

OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE DA ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO EM FOLHAS DE *PHYSALIS ANGULATA* L.

Francisco dos Santos Neto¹; Marilza Neves do Nascimento²; Tamara Torres Tanan³

1. Graduando em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: franciscosantosn@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marilzaagro@hotmail.com

3. Co-orientador, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tamara.tanan@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Camapu; pH; tempo de incubação.

INTRODUÇÃO

O gênero *physalis* tem sido bastante estudado nos últimos anos, visto que possui diversas propriedades medicinais que podem ser de interesse para o homem. A *physalis* pertence a família solanaceae, apresentando mais de 80 espécies entre plantas perenes, herbáceas e anuais. (ROCKENBACH et. al., 2008).

Dentro das espécies, a *physalis angulata*, certamente é a mais representativa, pelo seu alto potencial medicinal, sendo objeto de estudos voltados para a área farmacológica principalmente, tendo como principal grupo de esteroides a fisalina, apresentando efeitos antiparasíticos, antiviral e antineoplástica (TOMASSINI et al., 2000).

Para que ocorra o completo desenvolvimento da planta é necessário alguns elementos essenciais, onde se destaca o nitrogênio que compõe biomoléculas como: ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e diversas enzimas (MIFLIN & LEA, 1976; HARPER, 1994). O nitrogênio muitas vezes é um fator limitante, influenciando mais do que qualquer outro nutriente no desenvolvimento da planta, pois sua disponibilidade é baixa no solo além de ser perdido facilmente por lixiviação ou volatilização e ainda pode ser consumido por microrganismos (WILLIAMS E MILLER, 2001).

Dessa forma busca-se otimizar a ação da redutase de nitrato para que se tenha uma maior assimilação de nitrogênio pela planta.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Sementes de *Physalis angulata* L. foram colocadas para germinar em casa de vegetação utilizando copos plásticos contendo substrato comercial. Aos 20 dias após a germinação as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade da parte aérea e radicular, e transplantadas para o sistema hidropônico do tipo leito flutuante, utilizando a solução nutritiva de Sarruge modificada para o cultivo de *Physalis* (Leite et al., 2017). Quando as plantas iniciaram o período de floração, foram coletadas amostras de folhas, por volta das 9h da manhã, e levadas ao laboratório para determinação da atividade enzimática.

As análises da atividade da Redutase do Nitrato (RN) foram realizadas conforme método descrito por Jaworski (1971), no qual as amostras de folhas são fragmentadas e colocadas em tubos de ensaio com tampão fosfato, contendo n-propanol e KNO₃. Após agitação manual os tubos de ensaio são submetidos a vácuo, utilizando o dessecador ligado a uma bomba pressurizadora e depois mantidos na ausência de luz em banho-maria a 30°C.

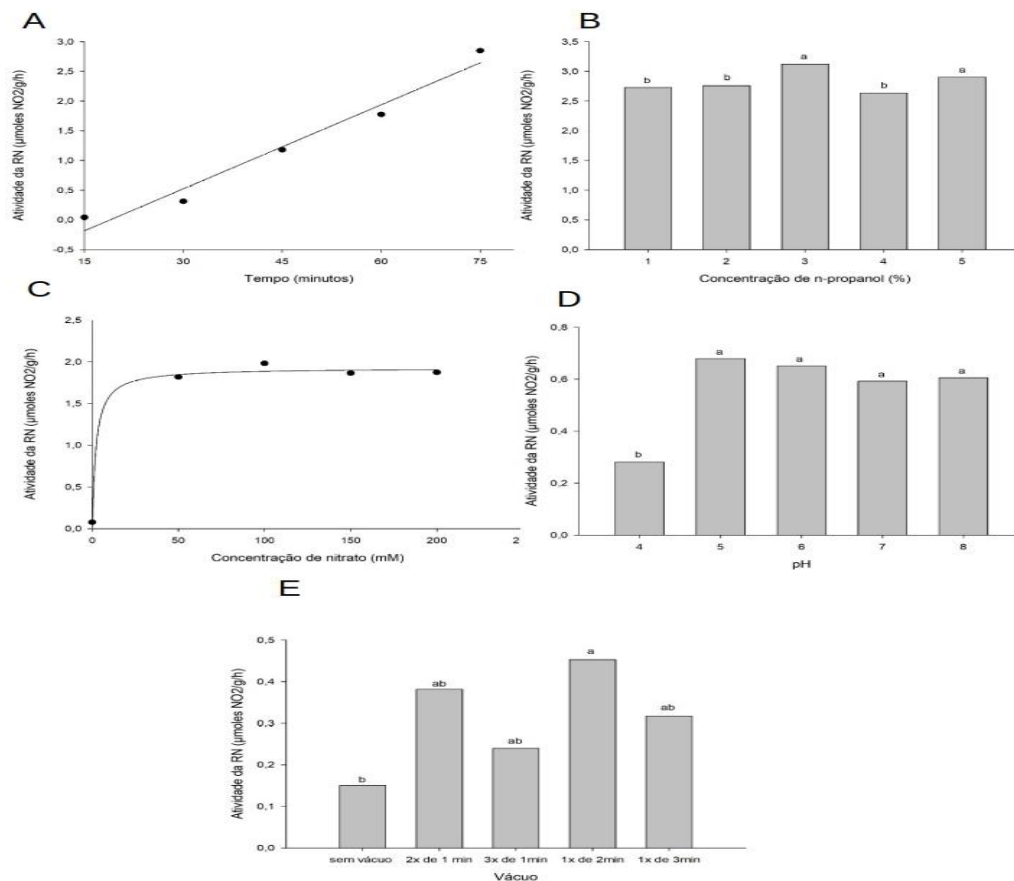
Para a adequação do protocolo para a espécie em estudo foram avaliados os efeitos da variação da concentração de KNO₃ (0, 50, 100, 150 e 200 mM), do tempo de incubação (15, 30, 45, 60 e 75 minutos), do pH (4; 5; 6; 7 e 8), da concentração de n-propanol no meio de

