

**GISELE ADRIANA BUBNA**

**CRESCIMENTO E LIGNIFICAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA (*Glycine max* L. Merr.)  
SUBMETIDAS AO ÁCIDO CAFEICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

**MARINGÁ  
JULHO – 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**GISELE ADRIANA BUBNA**

**CRESCIMENTO E LIGNIFICAÇÃO DE RAÍZES DE SOJA (*Glycine max* L. Merr.)  
SUBMETIDAS AO ÁCIDO CAFEICO**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Lucio Ferrarese  
Orientadora**

**MARINGÁ  
JULHO – 2009**

## BIOGRAFIA

**Gisele Adriana Bubna**, nasceu em Maringá/PR em 29/03/1980. Possui graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) (2004). Tem experiência na área botânica, atuando principalmente nos temas relacionados à Bioquímica Vegetal com ênfase no Metabolismo Secundário de Plantas. Iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - área de concentração Biologia Celular e Molecular - em Março de 2007, desenvolvendo o trabalho “Crescimento e lignificação de raízes de soja (*Glycine max L. merr.*) submetidas ao ácido cafeico” com defesa da dissertação marcada para julho de 2009. Atualmente é professora da rede particular de ensino.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por cumprir mais uma etapa da minha vida profissional e por Ele ter renovado minhas forças nos momentos de fraqueza. Aos meus pais pelo amor e apoio de todas as formas, ao meu esposo Anderson pelas palavras de incentivo, carinho e compreensão.

Aos meus professores de todas as épocas pelo conhecimento transmitido. Aos meus orientadores Maria de Lourdes e Osvaldo pela confiança depositada, orientação e exemplo de conduta profissional durante esses anos de convivência.

Aos companheiros de laboratório Edicléia, Ana Paula, Anderson, Rita, Paulo, Franciele, Daniele, Natália, Victor Hugo, Rogério Marchiosi, Aline, Wanderley, Rogério Lima, Graciene, Débora e D. Flausina pela ajuda nos momentos necessários.

Agradeço a Aparecida (Cidinha) pelo auxílio e amizade destinados a mim durante esses seis anos que nos conhecemos. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos. E a Universidade Estadual de Maringá.

E a todos que participaram de alguma forma dessa conquista.

Obrigada.

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação é composta de uma breve revisão bibliográfica e de um artigo científico que trata dos efeitos do ácido cafeico na lignificação de raízes de soja. O artigo será submetido à revista *Plant and Soil* (Qualis A2).

Gisele Adriana Bubna. Alelopatia e ácido cafeico

Gisele Adriana Bubna, Rogério Barbosa Lima, Daniele Iara Lucca Zanardo, Osvaldo Ferrarese-Filho and Maria de Lourdes Lucio Ferrarese. Soybean root growth inhibition and lignification induced by caffeic acid.

## SUMÁRIO

<b>Resumo geral.....</b>	<b>07</b>
<b>General Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>Revisão da Literatura.....</b>	<b>12</b>
<b>Alelopatia.....</b>	<b>12</b>
<b>Fenilpropenóides e ácido cafeico.....</b>	<b>14</b>
<b>Lignificação e enzimas relacionadas.....</b>	<b>15</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>19</b>
<b>Referências.....</b>	<b>20</b>
<b>Artigo: Aplicação exógena de ácido cafeico inibe o crescimento e a lignificação das raízes de soja .....</b>	<b>28</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>29</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>30</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>31</b>
<b>Resultado.....</b>	<b>35</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>Referências.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela e figuras.....</b>	<b>43</b>

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS** – As plantas superiores liberam regularmente compostos orgânicos no ambiente. Estes produtos, adicionados frequentemente à matriz do solo, são liberados no solo pela água da chuva, pela exsudação das raízes, e pela deterioração natural das partes de plantas que se encontram acima ou abaixo da terra. Vários destes compostos foram descritos como agentes de interações planta-planta, uma característica da alelopatia. Um efetivo modo de ação não foi ainda estabelecido para nenhum composto alelopático, embora algumas ações fisiológicas sejam conhecidas. Esses compostos possuem muitas classes químicas, e é improvável que essas classes tenham um mecanismo de ação comum. Aleloquímicos tem atividade em plantas superiores, e tipicamente inibem a germinação da semente, causam injúria durante o crescimento de raízes e outros meristemas, ou inibem o crescimento das plântulas. Este parece ser o caso do ácido cafeico, um composto alelopático amplamente distribuído nas plantas. Sintetizado na via dos fenilpropenóides e envolvido na formação da lignina, o ácido cafeico é estruturalmente similar ao cafeoil álcool (monolignol do *p*-hidroxifenil). A toxicidade do ácido cafeico inclui mudanças na absorção mineral, emergência das plântulas, crescimento da raiz, balanço hídrico e fotossíntese, evapotranspiração e expansão da folha, rizogênese e enzimas relacionadas, formação de raízes adventícias e geração de espécies reativas de oxigênio. Em estudos recentes, observou-se que os ácidos ferúlico e *p*-cumárico reduziram o crescimento das raízes de soja associado à prematura lignificação e seguido por mudanças na composição dos monômeros de lignina. Baseado nestes resultados, um modelo de ação foi proposto indicando que os ácidos ferúlico e *p*-cumárico podem ser canalizados na via dos fenilpropenóides e aumentar a quantidade dos monômeros de lignina, enrijecendo a parede celular o que restringe o crescimento das raízes de soja. Para testar a hipótese que a aplicação exógena do ácido cafeico pode atuar similarmente a estes aleloquímicos, o objetivo da pesquisa foi analisar seus efeitos nas atividades da PAL e da POD, o nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o conteúdo da lignina e o crescimento das raízes de plântulas de soja.

**MÉTODOS** – Plântulas de três dias foram cultivadas em solução nutritiva, contendo ou não 0,25 a 2 mM de ácido cafeico. Os experimentos foram efetuados em câmara de germinação, a 25°C, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro e irradiação de 280 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por 24 horas. Após a incubação as raízes foram medidas e preparadas para os ensaios bioquímicos. As atividades das peroxidase, solúveis e ligadas à parede celular, a viabilidade celular e os conteúdos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de

lignina foram determinados espectrofotometricamente, enquanto a atividade da PAL foi determinada por HPLC. Os conteúdos de lignina também foram determinados após incubação das plântulas tratadas, ou não, com ácido cafeico e os inibidores específicos da via dos fenilpropenóides, ácidos piperonílico (PIP) ou 3,4-metilenodioxicinâmico (MDCA). ANOVA foi aplicada para verificar a significância das variações observadas. As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelos testes Dunnett e Scott-Knott, e foram considerados significativos quando apresentaram valor de  $p \leq 0,05$ .

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – A aplicação exôgena de ácido cafeico reduziu o crescimento das raízes. Além disso, o aleloquímico diminuiu a atividade da PAL e aumentou as atividades das POD solúvel e ligada à parede celular, associada com a redução do conteúdo de  $H_2O_2$ . O conteúdo de lignina aumentou após o tratamento com ácido cafeico. Quando aplicado juntamente com PIP (um inibidor da cinamato 4-hidroxilase, C4H), ácido cafeico 1 mM não alterou o conteúdo de lignina enquanto que, aplicado juntamente com MDCA (um inibidor da 4-cumarato:CoA ligase, 4CL) houve aumento quando comparado ao tratamento feito somente com o aleloquímico. Resultados subsequentes revelaram mudanças no conteúdo dos monômeros de lignina, nas raízes tratadas com ácido cafeico. Aumentos significativos das unidades *p*-hidroxifenil (H) e guaiacil (G) têm sido verificados na lignina de raízes de plântulas expostas ao ácido cafeico, quando comparado com o controle correspondente. Quando aplicado juntamente com PIP ou MDCA ocorreu inibição nos teores totais (H+G+S) dos monômeros, em comparação ao tratamento com o aleloquímico. Um fato observado em nossos estudos é que o ácido cafeico não somente reduziu significativamente o crescimento das raízes das plântulas de soja, mas também aumentou a lignificação das mesmas. A redução do crescimento das raízes tem sido considerada como um primeiro efeito dos aleloquímicos e, em alguns casos, está associada com precoce lignificação da parede celular. A via dos fenilpropenóides é uma das mais importantes vias metabólicas devido ao seu papel na síntese de lignina, e a peroxidase (POD) ligada à parede celular tem sido associada com a polimerização de monolignóis e, conseqüentemente, com a lignificação. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o ácido cafeico exógeno induz a inibição do crescimento das raízes de soja e, em nível metabólico, é canalizado na via de fenilpropenóides sendo convertido em cafeoil CoA, na reação catalisada pela 4-CL, ou a ferulato → 5-hidroxiferulato → sinapato. Após subsequentes reações, esses metabólitos são convertidos em seus respectivos álcoois que são polimerizados em lignina, na parede celular.

