@hotmail.com, gabiellen1@hotmail.com, wdsantos@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/
Departamento de Bioquímica/ Maringá, PR.

Colégio de Ciências da Vida/ Ciências Biológicas/ Ciências Biológicas I

Palavras-chave: Eficiência no uso de nitrogênio fotossintético; Proteínas estruturais de parede celular; Ácidos hidroxicinâmicos;

Resumo

Em um estudo recente nosso grupo verificou que gramíneas C₃ podem apresentar EUNf similares às gramíneas C₄ levantando a hipótese de que a maior EUNf das gramíneas pode estar relacionado com o menor conteúdo de proteínas estruturais observado nas paredes celulares deste grupo de plantas. Nestas paredes, a principal hemicelulose é o glucuronoarabinoxilano ramificado com ácido ferúlico (AF-GAX). Esta hemicelulose desempenha um papel semelhante ao papel atribuído às expansinas, proteínas estruturais cujo conteúdo é reduzido nas paredes das gramíneas. Associado à maior EUNf das gramíneas, este fato sugere que pode ter havido uma transferência de função das expansinas para os AF-GAX com consequente redução na demanda por N, nestas plantas. Neste projeto, avaliamos o conteúdo de nitrogênio total, proteínas e hidroxicinamatos estruturais em três plantas contrastantes para o metabolismo e o tipo de parede celular (*Mucuna pruriens*, *Pennisetum glaucum* e *Avena stringosa*). Os conteúdos de ácidos hidroxicinâmicos esterificados foram maiores em *P. glaucum* e *A. stringosa* conforme esperado, visto que estas plantas exibem paredes (PC) tipo II. Entretanto, embora o conteúdo proteico da parede celular tenha sido maior em *M. pruriens* (PC tipo I) que em *A. stringosa* (PC tipo II), corroborando nossa hipótese, o conteúdo de proteínas estruturais em *P. glaucum* (PC tipo II) foi ainda maior que em *M. pruriens*, o que contraria a hipótese de trabalho.





Introdução

O nitrogênio é um nutriente fundamental para todos os seres vivos. Para as plantas ele é importante na fotossíntese, sendo especialmente abundante nas folhas devido à alta concentração da rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase), fotossistemas, enzimas do ciclo de Calvin e das clorofilas. A eficiência no uso do nitrogênio (EUN) é uma medida que reflete a dependência do N para a produção vegetal. Uma forma útil é obtida medindo-se a quantidade de nitrogênio que a folha requer para manter sua taxa fotossintética. Esta medida chamada de eficiência no uso do nitrogênio fotossintético instantâneo (EUNf) é obtida dividindo a taxa de assimilação de carbono por área foliar pela quantidade de nitrogênio total na mesma área foliar (EVANS, 1989).

Em geral, as gramíneas cultivadas apresentam maior EUNf quando comparadas às eudicotiledôneas. Este fenômeno é atribuído ao metabolismo fotossintético C4 comum nas gramíneas que concede uma maior eficiência fotossintética a estas plantas. No entanto, gramíneas C3 também apresentam alta EUNf (BARRETO, 2015) o que não pode ser explicado pela teoria vigente. Neste sentido, a parede celular das gramíneas é conhecida por apresentar alto conteúdo de ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico e baixas quantidades de proteínas estruturais. Assim, visando contribuir com a compreensão da contribuição dos componentes da parede celular para EUNf, caracterizamos o conteúdo de proteínas estruturais, ácidos hidróxicinâmicos e nitrogênio total em raízes e folhas de *Mucuna pruriens* (eudicotiledônea, metabolismo C₃ e PCI), *Pennisetum glaucum* (gramínea, metabolismo C₄ e PCII) e *Avena stringosa* (gramínea, metabolismo C₃, PCII).

Materiais e métodos

Cultivo das plantas estudadas

As plantas de *M. pruriens*, *P. glaucum* e *A. stringosa* foram cultivadas em sala de cultivo a 25 °C, durante 20 dias. A área foliar foi determinada dividindo-se a área das folhas frescas pela massa das folhas secas (g m⁻²) e a determinação do conteúdo de N foliar pelo método de Kjeldahl (g N Kg⁻¹). As proteínas solúveis foram extraídas a partir de 0,4 g de biomassa fresca de folhas e raízes que foram congeladas em freezer (-80 °C) por 24 h. As alíquotas foram trituradas com 20 mg de PVP em uma solução de 30 mL de NaCl 50 mmol L⁻¹, ácido ascórbico 30 mmol L⁻¹ e AcNa 50 mmol L⁻¹. As amostras foram centrifugadas e ressuspensas sucessivamente com tampão AcNa 50 mM pH 5,5; NaCl 0,1 M em AcNa 50 mM pH 5,5; água deionizada; acetona PA; água; AcNa 10 mM pH 5,5. Para a extração das





proteínas estruturais as amostras foram incubadas sucessivamente com uma solução de CaCl_2 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em AcNa 50 mmol L^{-1} pH 5,5 em câmara fria por 12 h, 24 h, 48 h e 72 h, lendo-se as absorvâncias pelo método de Bradford. Ao final de cada tempo de incubação e descartando-se os meios de extração. Os resultados foram somados e expressos em mg de proteína por g de biomassa fresca (mg g^{-1}).