incubação (1, 2, 3, 4 e 5%), e da submissão ao vácuo (sem vácuo, 2 vezes por 1min, 3 vezes por 1min, 1 vez por 2min e 3 vezes por 3min) otimizando a liberação de nitrito para o meio de incubação.

Para se determinar a quantidade de nitrito formada pela reação, foram retiradas alíquota de 0,5 ml do meio de incubação, adicionada de 1 ml de sulfanilamida 1% em HCl 1,5N, 1 ml de N-2-naftil-etileno 0,02% e 1,5 ml de água destilada. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade da enzima expressa em nmoles de NO_2^- liberados pelo tecido vegetal na solução de incubação por hora, por grama de matéria fresca (nmoles de $\text{NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ mf-1).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Figura 1 – Atividade da redutase do nitrato (aRN) em tecidos foliares de *P. angulata* para otimização do método *in vivo*. A – diferentes períodos de incubação; B – incubação com diferentes concentrações de n-propanol; C – incubação com diferentes concentrações de Nitrato; D – incubação em diferentes pH; E – incubação com diferentes tempo de vácuo.



A atividade da redutase do nitrato (aRN) em folhas de *P. angulata*, como pode ser visto na Figura 1A, na qual, foram incubadas por diferentes períodos, mostrou-se crescente de forma linear ao longo do tempo, sendo a maior atividade observada de $2,84 \mu\text{moles de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com a incubação por 75 min. Essa resposta crescente da aRN pode estar relacionada a demanda de tempo para que ocorra a completa infiltração do meio de reação e homogeneização da temperatura (OLIVEIRA et al., 2005).

Trabalhos como o de Delú-filho et al. (1988) também verificaram o aumento da atividade da enzima até 180 minutos de tempo de incubação em mudas de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Porém não é recomendado que se prolongue o período de incubação por mais de uma hora, visto que ocorrem alterações no citoplasma por condições de anaerobiose (L'VOV; SAFARALIEV, 1988).

Já quando avaliada as diferentes concentrações de n-propanol no meio de incubação (Figura 1B), foi observado que as concentrações de 3% e 5% diferiram estatisticamente das demais, apresentando valores superiores de atividade da RN, com 3,11 e 2,90 $\mu\text{moles de NO}_2$ $^1 \text{ h}^{-1}$, respectivamente

A função do solvente é, diminuir a tensão superficial do líquido é facilitar o contato do meio de incubação com o tecido foliar (CAZETTA; VILLELA, 2004). Nesse contexto o n-propanol possui um efeito estimulador, e segundo Jaworski (1971), esse solvente aumenta a permeabilidade celular ao nitrato e nitrito. Dessa forma o n-propanol estaria facilitando a transferência do nitrato oriundo do meio de incubação ou do vacúolo para o citoplasma, local onde estaria mais acessível à redução pela aRN (NIEVOLA, 2001).

Como mostrado na Figura 1C, a aplicação de nitrato externo induziu a atividade da enzima. A partir de 50 mM, a aRN permaneceu relativamente constante quando comparada às concentrações de 100, 150 e 200 mM. Segundo Magalhães et al. (1976), a concentração adequada para a manutenção e indução de atividade da enzima para a maioria das espécies estudadas gira em torno de 50 mM L^{-1} , o que ocorreu com a *Physalis angulata*.