**CONCLUSÕES** – Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a redução no crescimento das raízes de soja, induzida pelo ácido cafeico, pode ser devido à excessiva produção de monolignóis originados da aplicação exógena deste aleloquímico. Como consequência, os monolignóis sintetizados são polimerizados em lignina na parede celular, enrijecendo as raízes e restringindo o seu crescimento.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND AIMS** – Higher plants regularly release organic compounds into the environment. These products, often added to the soil matrix, are released in soil by rainwater, by exudation from roots, and by the natural decay of parts of plants lying above or below the ground. Some of the above have been reported to be agents of plant-plant interactions, a characteristic of the allelopathy. The primary mode of action has not been established for any allelopathic compound, albeit some physiological actions are known. The array of compounds cuts across many chemical classes, and it is unlikely they have a common mechanism of action. Allelochemicals, active against higher plants, typically suppress seed germination, causing injury to root growth and other meristems, or inhibiting seedling growth. This is likely to be the case with caffeic acid, a widely distributed allelopath. Synthesized in the phenylpropanoid pathway, involved in the lignin formation, caffeic acid is structurally similar to caffeoyl alcohol (*p*-hydroxyphenyl monolignol). Caffeic acid toxicity includes changes in mineral absorption, seedling emergence, root growth, plant water balance and photosynthesis, evapotranspiration and leaf expansion, rhizogenesis and related enzymes and adventitious root formation and reactive oxygen species generation. In previous reports, we observed that ferulic and *p*-coumaric acids reduced soybean root growth associated to premature lignification followed by changes in the lignin monomer composition. Based on these findings, a model of action has been proposed indicating that both ferulic and *p*-coumaric acids may be channeled into the phenylpropanoid pathway and, further, may increase the lignin monomer amount solidifying the cell wall and restricting the soybean root growth. To test the hypothesis that exogenously applied caffeic acid may act similarly to these allelochemicals, the aim of the current research was to analyze its effects on PAL and POD activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, lignin content and root growth of soybean seedlings.

**METHODS** – Three-day-old seedlings were cultivated in nutrient solution, pH 6.0, containing or not 0.25 to 2 mM caffeic acid. Experiments were carried out in a growth chamber (25°C, 12-h light/12-h dark cycle, irradiance of 280  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) during 24 hours. Roots were then measured and prepared for assays. Soluble and cell wall-bound POD activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lignin contents were determined spectrophotometrically, whereas PAL activity was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC). Subsequent determinations of lignin were made in roots growing in nutrient solution containing, or not, caffeic acid and inhibitors of the phenylpropanoid pathway

(PIP, piperonylic acid or MDCA, 3,4-methylenedioxy cinnamic acid). ANOVA was applied to test the significance of measured differences. Dunnett and Scott-Knott tests were applied to evaluate the difference between parameters and  $P$  values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

**RESULTS AND DISCUSSION** – Exogenously supplied caffeic acid reduced the root growth. Moreover, the allelochemical decreased PAL activity and increased the soluble and cell wall-bound POD activities associated with reduction in  $H_2O_2$  contents. The lignin contents increased after caffeic acid treatments. When applied jointly with PIP (an inhibitor of the cinnamate 4-hydroxylase, C4H) or MDCA (an inhibitor of the 4-coumarate:CoA ligase, 4CL), 1 mM caffeic acid increased lignin production, respect to control. Subsequent results revealed changes in the lignin monomer contents of treated roots. Significant increases of *p*-hydroxyphenyl (H) and guaiacyl (G) units have been verified in root lignin from caffeic acid exposed plants, when compared to the corresponding controls. When applied jointly with PIP, caffeic did not affect H+G+S monomers in comparison to the control. When applied jointly with MDCA, caffeic acid decreased H+G+S monomers, respect to control. The striking fact revealed in the present study is that caffeic acid not only significantly reduced the root growth of soybean seedlings, but also increased root lignin. Reduction of growing roots has been considered as one of first effects of allelochemicals and, in some cases, it is associated with premature lignification of the cell walls. Phenylpropanoid pathway is one of the most important metabolic route due to its responsibility for the lignin synthesis, and cell wall-bound peroxidase (POD) has been shown to be associated with monolignol polymerization and, consequently, in the lignification. Results obtained in the present work suggests that exogenously applied caffeic acid induces premature cessation of the soybean root growth and, at metabolic level, it is channelled into the phenylpropanoid pathway and converted to caffeoyl CoA, by the 4CL reaction, or to ferulate  $\rightarrow$  5-hydroxyferulate  $\rightarrow$  sinapate. By subsequent reactions, these phenylpropanoid metabolites are converted in the respective alcohols which are polymerized toward lignin in the cell wall.

**CONCLUSIONS** – Based on results obtained herein it is possible to conclude that caffeic acid-induced inhibition in root growth of the soybean may be due to excessive production of monolignol from exogenously applied allelochemical. As a consequence, synthesized monolignols are polymerized into the cell forming lignin, which solidifies the plant cell wall and restricts plant growth.

## **ALELOPATIA E ÁCIDO CAFEICO**

*Gisele Adriana Bubna*

### **Alelopatia**

As plantas superiores produzem grande variedade de compostos orgânicos que são liberados no solo por vários mecanismos que incluem excreção e exsudação das raízes, decomposição de partes da planta que podem ser espalhados no solo por lixiviação. A grande maioria desses compostos participa diretamente do crescimento e desenvolvimento desses vegetais enquanto outros estão envolvidos em interações entre plantas, ou alelopatia. De acordo com a Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS), alelopatia está relacionada a alguns processos que envolvem metabólitos secundários de plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento em sistemas biológicos. Os compostos alelopáticos, possuem formas muito variadas, além de comporem diversos grupos diferentes de compostos (Ding et al., 2007). Estes compostos são chamados aleloquímicos, e, em geral, podem interferir no desenvolvimento de plantas vizinhas (Weir et al., 2004).

As substâncias alelopáticas desencadeiam uma variedade de respostas e efeitos sobre diversas espécies. Alguns trabalhos tem sugerido que perturbações na membrana celular representam o primeiro sinal de ação dos aleloquímicos, disparando diversas modificações fisiológicas na célula vegetal (Politycka, 1998; Öennerud et al., 2002). No entanto, ainda não foi determinado o exato mecanismo de ação dos aleloquímicos. Diversos modos de ação estão envolvidos na inibição e na modificação do crescimento e desenvolvimento vegetal (dos Santos et al., 2008). Muitos fatores influenciam a ação de um aleloquímico, como temperatura, fotoperíodo, pH, microorganismos e composição mineral do solo, e interações com outros compostos, aleloquímicos ou não (Inderjit, 1996).

Estima-se que existam mais de 400.000 compostos secundários e que, deste total, somente cerca de 3% são conhecidos estruturalmente. Eles podem ser divididos em três grandes grupos: terpenos, alcalóides e compostos fenólicos (Taiz e Zeiger, 2006), sendo que as vias de acetato e chiquimato suprem, respectivamente, 60% e 40% dos compostos fenólicos (Gross, 1981). Os ácidos fenólicos representam importante classe de aleloquímicos liberados no solo como exsudados de raízes e junto com produtos de decomposição vegetal. Além disso, os ácidos

fenólicos vêm sendo bastante estudados por suas atividades bioquímicas nas plantas como, por exemplo, as ações antifúngicas e anti-oxidantes, e são encontrados na maioria das plantas vasculares como integrantes das estruturas da parede celular, principalmente em polímeros como lignina e suberinas (Taiz e Zeiger, 2006), além de agirem como potentes inibidores da germinação e crescimento (Blum, 1996).

Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos de ocorrência natural que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por 3 carbonos ligados ao anel. Os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e sinápico são os hidroxicinâmicos mais comuns. Estes compostos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido cafeico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (Belitz e Grosch, 1988; Durán e Padilla, 1993; Harborne, 1973). Estudos feitos em *Crithmum maritimum*, uma planta halófito, revelou a presença de um maior conteúdo de fenólicos do que em outras espécies; quando crescidas em solos salinos essas plantas acumulam ácidos fenólicos, principalmente ácido clorogênico, em maior quantidade devido ao estresse causado pela deficiência mineral (Meot-Duros e Magné, 2009). Durante a maturação de frutos de *Citrus poonensis* e *Citrus paradisi*, os derivados do ácido hidroxicinâmico foram encontrados em maior quantidade que os derivados do ácido hidroxibenzóico foi observado também que houve diminuição dos conteúdos de ácidos fenólicos em frutos o que parece estar relacionada com o grau de maturação (Xu et al., 2008). Os ácidos fenólicos são elementos indispensáveis nas estruturas vegetais, dos quais muitos são partes integrantes da parede celular, principalmente em polímeros de ligninas e suberinas (Strack, 1997). É sabido, também, que estes compostos interferem em aspectos vitais na planta como divisão celular, absorção mineral, funcionamento dos estômatos, respiração celular, fotossíntese, síntese de proteínas, clorofila e atividade hormonal (Einhellig, 1984).

Os compostos fenólicos são altamente reativos e utilizados como substrato por várias enzimas, incluindo polifenol oxidases e peroxidases. Experimentos feitos com trigo (*Triticum aestivum*) mostraram que os compostos fenólicos inibiram a germinação de sementes e alongamento de plântulas (Kong et al., 2008), devido a supressão da atividade das peroxidases, visto que, este grupo de enzimas participa do desenvolvimento inicial das plantas. Colmos de

algumas espécies de bambú mostraram diferenciação na quantidade de ácidos fenólicos devido a idade, o que pode estar relacionado ao processo de maturação (Keski-Saari et al., 2008 ). Os derivados do ácido cinâmico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico. Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participam da estabilização do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (Wanasundara et al., 1994). Plantas de *Erica sp* apresentaram altas concentrações de ácidos fenólicos quando expostas a metais poluentes, indicando que esses compostos atuam na prevenção de danos oxidativos (Márquez-García et al., 2009).