Quantificação de ácidos hidroxicinâmicos esterificados à parede celular

Pesou-se 0,1 g de biomassa seca pulverizada, suspendeu-se a amostra com solução de metanol 50% em tubo de centrifuga, incubou-se à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 90 min, resfriou-se, centrifugou-se rejeitando o sobrenadante e secou-se em estufa à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, após, a biomassa seca das amostras foram ressuspendidas em 5mL de solução de NaOH à $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e incubadas à $96 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h, após, foram resfriadas, acidificadas à pH 2, centrifugadas e o sobrenadante transferido para funis sendo realizada uma separação em fase etérea 1:1, a qual foi rotaevaporada para a concentração dos compostos de interesse, os quais ficaram por uma noite em capela para secagem gradual. No outro dia realizou-se a quantificação dos compostos por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados foram expressos em mg de ácidos hidroxicinâmicos por grama de biomassa seca (mg g^{-1}).

Resultados e Discussão

A Tabela I apresenta os conteúdos de N foliar. Note que o conteúdo de N total foi maior em *A. stringosa*, seguida por *M. pruriens* e *P. glaucum*.

Tabela I - Conteúdo de N foliar (g Kg^{-1}) ($\pm\text{EPM}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Newman-Keus ($P < 0,05$).

	<i>A. stringosa</i>	<i>M. pruriens</i>	<i>P. glaucum</i>
Nitrogênio total	$53,05 \pm 0,29\text{a}$	$49,05 \pm 1,23\text{b}$	$46,38 \pm 0,35\text{c}$

Os conteúdos de ácido ferúlico e *p*-cumárico foram menores em *M. pruriens* que em *P. glaucum* e *A. stringosa* (Tabela II). Nas eudicotiledôneas o ácido ferúlico desempenha um papel estrutural menor que nas gramíneas. Os resultados são os esperados para as características de parede celular das plantas estudadas.

P. glaucum e *M. pruriens* apresentaram conteúdos similares de proteínas estruturais, enquanto *A. stringosa* apresentou menor valor médio nas folhas (Tabela III).





Tabela II - Ácidos hidroxicinâmicos esterificados à parede celular (mg g^{-1}) (\pm EPM).

		<i>A. stringosa</i>	<i>M. pruriens</i>	<i>P. glaucum</i>
Ác. Ferúlico	Folha	0,8500 \pm 0,0225	0,0112 \pm 0,0008	0,9153 \pm 0,0449
	Raiz	1,7020 \pm 0,0563	0,0309 \pm 0,0014	1,0811 \pm 0,1590
Ác. p-Cumárico	Folha	0,1004 \pm 0,0030	0,0189 \pm 0,0015	0,2612 \pm 0,0187
	Raiz	0,8140 \pm 0,0115	0,0034 \pm 0,0002	1,3036 \pm 0,1732

Este resultado não corrobora a informação disponível na literatura de que as gramíneas apresentam menor conteúdo de proteínas estruturais (McCANN, CARPITA, 2008).

Tabela III - Proteínas estruturais de parede celular ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) (\pm EPM)

	<i>A. stringosa</i>	<i>M. pruriens</i>	<i>P. glaucum</i>
Folha	4,52 \pm 0,10	5,00 \pm 0,12	5,13 \pm 0,18
Raiz	0,98 \pm 0,09	0,27 \pm 0,03	2,04 \pm 0,10

Conclusões

Os conteúdos de ácidos hidroxicinâmicos foram maiores nas gramíneas comelinoides quando comparados com a eudicotiledônea avaliada. Os conteúdos de proteínas estruturais de *P. glaucum*, uma comelinoide, foi similar ao observado em *M. pruriens*, uma eudicotiledônea contrariando a hipótese de que há um conteúdo menor de proteínas estruturais da parede celular em gramíneas e, portanto, a hipótese testada neste trabalho.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária pelo apoio financeiro e a toda a equipe do Bioplan pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos.

Referências

BARRETO, G. E. **Impacto das proteínas estruturais da parede celular na eficiência do uso do nitrogênio**, Dissertação de mestrado (área de concentração em Biologia Celular e Molecular) 55 páginas, Universidade Estadual de Maringá, 2015.

McCANN, M. C.; CARPITA, N. C. Designing the deconstruction of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 11, p. 314-320, 2008.

EVANS, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C_3 plants. **Oecologia**. v. 78, p. 9-19, 1989.