A aplicação do nitrato de forma externa se torna importante, porque sem essa adição não ocorreu atividade da reductase de nitrato, indicando que os tecidos foliares não acumularam nitrato suficiente para produzir quantidade de nitrito detectável (SANTOS, 2014). Resultados que também foram observados por Oliveira e Magalhães (1989) em cana-de-açúcar, o que sugere que existe pouco acúmulo de nitrato nas folhas de *P. angulata*

Dentre a faixa de pH escolhida para o estudo (Figura 1D), a menor atividade da RN foi em 4,3. Para os demais pH avaliados não houve diferença, possibilitando o uso de uma faixa relativamente ampla de pH para a espécie. Resultado semelhante foi observado por Santos et al. (2014) para a cana-de-açúcar. O efeito relacionado ao pH está associado a alterações na estrutura molecular da enzima ou mudanças na velocidade de translocação dos íons nitrito e nitrato através das membranas celulares (PRAKASHI; NAIR, 1982; CARELLI; FAHL, 1991).

A submissão do meio de incubação ao vácuo (Figura 1E) proporcionou maiores valores da aRN, mesmo alguns não diferindo do tratamento sem vácuo. O uso do vácuo durante 2 min por apenas uma vez é o mais indicado pois proporcionou o maior valor de atividade da enzima.

Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Santos (2014), no qual não houve diferença estatística dos tratamentos com vácuo e no tratamento sem vácuo, porém no presente trabalho quando o meio de incubação foi submetido ao vácuo 1x durante 2 minutos houve diferença estatística.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Com base nos resultados obtidos é possível determinar que a atividade da enzima redutase de nitrato em *Physalis angulata* é melhor observada nas condições seguintes: Tempo de incubação de 60 minutos; 3% de concentração de propanol; Aplicação de 50 mM de nitrato; Possui uma ampla faixa de pH que pode ser trabalhada variando de 5 a 8; E submissão ao vácuo durante 1x por 2 minutos.

REFERÊNCIAS

- CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I. Distribuição da assimilação do nitrato e da matéria seca em plantas jovens de café cultivadas em diferentes níveis de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v.50, p.29-37, 1991.
- CAZETTA, J.O.; VILLELA, L.C.V. Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). **Scientia Agricola**, v.61, p.640-648, 2004. DOI: 10.1590/S0103-90162004000600012.
- DELÚ-FILHO, D.N. et al. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg): Otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, v.21, p.329-336, 1998.
- JAWORSKI, E.G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 43:1274- 1279.
- LEITE, R. S.; TANAN T. T.; NASCIMENTO, M. N.; OLIVEIRA, L. M.; ABREU, P. A. S.; Hydroponic cultivation of *Physalis angulata* L.: growth and production under nitrogen doses. **Pesquisa Agropecuária Tropical (online)**, v. 47, p. 145-151, 2017.
- L'VOV, N.P.; SAFARALIEV, P.M. Methods of determining nitrate reductase activity in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 35, p.196-200, 1988.
- MAGALHÃES, A.C. et al. Influência of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (*Glycinemax* L.) seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.58, p.12-16, 1976.
- MEGURO, N.E.; MAGALHÃES, A.C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, p.249-257, 1982
- MIFLIN, B.J., LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v. 15, p.873-885, 1976.
- NIEVOLA, C. C. Variações diurnas da atividade in vivo da redutase do nitrato em abacaxizeiro. **Revta brasil. Bot.**, São Paulo, V.24, n.3, p.295-301, set. 2001.
- OLIVEIRA, L.E.M. de; MAGALHÃES, A.C.N. Atividade da redutase do nitrato in vivo em folhas de cana-de-açúcar em função das variações nas condições de ensaio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p.437-443, 1989.
- OLIVEIRA, M. A. J. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.515-522, mai-jun, 2005.
- PRAKASHI, S.S ; NAIR, M.S. Regulation of in vivo assay of nitrate reductase in wheat leaves. **Plant Science Letter**, Oxford, v.34, p.25-34, 1982.
- ROCKENBACH, I. I et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 3, p. 271-276, 2008.
- Santos C.L.R, Cazetta O, Saran LM, Sanches A. Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 384-394, 2014.
- TOMASSINI, T. C. B.; BARBI, N. S.; RIBEIRO, I. M.; XAVIER, D. C. C. Gênero *Physalis*: uma revisão sobre vitasteroides. **Química Nova**. v. 23. n.1 p. 47-57, 2000.
- WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporter responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Ann. Rev. PlantPhysio and Plant MolBiol**. V. 52, p. 659-688, 2001.