### **Fenilpropenóides e ácido cafeico**

Fenilpropenóides são compostos, derivados do ácido cinâmico, que fazem parte do metabolismo secundário e podem estar relacionados às respostas alelopáticas. Eles podem atuar como inibidores endógenos da germinação, já que o acúmulo dessas substâncias provocaria a perda da viabilidade da semente (Sathiyamoorthy, 1990). Por outro lado, possuem efeitos antioxidantes, possivelmente relacionados a ligação de íons metálicos, a varredura de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou seus precursores, a regulação endógena de enzimas antioxidantes ou ao reparo de danos oxidativos em biomoléculas (Ursini et al., 1999).

Em plantas de melão e pepino infectadas por vírus foi observado acúmulo de fenilpropenóides como os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico após o aparecimento dos sintomas, sugerindo que esses compostos estão envolvidos na resistência viral em plantas (Bellés, 2008). Avaliando possíveis interações entre outros compostos e os ácidos fenólicos, Kovacik (2008) realizou experimentos em que o cobre foi adicionado em sistema hidropônico e os diferentes aleloquímicos foram quantificados. Os efeitos destas interações no crescimento de *Matricaria chamomilla* revelaram que ocorreu acúmulo desses ácidos sendo os mais abundantes, dentre os derivados do ácido cinâmico, os ácidos cafeico e clorogênico, o que demonstra estarem envolvidos no processo antioxidativo da planta. Em plantas de *Matricaria chamomilla* cultivadas em meio com deficiência de nitrogênio ocorreu aumento na concentração de ácidos fenólicos, principalmente os ácidos ferúlico e cafeico e, também, aumento na atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) (Kováčik et al., 2007). Segundo os autores este fato pode estar ocorrendo devido à diminuição da demanda de proteínas relacionadas ao crescimento da planta. Este

mecanismo parece estar envolvido no mecanismo de defesa da planta contra estresses bióticos. Em raízes e folhas de milho foi detectado que o conteúdo de compostos fenólicos aumentou em direção as zonas de maturação sendo dependente do estágio de crescimento (Maksimovic et al., 2008) e em *Citrus* os conteúdos de fenólicos diminuíram com a maturidade dos frutos, particularmente o ácido cafeico (Xu et al., 2008).

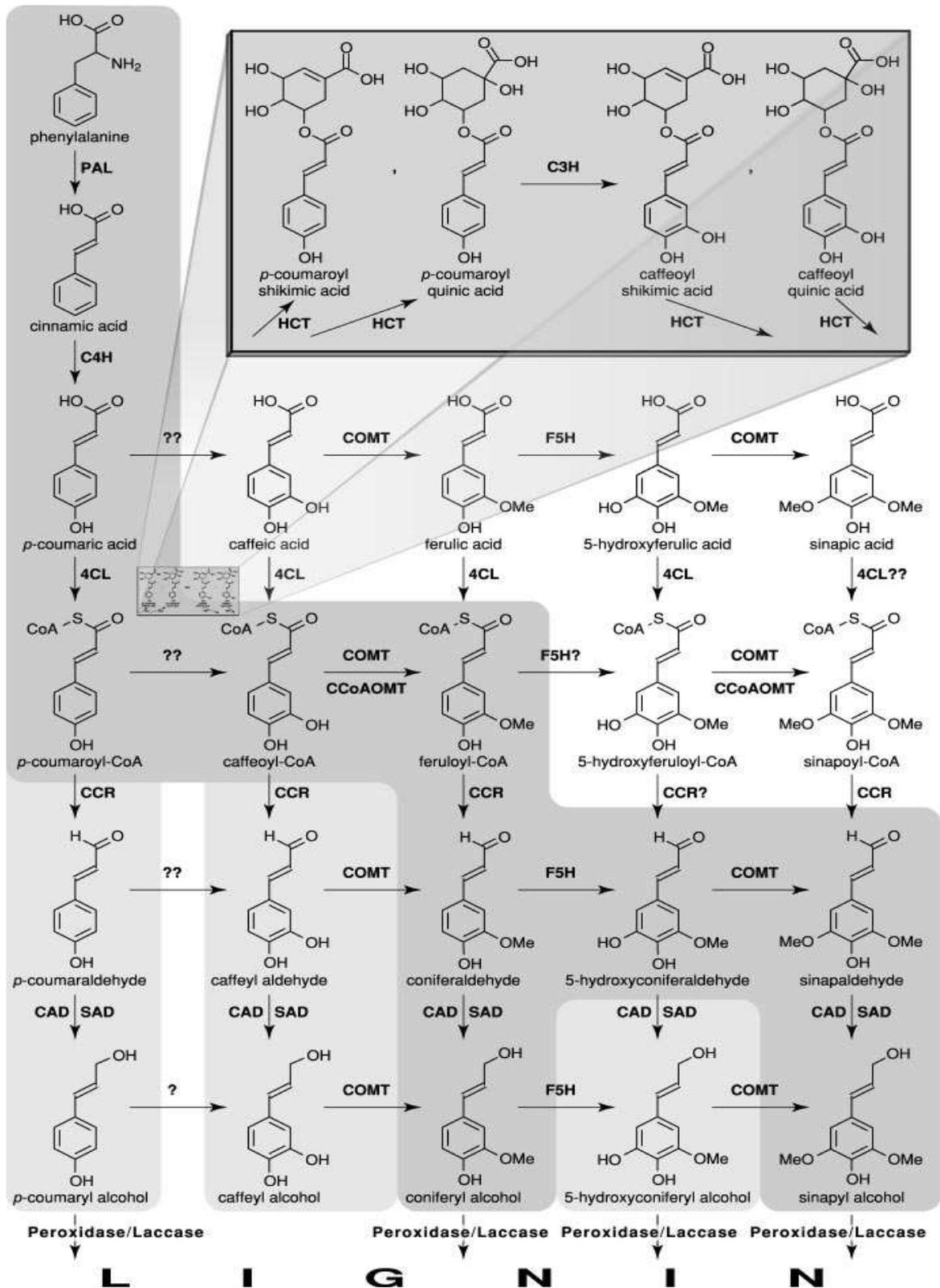
Os ácidos cafeico, ferúlico e vanilina, presentes em abundância nas sementes de alguns cereais, inibiram a germinação das sementes de trigo devido à supressão da atividade das peroxidases (Kong et al., 2008), sendo que esse grupo de enzimas atua no processo de desenvolvimento inicial das sementes. O ácido cafeico (ácido 3,4 hidroxicinâmico) é um ácido carboxílico derivado do ácido cinâmico e tem sido descrito como potente inibidor do crescimento em fungos (Harrison et al., 2003) bactérias (Bowless e Miller, 1994) e em raízes de plantas (Baleroni et al., 2000a). Batish et al. (2008), demonstraram que o ácido cafeico interfere no crescimento inicial do hipocótilo de feijão (*Phaseolus aureus*) afetando significativamente o crescimento da raiz e o número de raízes laterais, além de alterar a atividade de algumas enzimas. Em *Poncirus trifoliata*, o ácido cafeico age sinergicamente com a auxina induzindo a iniciação das raízes (Felzener et al., 2007). Estudo tem mostrado que o ácido cafeico é um precursor dos ácidos húmicos, os quais desempenham importante papel na captação de ferro pelas plantas (Jung et al., 2003; Deiana et al., 2008). Experimentos feitos em *Euphorbia esula* utilizando ácido cafeico mostraram redução na área e peso de folhas, diminuição do comprimento e peso de raízes e caules, além de alterar as taxas de transpiração isto pode estar ocorrendo devido a deficiência na captação mineral influenciando no balanço hídrico da planta (Barkosky et al., 2000).

### **Lignificação e enzimas relacionadas**

O enrijecimento da parede vegetal associado à lignificação é um mecanismo comum de defesa vegetal (dos Santos et al., 2008; Zanardo et al., 2009). As plantas liberam como resposta aos estresses diversos aleloquímicos, dentre eles as formas livres dos fenilpropenóides. Estes enrijecem as paredes celulares, além de causarem diversos processos de oxidações com formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) diminuindo o crescimento vegetal e podendo ocasionar sua morte (Politycka, 1999).

A lignina e a celulose são os dois biopolímeros mais abundantes na Terra, correspondendo a maior parte do carbono fixado no planeta. Em especial, a lignina corresponde a 30% do carbono terrestre fixado anualmente (Boerjan et al., 2003). Ela permitiu que as plantas conquistassem eficientemente o ambiente terrestre, fornecendo o enrijecimento e a força necessária para o transporte de água e solutos pelo xilema, rigidez ao caule; redução da transpiração para o ambiente; além de forte proteção contra patógenos (Sarkanen e Ludwig, 1971, Douglas, 1996). A lignina é constituída por unidades de fenilpropanóides (monolignóis) que se polimerizam e são depositadas na parede celular das células vegetais. A conversão de fenilalanina em derivados do ácido cinâmico é comum a todas as vias de biossíntese dos principais fenilpropanóides, incluindo lignina, flavonóides e ésteres de cinamato (Yun et al., 2005). A lignina é um polímero de fenilpropanóides complexos, sendo que este polímero e metabólitos relacionados têm importante função sobre o desenvolvimento de plantas.

A via dos fenilpropanóides produz monômeros de lignina. O polímero de lignina é uma mistura racêmica de heterobiopolímeros aromáticos composta, principalmente, de três hidroxicinamil alcóois, diferindo no seu grau de metoxilação, chamados de monolignóis: *p*-cumaril álcool, coniferil álcool e sinapil álcool correspondendo aos monolignóis *p*-hidroxifenil guaiacil e siringil abreviados respectivamente pelas letras H, G e S (Fig. 1) (Freudenberg e Neish, 1968; Li et al., 2008). Eles estão presentes por toda a vida das plantas e podem se acumular em respostas bióticas e abióticas (Solecka et al., 1999). No entanto, a formação da lignina possui alta plasticidade. Muitos outros fenilpropanóides são incorporados em lignina além dos três principais monolignóis (H, G, S), principalmente, quando as enzimas da via dos fenilpropanóides são inibidas (Ralph et al., 2001; Vanholme et al., 2008). A inibição de qualquer enzima da via de síntese dos monolignóis reduz o fluxo global de carbono na via. Porém, a inibição de enzimas dos passos iniciais provoca redução maior no fluxo através da via (Li et al., 2008). O primeiro passo da via dos fenilpropanóides é deaminação da fenilalanina pela fenilalanina amônia-liase (PAL) para produzir o cinamato, que é o substrato da cinamato 4-hidroxilase (C4H). Plantas transgênicas de tabaco, com redução nas atividades da fenilalanina amônia liase (PAL) ou da cinamato 4-hidroxilase (C4H), apresentaram reduzido conteúdo de lignina (Elkind et al., 1990; Bate et al., 1994; Sewalt et al., 1997). Plantas de melão e pepino



**Fig. 1.** Via dos fenilpropenóides e dos monolignóis baseada em análises composicionais, ensaios enzimáticos e o uso de plantas transgênicas. A rota segue em direção à produção de monolignóis e ocorre favoravelmente nas angiospermas. A rota destacada em cinza também ocorre, porém dependendo da espécie e das condições (Boerjan et al., 2003).

infectadas por vírus apresentaram aumento na transcrição das enzimas PAL, C4H e POD, sugerindo que houve ativação da via dos fenilpropanóides caracterizando uma resposta à infecção (Bellés, 2008). Análise do fluido do apoplasto de raiz e folha de milho exibiram a presença de precursores de lignina (coniferil álcool e ácido *p*-cumárico) que podem ser oxidados por reações catalisadas pelas peroxidases. O ácido ferúlico, outro precursor da lignina, também foi encontrado somente no apoplasto de folhas (Maksimovic et al., 2008).

Estudos recentes tem indicado que a redução no crescimento das raízes pelos aleloquímicos está associada com a lignificação prematura da parede celular e o aumento na atividade de enzimas ligadas a rota dos fenilpropanóides, como POD e PAL (dos Santos et al., 2004; Politycka e Mielcarz, 2007). Investigações realizadas em milho indicaram que o aumento na concentração de ácidos fenólicos pode provocar aumento na produção de lignina durante o processo de maturação dos tecidos da planta (Maksimovic et al., 2008). Experimentos realizados sob os efeitos dos fenilpropanóides exógenos na PAL mostraram resultados contraditórios. Aumento na atividade da PAL foi observado quando derivados do ácido cinâmico (ácidos ferúlico e *p*-cumárico) foram aplicados nas raízes de plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) (Politycka, 1998) ou, ainda, ácido ferúlico (dos Santos et al., 2004) nas raízes de plântulas de soja (*Glycine max*) e em plantas mantidas sob deficiência de nitrogênio (Kovacik et al., 2007). Entretanto, Sato et al. (1982) verificaram que o ácido ferúlico não foi efetivo sobre a PAL de batata doce (*Ipomea batatas*), ervilha (*Pisum sativus*) e pepino. Contudo, os ácidos *p*-cumárico (Zanardo et al., 2009) e cinâmico inibiram a atividade da PAL, nas raízes de soja, o que pode ser, provavelmente, decorrente de inibição por *feedback* (Blount et al., 2000).

Tem sido proposto que a incorporação de lignina aumenta a rigidez devido ao mecanismo de espessamento, que diminui a extensão da parede celular em decorrência da formação de pontes difenil entre polímeros da parede, por ação das peroxidases (Sánchez et al., 1996). Entretanto, ainda não está definitivamente elucidado o papel das peroxidases no metabolismo em virtude do grande número de reações por elas catalisadas e de diferentes isoenzimas. Em plantas, essas isoenzimas são encontradas na parede celular, apoplasto, vacúolos, organelas de transporte e em ribossomos ligados à membrana. Alguns estudos sugerem que a peroxidase ligada à parede celular tem grande afinidade por precursores de lignina. De um modo geral, a peroxidase tem sido relacionada com vários processos fisiológicos, incluindo a polimerização de álcoois hidroxil e metoxicinâmicos em lignina e formando ligações rígidas entre celulose, pectina, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e lignina, com simultânea redução do crescimento das raízes (Wallace e

Fry, 1999). Estudos feitos em trigo tem mostrado que a atividade das peroxidases diminuiu com a ação de fenólicos como o ácido cafeico, ácido ferúlico e vanilina. Esses efeitos foram minimizados quando sementes foram pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devido ao seu poder oxidante (Kong et al., 2008). As peroxidases solúveis distribuídas, principalmente, no apoplasto, têm menor atividade em relação aos precursores da lignina por catalisar a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> além da oxidação de inúmeros compostos aromáticos, podendo atuar como óxido-redutases, e, tendo a função de catalisar reações entre dois substratos (doador - receptor) com transferência de equivalentes redutores de um para outro substrato. A lignificação por peroxidases requer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como co-substrato, que tem sido localizado, histoquimicamente, em tecidos lignificantes e pode ser formado, *in situ*, pelas peroxidases atuando como NADH oxidases. Polle et al. (1994) verificaram que, em hipocótilos de abeto (*Picea abies*), durante a lignificação, a peroxidase foi localizada no xilema durante o espessamento secundário. Assim, o aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levaria a maior atividade das peroxidases, seguido do aumento na síntese da parede celular que estabeleceria ligações rígidas de polissacarídeos, ocasionando aumento da rigidez e síntese de lignina desta parede. Em decorrência disso, ocorreria inibição do crescimento das raízes. Estudos recentes feitos em folhas de milho tem mostrado correlação entre o aumento da atividade das peroxidases, diminuição do crescimento e síntese de lignina durante a maturação dos tecidos da planta (Maksimovic et al., 2008).

### **Considerações finais**

Apesar das informações descritas até aqui, não se pode afirmar que exista um mecanismo de ação definitivo que explique o comportamento dos compostos aleloquímicos. Assim, várias publicações relatam os efeitos que cada tipo de aleloquímico provoca em determinada espécie de planta. Recentemente, Santos et al (2008) propôs um possível modo de ação para o aleloquímico ácido ferúlico, outro derivado de ácido hidroxicinâmico, nas raízes de soja. Neste modelo, o ácido ferúlico ataca as ATPases envolvidas no transporte causando um desbalanço iônico que dispara a NADPH-desidrogenase geradora de superóxido. Uma peroxidase da parede transfere um elétron do ácido ferúlico para o superóxido produzido pela NADPH-desidrogenase e formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e feruloil radicalar. O ácido ferúlico captado pela célula é β-glicosilado ou introduzido na via dos fenilpropanóides, onde é convertido em um aldeído monolignol,

extrusado e oxidado por peroxidases que utilizam o próprio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pela oxidação do próprio ácido ferúlico.

Baseado nestas informações é razoável crer que os ácidos fenólicos, como ferúlico, cafeico, sinápico e o *p*-cumárico afetem o crescimento das plantas atuando em nível da via de fenilpropenóides e, portanto, na lignificação das raízes. É sabido que a parede celular lignifica com a cessação da expansão celular quando a célula está sob estresse ou quando ela se diferencia para alguma especialidade particular, notavelmente nas células do xilema. Devido ao importante papel da lignificação no crescimento vegetal, uma análise criteriosa dos efeitos do ácido cafeico no processo de síntese de lignina poderá contribuir para o entendimento do papel deste ácido fenólico como aleloquímico nas plantas.

#### 4. REFERÊNCIAS

BALERONI, C.R.S.; FERRARESE, M.L.L.; SOUZA, N.E.; FERRARESE-FILHO, O. Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives. *Biologia e Plantarum*, v.43, p. 313–316, 2000.

BARKOSKY, R. R.; EINHELLIG, F. A.; BUTLER, J. L. Caffeic acid-induced changes in plant–water relationships and photosynthesis in leafy Spurge *Euphorbia esula*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, n. 9, 2000.

BATE, N.J.; ORR, J.; NI, W.; MEROMI, A.; NADLER-HASSAR, T. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.91, p.7608–12, 1994.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P; KAUR, S.; KOHLI, R.K.; YADAV, S.S. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*) *Journal of Plant Physiology*, v.1,65, p. 297–305, 2008.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia, p. 645- 656, 1988.

BELLÉS, J.M.; LÓPEZ-GRESA, M. P.; FAYOS, J.; PALLÁS,V.; ISMAEL RODRIGO, I; CONEJERO, V. Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants. *Plant Science*, v. 174, p. 524–533, 2008

BLOUNT, J.W.; KORTH, K.L.; MASOUD, S.A.; RASMUSSEN, S.; LAMB, C.; DIXON, R.A. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*. v.122, p.107–16, 2000.

BLUM, U. Allelopathic interactions involving phenolic acids. *Journal of Nematology*, v.28 p. 259–267, 1996.

BOERJAN, W; RALPH, J; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. *Annual Review in Plant Biology*, v.54, p.519-546, 2003.

BOWLES, B.L.; MILLER, A.J. Caffeic acid activity against *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Food Science*, v.59, p.905–908, 1994.

DEIANA, S.; PREMOLI, A.; SENETTE, C. Oxidation of caffeic acid by Fe(III) trapped in a Ca-polygalacturonate network. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 435-443. 2008.

DING, J.; SUN, Y.; XIAO, C.L.; SHI, K.; ZHOU, Y.H.; YU, J.Q. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *Journal of Experimental Botany*. v.58, n.13, p.3765-73, 2007.

DOUGLAS, C.J. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: From Weeds to trees. *Trends in Plant Science*, v.1, p.171-178, 1996.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*. Sevilla: v. 44, p. 101-106, 1993.

EINHELLIG, F. A.; ECKRICH, P. C. Interactions of temperature and ferulic acid stress on grain sorghum and soybeans. *Journal of Chemical Ecology*. v.10, p.161-70, 1984.

ELKIND, Y.; EDWARDS, R.; MAVANDAD, M.; HEDRICK, S.A.; RIBAK, O. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* v.87, p.9057-61, 1990.

FELZENER, L.T.; BARREIRO, A.P.; ONO, E.O.; BARROS-CARDOSO, S.A.; RODRIGUES, J.D. Efeitos de reguladores vegetais no enraizamento de estacas caulinares de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (T. Ito). *Revista Brasileira de Fruticultura*.v.29, p.399-402, 2007.

FERRARESE, M.L.L.; RODRIGUES, J. D.; FERRARESE-FILHO, O. Phenylalanine ammonia lyase activity in soybean roots extract measured by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Plant Biology*, v.2, p.152-153, 2000.

FERRARESE, M.L.L.; ZOTTIS, A.; FERRARESE-FILHO, O. Protein-free lignin quantitation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) roots. *Biologia*, v.57, p.541-543, 2002.

FREUDENBERG, K.; NEISH, A.C. *Constitution and Biosynthesis of Lignin*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York: 1968. 1.ºed. p.129, 1968.

GROSS, G.G. Phenolic acids, the biochemistry of plants. Cap. 7, *Secondary Plant Products*. Conn, E., Academic Press, New York, p. 301, 1981.

HARBONE, J.B. Plant Secondary Metabolism. In: CRAWLEY, M. J.(ed.). *Plant Ecology*. Oxford: Blackwell Science. p.132-155, 1973.

HARRISON, H.F.; PETERSON, J.K.; SNOOK, M.E.; BOHAK, J.R.; JACKSON, D.M. Quantity and potential biological activity of caffeic acid in Sweet Potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage root periderm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.2943–2948, 2003.

HERRIG, V.; FERRARESE, M.L.L.; SUZUKI, L.S.; RODRIGUES, J.D.; FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. *Biological Research*, v.35, p.51-58. 2002.

INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. *Botanical Review*, v.62, p.186-202,1996.

JUNG, C.; MAEDER, V.; FUNK, F.; FREY, B.; STICHER, H.; E. FROSSARD, E., Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil*, v.252, p.301 e 31, 2003.

KESKI-SAARI, S.; OSSIPOV, V.; JULKUNEN-TIITTO, R.; JIA, J.; DANELL, K.; VETELI, T.; GUIQUAN, Z.; YAOWU, X.; NIEMELA, P. Phenolics from the culms of five bamboo species in the Tangjiahe and Wolong Giant Panda Reserves, Sichuan, China. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 36, p. 758–765, 2008.

KONG, L.; WANG, F.; SI, J.; FENG, B.; LI, S. Water-soluble phenolic compounds in the coat control germination and peroxidase reactivation in *Triticum aestivum* seeds. *Plant Growth Regulation*, v. 56, p.275–283, 2008.

KOVÁČIK, J.; GRÚZ, J.; BACKOR, M.; TOMKO, J.; STRNAD, M.; REPCÁK, M. Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess. *Environmental and Experimental Botany*, v. 62, p.145–152, 2008.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; BACKOR, M.; REPCÁK, M. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science*, v.172, p.393–399, 2007.

LI, X.; WENG, J-K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. *The Plant Journal*. v.54, p.569-81, 2008.

MAKSIMOVIC, J.D.; MAKSIMOVIC, V.; ZIVANOVIC B.; SUKALOVIC, V.H.; VULETIC, M. Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth. *Plant Science*, v. 175, p. 656–662, 2008.

MÁRQUEZ-GARCÍA, B.; FERNÁNDEZ, M.A.; CÓRDOBA, F. Phenolics composition in *Erica sp.* differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 446–451, 2009.

MEOT-DUROS, L.; MAGNE, C. Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum L.* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 47, p. 37–41, 2009.

ÖNNERUD, H.; ZHANG, L.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis. *Plant Cell*. v.14, p.953-62, 2002.

POLITYCKA, B. Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase, phenol- $\beta$ -glucosyltransferase and  $\beta$ -glycosidase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*. v.20, p.405-10, 1998.

POLITYCKA, B. Ethylene-dependent activity of phenylalanine ammonia-lyase and lignin formation in cucumber roots exposed to phenolic allelochemical. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. v.68, p.123-7, 1999.

POLITYCKA B, MIELCARZ B. Involvement of ethylene in growth inhibition of cucumber roots by ferulic and *p*-coumaric acids. *Allelopathy Journal* v. 19 p.451–60, 2007.

POLLE, A.; OTTER, T.; SEIFERT, F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies L.*). *Plant Physiology*, v.106, p.53-60, 1994.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; MARITA, J.M.; KIM, H.; LU, F. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry*. v.57, p.993–1003, 2001.

SÁNCHEZ, M.; PENA, M.J.; REVILLA, G.; ZARRA, I. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiology*, v.111, p.941-946. 1996.

SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; FINGER, A., TEIXEIRA, A.C.N., FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in soybean root growth-inhibition by ferulic acid. *Journal of Chemical Ecology*, v.30, p.1199-1208, 2004

SANTOS W.D., FERRARESE M.L.L., NAKAMURA C.V., MOURÃO K.S.M., MANGOLIN C.A., FERRARESE-FILHO O.. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *Journal Chemical Ecology* v.34 p 1230–41, 2008.

SARKANEN, K.V.; LUDWIG, C.H. Lignins: occurrence, formation, structure, and reactions. New York: Wiley-Intersci. p.916, 1971.

SATHIYAMOORTHY, P. Identification of vanilic acid and *p*-coumaric acid as endogenous inhibitors of soybean seeds and their inhibitory effect on germination. *Journal of Plant Physiology*. v.136, p.120-1, 1990.

SATO, T.; KIUCHI, F.; SANKAWA, U. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic and derivatives and related compounds. *Phytochemistry*. v.21, p.845-50, 1982.

SEWALT, V.J.H.; NI, W.; BLOUNT, J.W.; JUNG, H.G.; MASOUD, S.A. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology*. v.115, p.41–50, 1997.

SOLECKA, D.; BOUDET, A.M.; KACPERSKA, A. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. v.37, p.491-6, 1999.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.B. (eds.) *Plant Biochemistry*. Academic Press, p.387-416, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. Sinauer Associates: Inc., Publishers. ed.4, 2006

URSINI, F.; TUBARO, F.; RONG, J.; SEVANI, A. Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutrition Review*. v.57, p.241-9, 1999.

VANHOLME, R.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology*. v.11, p.278–85, 2008.

WALLACE, G.; FRY, S.C. Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry*, v.52, p.769-773, 1999.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago: v. 42, n. 6, p.1285-1290, 1994.

WEIR, T.L.; PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p.472–479, 2004.

YUN, MIN-SOO; CHEN, W.; DENG, F.; YOGO, Y. Differential properties of 4-coumarate: CoA ligase related to growth suppression by chalcone in maize and rice. *Plant Growth Regulation*, v.46, p.169-176, 2005.

XU, G.; YE, X.; LIU, D.; MA, Y.; CHEN, J. Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf.Changshanhuoyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 382– 389, 2008.

ZANARDO, D. I. L.; LIMA, R. B.; FERRARESE, M. L. L.; BUBNA, G. A.; FERRARESE-FILHO O. Soybean root growth inhibition and lignification induced by *p*-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*, v. 66, p 25–30, 2009.

## **Aplicação exógena de ácido cafeico inibe o crescimento e a lignificação das raízes de soja**

Gisele Adriana Bubna, Rogério Barbosa Lima, Daniele Yara Lucca Zanardo, Osvaldo Ferrarese-Filho, Maria de Lourdes Lucio Ferrarese

*Laboratório de Bioquímica Vegetal, Departamento de Bioquímica, Universidade de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil*

### **Correspondência para:**

Maria de Lourdes Lucio Ferrarese

Departamento de Bioquímica

Universidade de Maringá

Av. Colombo, 5790

87020-900, Maringá, PR

BRASIL

E-mail: mllferrarese@uem.br

Fax: +55 44 2633655

## Aplicação exógena de ácido cafeico inibe o crescimento e a lignificação das raízes de soja

Gisele Adriana Bubna, Rogério Barbosa Lima, Daniele Yara Lucca Zanardo, Osvaldo Ferrarese-Filho, Maria de Lourdes Lucio Ferrarese\*

*Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil*

### RESUMO

O ácido cafeico, composto alopático que ocupa posição central como intermediário na via dos fenilpropenóides, foi testado sobre o crescimento, atividades da fenilalanina amônia-liase (PAL) e peroxidases (PODs), teores de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), teores e composição monomérica da lignina de raízes de soja (*Glycine max* L. Merr.). Para isso, plântulas com três dias foram cultivadas em solução de Hoagland meia-força (pH 6,0) sem ou com (0,25 a 2 mM) ácido cafeico, em câmara de germinação (25°C, 12/12 h luz/escuro, irradiação de  $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 24 h. Aplicação exógena do ácido cafeico reduziu o crescimento das raízes, aumentou a atividade da POD solúvel e ligada à parede celular, o teor de lignina e diminuiu o teor de  $H_2O_2$  e a atividade da PAL. Quando aplicado juntamente com PIP (um inibidor da cinamato 4-hidroxilase, C4H), ou MDCA (um inibidor da 4-cumarato:CoA ligase, 4CL), 1 mM de ácido cafeico aumentou a produção de lignina. O aleloquímico aumentou os teores dos monômeros de *p*-hidroxifenil (H) e guaiacil (G). Esses resultados sugerem que o ácido cafeico pode ser canalizado para a via dos fenilpropenóides, pela reação da 4CL, resultando em aumento nos polímeros de lignina, que enrijece a parede celular e restringe o crescimento das raízes de soja.

**Palavras-chave:** Alelopatia; fenilalanina amônia liase; lignina; monômeros de lignina; peroxidase; via dos fenilpropenóides

---

Abreviações: CA, ácido cafeico;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio; MDCA, ácido 3,4-(metilendioxi) cinâmico; PIP, ácido piperonílico; POD, peroxidase; H, *p*-hidroxifenil; G, guaiacil; S, siringil.

\* Correspondência: Tel.: +55 44 3261 4717; fax: +55 44 3263 3655.

*E-mail:* mllferrarese@uem.br (M.L.L. Ferrarese)

## Introdução

As plantas superiores liberam regularmente grande variedade de compostos orgânicos que são liberados no solo por vários mecanismos que incluem excreção e exsudação das raízes, decomposição de partes da planta, que podem ser espalhados no solo por lixiviação. Todas estas possibilidades envolvem o contato de compostos secundários com a rizosfera ou com um grande volume do solo, onde as plantas podem absorvê-los (Inderjit e Duke, 2003; Weir et al., 2004). Esses compostos adicionados frequentemente à matriz do solo são relatados como agentes de interações planta-planta, uma característica do fenômeno conhecido como alelopatia (Rice, 1984). Entretanto, a investigação do modo de ação dos aleloquímicos é um esforço desafiante por causa do grande número de possíveis sítios de ação (Reigosa e Pazos-Malvido, 2007).

Aleloquímicos com atividade nas plantas superiores tipicamente suprimem a germinação das sementes, causam injúria durante o crescimento das raízes e de meristemas ou inibem o crescimento das plântulas. Além disso, eles alteram a utilização da água, a captação mineral, fotossíntese, expansão foliar, morfologia da célula (Weir et al., 2004), permeabilidade da membrana (Baziramakenga et al., 1995), síntese de proteínas (Baziramakenga et al., 1997), mobilização de lipídios (Baleroni et al., 2000b) e atividades enzimáticas (Herrig et al., 2002; Doblinski et al., 2003), entre outras ações.

Um grande número de compostos são designados como aleloquímicos, incluindo derivados do ácido cinâmico. Dentre eles, o ácido cafeico, um metabólito da via dos fenilpropanóides, que está presente em diversas espécies de plantas (Weir et al., 2004) e solos (Whitehead, 1974). A toxicidade do ácido cafeico inclui mudanças na absorção mineral (Glass, 1973; 1974), emergência de plântulas (Miller et al., 1991), crescimento das raízes (Vaughan e Ord, 1990; Baleroni et al., 2000a), balanço hídrico da planta e fotossíntese (Barkosky et al., 2000), evapotranspiração e expansão foliar (Blum e Gerig, 2006), rizogênese e enzimas relacionadas (Batish et al., 2008), formação de raízes adventícias e espécies reativas de oxigênio (Singh et al., 2009).

O crescimento da raiz é caracterizado por elevada atividade metabólica, e, por esta razão, as raízes são suscetíveis ao estresse aleloquímico. Alguns estudos indicam que a redução do crescimento da raiz por aleloquímicos está associada com a prematura lignificação da parede celular (dos Santos et al., 2004; Politycka e Mielcarz, 2007; Soares et al., 2007; Andrade et al.,

2008). Este processo metabólico de deposição de lignina é necessário em todos os tecidos das plantas, e é uma etapa importante durante a expansão celular e o crescimento da raiz. A lignina é sintetizada pela via dos fenilpropenóides, a qual está envolvida na síntese de um grande número de produtos secundários nas plantas, tais como ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e cumarinas (Boerjan et al., 2003; Kovácik et al., 2007). O primeiro passo nesta via é a deaminação da fenilalanina pela fenilalanina amônia-liase (PAL) para produzir o cinamato, sendo este o substrato da cinamato 4-hidroxilase (C4H) formando *p*-cumarato (Fig. 1). O próximo passo é a hidroxilação da posição 3 do *p*-cumarato pela *p*-cumarato 3-hidroxilase (C3H) produzindo sequencialmente cafeato, ferulato, 5-hidroxi ferulato e sinapato. Por uma sequência de reações da 4-cumarato:CoA ligase (4CL), cinamoil-CoA redutase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD) estes metabólitos são convertidos em seus correspondentes monolignóis. No último passo da via, peroxidase (POD) ligada à parede celular, catalisa a polimerização oxidativa dos três álcoois *p*-hidroxicinamílicos (álcoois *p*-cumaril, coniferil e sinapil). Eles dão origem, respectivamente, às unidades de *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) do polímero de lignina (Boerjan et al., 2003; Passardi et al., 2005).

Em estudos anteriores, constatou-se que os ácidos ferúlico (dos Santos et al., 2008) e *p*-cumárico (Zanardo et al., 2009) reduzem o crescimento da soja associado com prematura lignificação, seguida por aumento na composição dos monômeros de lignina. Baseado nestes resultados, um mecanismo de ação foi proposto indicando que os ácidos ferúlico e *p*-cumárico podem ser canalizados na via dos fenilpropenóides, aumentando a quantidade dos monômeros de lignina, provocando a rigidez da parede celular e restringindo o crescimento das raízes de soja. Para testar a hipótese que a aplicação exógena do ácido cafeico pode atuar similarmente a estes aleloquímicos, o objetivo do estudo foi o de analisar seus efeitos nas atividades das enzimas PAL e POD, nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, teor de lignina e crescimento das raízes de plântulas de soja.

## **Materiais e métodos**

### **Procedimentos gerais**

Sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) variedade BRS 184, foram esterilizadas com 2% de hipoclorito de sódio por 2 minutos, lavadas com água deionizada e germinadas no escuro (a 25°C) entre duas folhas de papéis de filtro umedecidas. Vinte e cinco plântulas de 3 dias, com tamanhos uniformes foram suspensas em uma placa de acrílico, devidamente perfurada, e

transferidas para um recipiente de vidro (10 x 16 cm) contendo 200 ml de solução de Hoagland meia-força (pH 6,0) com ou sem 0,25 a 2 mM de ácido cafeico. As concentrações do aleloquímico foram selecionadas com base na literatura (Ng et al., 2003; Kong et al., 2008; Batish et al., 2008; Singh et al., 2009). Experimentos adicionais com 0,1 mM de ácido piperonílico (PIP) ou 2 mM de ácido 3,4-(metilenodioxo) cinâmico (MDCA) foram realizados como indicado nas legendas das figuras. O recipiente foi mantido em câmara de crescimento (25°C, 12/12 h fotoperíodo luz/escuro, irradiância de 280  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). As raízes foram medidas no começo e no final dos experimentos e o comprimento foi obtido pela diferença entre eles. A biomassa fresca foi determinada imediatamente após a incubação e a biomassa seca foi estimada após secagem a 80°C, em estufa, até obtenção de valor constante. Ácido cafeico, PIP e MDCA foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO), e os demais reagentes usados foram do mais alto grau de pureza disponível.

### **Ensaio enzimático**

Fenilalanina amônia-liase (PAL) foi extraída como descrito por Ferrarese et al. (2000). Raízes frescas (2,0 g) foram trituradas, a 4°C, em 0,1 M de tampão borato de sódio (pH 8,8). Os homogeneizados foram centrifugados (2.200g, 15 min) e o sobrenadante foi usado como a preparação enzimática. A mistura de reação (100  $\mu\text{moles}$  de tampão borato pH 8,7 contendo adequada quantidade do extrato enzimático em um volume final de 1,55 ml) foi incubada a 40°C por 5 minutos, para o ensaio da atividade da PAL. Quinze  $\mu\text{moles}$  de L-fenilalanina foram adicionados para iniciar a reação, que foi interrompida após 1 h de incubação com adição de 50  $\mu\text{l}$  de 5,0 N HCl. As amostras foram filtradas através de filtro descartável de uma seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas (20  $\mu\text{l}$ ) em cromatógrafo líquido Shimadzu® (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba LC-10AD, um injetor Rheodyne®, um detector UV SPD-10A, um módulo de comunicação CBM-101 e uma estação de trabalho Class-CR10. Uma coluna de fase-reversa Shimpack® CLC-ODS (M) (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) foi usada a 30°C, com uma pré-coluna equivalente (10 x 4,6 mm). A fase móvel foi metanol:água (70%:30%) com fluxo de 0,5  $\text{ml min}^{-1}$  para uma corrida isocrática de 15 minutos. A absorbância foi medida a 275 nm. A coleta de dados e a integração foram realizados com o software Class-CR10 (Shimadzu®, Tóquio, Japão). *trans*-Cinamato, o produto final da PAL, foi identificado por comparação com os valores do tempo de retenção do padrão. Controles paralelos sem L-fenilalanina ou com *t*-cinamato

(adicionado como padrão interno à mistura de reação) foram realizados como descrito por Ferrarese et al. (2000). A atividade da PAL foi expressa como  $\mu\text{mol trans-cinamato h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  peso da matéria fresca.

Para o ensaio da POD, raízes frescas (0,5 g) foram maceradas com 0,01 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 5 ml de tampão fosfato 67 mM, pH 7.0. O extrato foi centrifugado (2.200g, 5 min, 4°C), e o sobrenadante usado para determinar a atividade da POD solúvel. O precipitado foi incubado com 1 M de NaCl (2 ml, 1 h, 4°C). O homogeneizado foi centrifugado (2.200g, 5 min, 4°C) e o sobrenadante coletado continha a POD ligada (ionicamente) à parede celular. As atividades das enzimas foram determinadas de acordo com dos Santos et al. (2008). A mistura reativa (3 ml) continha tampão fosfato 25 mM (pH 6,8), guaiacol 2,58 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático. A oxidação do guaiacol foi seguida por 5 min a 470 nm, e a atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção de  $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade da POD foi expressa em  $\mu\text{mol tetraguaiacol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de peso da matéria fresca.

### **Quantificação do peróxido de hidrogênio**

Raízes frescas (2,0 g) foram homogeneizadas em 3 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 6.8 (Zanardo et al., 2009). O homogeneizado foi centrifugado (2.200g, 20 min) e, a seguir, 3 ml do extrato foram misturados com 1 ml de 0.1% de cloreto de titânio em 20% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (v/v). A mistura foi centrifugada a 2.200g por 15 min. A absorvância do sobrenadante foi determinada em 410 nm, usando como branco uma mistura reativa sem o extrato. O conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi calculado usando o coeficiente de extinção  $0,25 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressados em  $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  de peso da matéria fresca.

### **Quantificação de lignina e composição monomérica**

Após o período de incubação, as raízes secas (0,3 g) foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM (7 ml, pH 7,0) com gral e pistilo e transferido para um tubo de centrífuga (Ferrarese et al., 2002). O precipitado foi centrifugado (1.400g, 4 min), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: duas vezes com tampão fosfato pH 7,0 (7 ml); 3 vezes com 1% (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com 1,0 M NaCl em tampão pH 7,0

buffer (7 ml); 2 vezes com água destilada (7 ml) e 2 vezes com acetona (5 ml). O precipitado foi seco em estufa (60°C, 24 h) e resfriado em dessecador a vácuo. A massa seca foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas. A seguir, todo o material livre de proteínas foi colocado em um tubo de centrifuga contendo a mistura reativa (1,2 ml de ácido tioglicólico mais 6 ml de 2,0 M HCl) e aquecidas (95°C, 4 h). Após resfriamento à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (1.400g, 5 min) e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados continham o complexo ácido lignotioglicólico (LTGA). Os precipitados foram lavados 3 vezes com água destilada (7 ml) e o LTGA extraído por agitação (30°C, 18 h, 115 oscilações min<sup>-1</sup>) em 0,5 M NaOH (6 ml). Após centrifugação (1.400g, 5 min), o sobrenadante foi estocado. O precipitado foi lavado novamente com 0,5 M NaOH (3 ml) e misturado com o sobrenadante obtido anteriormente. Os extratos alcalinos combinados foram acidificados com HCl (1,8 ml). Após precipitação (0°C, 4 h), LTGA foi recuperado por centrifugação (1.400g, 5 min) e lavados 2 vezes com água destilada (7 ml). O precipitado foi seco a 60°C, dissolvido em 0,5 M NaOH e diluído para produzir absorvância apropriada para determinação espectrofotométrica a 280 nm. A lignina foi expressa como mg LTGA g<sup>-1</sup> por peso de matéria seca.

A oxidação alcalina do nitrobenzeno foi usada para determinar a composição monomérica de lignina (Zanardo et al., 2009). A fração da parede celular isenta de proteínas (50 mg) obtida acima foi lacrada em ampolas Pyrex<sup>®</sup> contendo 1ml de hidróxido de sódio (2mM) 0,1 ml de nitrobenzeno, e aquecidas a 170°C por 150 min, com agitação ocasional durante a reação. Após resfriamento espontâneo, à temperatura ambiente, a amostra foi lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada para pH 2,0 com HCl 2M, e extraída duas vezes com clorofórmio. O extrato orgânico foi combinado, seco e re-suspendido em 1 ml de metanol, e diluído com a fase móvel. Todas as amostras foram filtradas através de membranas descartáveis de 0,45 µm de porosidade e analisadas em HPLC. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20:80, v/v), com um fluxo de 1,2 ml min<sup>-1</sup> para uma corrida isocrática de 20 min. A quantificação dos aldeídos monoméricos (*p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído), liberados pela oxidação com nitrobenzeno, foi determinada a 290 nm, usando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos em µg monômero mg<sup>-1</sup> de parede celular.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado sendo que cada amostra foi

representada por um recipiente de vidro contendo 25 plântulas. Os dados foram expressos como a média de três a cinco experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média. A análise de variância, para testar a significância das diferenças observadas, foi realizada com o programa estatístico Sisvar<sup>®</sup> (Versão 4.6, UFLA, Brasil). Diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelos testes Dunnett e Scott Knott, e os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados com o estatisticamente significativos.

## **Resultados**

### **Efeitos do ácido cafeico no crescimento das raízes**

Os efeitos do ácido cafeico foram avaliados no crescimento das raízes de plântulas de soja crescidas durante exposição (24 h) em solução nutritiva (Tabela 1). O comprimento das raízes foi reduzido em 18,2% a 66,7% com o aumento da concentração de ácido cafeico de 0,25 para 2 mM, em comparação com o controle. Uma tendência similar foi evidenciada também para as biomassas das raízes, as quais diminuíram significativamente de 18,3% para 36,2% (biomassa fresca) e 17,9% para 25,3% (biomassa seca) nas mesmas concentrações avaliadas.

### **Efeitos do ácido cafeico nas atividades de PAL e POD e nos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Raízes de soja expostas a 1 e 2 mM de ácido cafeico revelaram significativa redução na atividade da PAL, 18,3% e 50,7% em relação ao controle ( $245 \pm 6,4 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  peso da matéria fresca) (Fig. 2), raízes expostas as demais concentrações do ácido cafeico (0,25 e 0,5 mM) não apresentaram resultado significativo. O aleloquímico aumentou a atividade da POD solúvel de 16,8% para 44,7%, quando comparado com o controle correspondente ( $6,04 \pm 0,14 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  peso da matéria fresca) (Fig. 3A). A atividade da POD ligada à parede celular aumentou significativamente, em torno de 30%, após exposição das raízes ao ácido cafeico 1 ou 2 mM, quando comparado com o controle ( $2,03 \pm 0,06 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  peso da matéria fresca) (Fig. 3B). O ácido cafeico também afetou os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 2). Os dados revelaram que os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diminuíram de 46,2% (0,25 mM) para níveis não detectáveis (1 mM e 2 mM), em relação ao controle ( $100,4 \pm 2,53 \text{ nmol g}^{-1}$  peso da matéria fresca).

## Efeitos do ácido cafeico no conteúdo de lignina e na sua composição monomérica

Os teores de lignina aumentaram cerca de 37% em relação ao controle ( $10,6 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1}$  de peso da matéria seca) (Fig. 4), após os tratamentos de 0,5 a 2 mM de ácido cafeico. A Fig. 5 revela que o PIP, um potente inibidor da cinamato 4-hidroxilase (C4H), reduziu o teor de lignina das raízes de soja em 22,8%, comparado ao controle. A exposição das raízes ao aleloquímico, aplicado juntamente com PIP (CA + PIP), não alterou significativamente o conteúdo de lignina comparado ao tratamento feito com ácido cafeico 1 mM. Experimentos com MDCA, um inibidor competitivo da 4-cumarato:CoA ligase (4CL) estão mostrados na mesma figura. Aplicado isoladamente, MDCA reduziu o conteúdo de lignina em 12,5%, em comparação com o controle. Juntamente com 1 mM de ácido cafeico, MDCA aumentou 76,6% o teor de lignina em relação ao tratamento com o aleloquímico.

A análise dos produtos da oxidação alcalina com nitrobenzeno (Tabela 3) revelou que, no tratamento das raízes com 1 mM de ácido cafeico, o conteúdo total dos monômeros de lignina (*p*-hidroxifenil + guaiacil + siringil; H+G+S) aumentou 46% ( $3,46 \text{ } \mu\text{g}$  de monômeros  $\text{mg}^{-1}$  de parede celular) quando comparado com raízes não tratadas ( $2,37 \text{ } \mu\text{g}$  de monômeros  $\text{mg}^{-1}$  de parede celular). Os monômeros H e G aumentaram 47% e 52%, respectivamente, após o tratamento com ácido cafeico, comparado com o controle. A mesma tabela mostra a composição monomérica após a exposição de raízes aos inibidores das enzimas C4H e 4CL (PIP e MDCA, respectivamente). Nas raízes tratadas com PIP, o conteúdo total H+G+S diminuiu 55% em comparação com o controle. Os monômeros G e S foram reduzidos em 64% e 67%, respectivamente. Após o tratamento com ácido cafeico juntamente com PIP, os teores de H+G+S foram  $2,45 \text{ } \mu\text{g}$  de monômeros  $\text{mg}^{-1}$  de parede celular e, portanto, similar ao controle, porém, menores quando comparado ao tratamento realizado apenas com o ácido cafeico ( $3,46 \text{ } \mu\text{g}$  de monômeros  $\text{mg}^{-1}$  de parede celular). Nas raízes tratadas com MDCA, os conteúdos de H+G+S diminuíram 27,4 % em comparação com o controle. Os monômeros G e S foram reduzidos em 36% e 45% respectivamente. Após tratamento com ácido cafeico juntamente com MDCA, o conteúdo total de H+G+S foi  $2,11 \text{ } \mu\text{g}$  de monômeros  $\text{mg}^{-1}$  de parede celular e, portanto, 39% menor que o tratamento feito apenas com o aleloquímico. Os monômeros G e S foram reduzidos em 47,1% e 43,2%, respectivamente.

## Discussão

As plantas são altamente suscetíveis aos aleloquímicos, os quais afetam principalmente o seu crescimento (Weir et al., 2004). Aleloquímicos como os derivados do ácido cinâmico, incluindo o ácido cafeico, inibem o comprimento das raízes e os pesos das matérias frescas e secas em diferentes espécies como ervilha (Vaughan e Ord, 1990), milho (Janovicek et al., 1997), canola (Baleroni et al., 2000a; Ng et al., 2003), *Arabidopsis thaliana* (Reigosa e Pazos-Malvido, 2007), pepino (Politycka e Mielzarz, 2007) e feijão (Batish et al., 2008). Como observado neste trabalho, o ácido cafeico também reduziu o comprimento e os pesos das matérias frescas e secas das raízes de soja (Tabela 1), confirmando a suscetibilidade dessa espécie e reforçando o papel deste fenilpropenóide como um alelopata.

Outro importante fato revelado neste trabalho foi que o crescimento (comprimento e biomassas) das raízes diminuiu (Tabela 1) após a exposição ao ácido cafeico, enquanto a produção de lignina aumentou (Fig. 4), seguida de modificações na sua composição monomérica (Tabela 3). Estudos anteriores (dos Santos et al., 2008; Zanardo et al., 2009) revelaram que a redução no crescimento das raízes de soja, causada por outros derivados do ácido cinâmico, tem sido associada com precoce lignificação. Devido a isto, uma possível entrada destes compostos na via dos fenilpropenóides, acompanhada por significativo aumento de lignina, enrijecendo a parede celular e restringindo o crescimento da raiz, tem sido sugerido como mecanismo de ação. Neste caso, tendência similar pode ser atribuída ao ácido cafeico.

A lignificação dos tecidos de plantas envolve a polimerização dos monolignóis primariamente derivados da via dos fenilpropenóides, que inicia com a reação da PAL formando derivados do cinamato e se encerra com a reação da POD formando unidades H, G e S do polímero de lignina (Boerjan et al., 2003). Nossos resultados mostraram que as menores concentrações de ácido cafeico (0,25 e 0,5 mM) aplicadas não afetaram a atividade da PAL, enquanto as maiores (1 e 2 mM) diminuíram a atividade enzimática (Fig. 2), apesar da produção de lignina não apresentar similar tendência (Fig. 4). É sabido que a atividade da PAL pode não ser afetada (Shann e Blum, 1987), estimulada (Politycka, 1999; dos Santos et al., 2004) ou, ainda, inibida (Sato et al., 1982; Zanardo et al., 2009) por diferentes aleloquímicos fenólicos. *In vitro*, 1 mM de ácido cafeico inibiu a atividade da PAL, extraída de batata e ervilha (Sato et al., 1982). Sob a condição experimental aplicada neste trabalho, é provável que o alto influxo exógeno de ácido cafeico para a via dos fenilpropenóides, pela ação 4CL, simultaneamente

reduziu a atividade da PAL e aumentou a produção de lignina. Pelo menos para as raízes tratadas com ácido cafeico, o impacto da PAL na biossíntese de lignina pode não ser crítico.

Para confirmar a hipótese de que o aumento do conteúdo de lignina, com a atividade da PAL inalterada ou reduzida, pode ser devido ao suprimento exógeno do ácido cafeico, a atividade da POD foi determinada em raízes de soja tratadas. O ácido cafeico aumentou a atividade da POD solúvel (Fig. 3A). Compostos alelopáticos derivados do ácido cinâmico, como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, aumentam a atividade da POD associada com a diminuição no crescimento das raízes em diferentes plantas (Devi e Prasad, 1996; dos Santos et al., 2004; Politycka et al., 2004). Em resposta ao ácido cafeico, as atividades da POD solúvel e outras enzimas antioxidativas (polifenoxidase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase e catalase) aumentaram em hipocótilos de feijão (Batish et al., 2008; Singh et al., 2009). Os estudos mencionados, e os resultados encontrados neste trabalho, reforçam o papel da POD solúvel como enzima que oxida ácidos fenólicos e que usa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como co-substrato (Passardi et al., 2005). Tendência similar foi observada na atividade da POD ligada à parede celular, o qual aumentou significativamente em resposta ao ácido cafeico quando comparado ao controle (Fig. 3B). POD ligada à parede celular está mais diretamente envolvida na lignificação dos tecidos vegetais (Ros Barceló et al., 2004; Passardi et al., 2005). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um substrato necessário para a lignificação da parede celular, catalisada pela POD ligada à parede celular, ocasionando ligações cruzadas dos polímeros de lignina na parede celular (Passardi et al., 2005). Levando em conta que a exposição das raízes de soja ao ácido cafeico afetou negativamente o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 2), isto pode explicar o aumento na atividade da POD (Fig. 2), seguido de aumento no conteúdo de lignina (Fig. 4).

Para avaliar a possível entrada do ácido cafeico na rota metabólica dos fenilpropenóides, experimentos usando dois inibidores de enzimas da via: PIP e MDCA foram realizados. O primeiro composto bloqueia irreversivelmente a C4H, uma enzima citocromo P450 que converte ácido *t*-cinâmico em ácido *p*-cumárico. O segundo composto é um inibidor competitivo da enzima 4CL, que converte o ácido hidroxicinâmico, incluindo o ácido cafeico, em tioésteres de hidroxicinamoil-CoA (Chakraborty et al., 2009). Suplementação do PIP ou MDCA reduziu os conteúdos de lignina quando comparado com o controle ou tratamento com ácido cafeico (CA) (Fig. 5). Raízes tratadas com ácido cafeico juntamente de PIP produziram a mesma quantidade de lignina em comparação com o tratamento feito com o composto em estudo. Esses resultados indicam que, de fato, PIP age antes do ponto de entrada do ácido cafeico na via. Quando

aplicado junto com MDCA, o ácido cafeico aumentou o conteúdo de lignina. Este inesperado resultado discorda de estudos anteriores mostrando que a produção de lignina não é afetada pela suplementação com ácido ferúlico (dos Santos et al., 2008) ou ácido *p*-cumárico (Zanardo et al., 2009), juntamente com MDCA; uma plausível indicação que ambos os aleloquímicos podem ser canalizados para a via dos fenilpropenóides pela reação da 4CL. Para avaliar se o aumento no conteúdo de lignina, após o tratamento com o ácido cafeico, juntamente com MDCA, representa resultados decorrentes de uma suposta reação entre os dois compostos, foram realizados experimentos para analisar a composição monomérica do polímero (Tabela 3). Em contraste com a lignina total (Fig. 4), o tratamento com ácido cafeico, juntamente com MDCA, reduziu os conteúdos dos monômeros de lignina G e S e H+G+S. Estes resultados indicam que o acesso exógeno do aleloquímico foi bloqueado pela reação da 4CL. Além disso, sugere que o ácido cafeico exógeno também pode ser canalizado para a via de fenilpropenóides neste ponto de entrada da via metabólica.

Em resumo, este estudo confirma que o aleloquímico ácido cafeico reduz o crescimento das raízes de soja. Em nível metabólico, ele é canalizado para a via dos fenilpropenóides e convertido em cafeoil-CoA pela reação da 4CL ou a ferulato, 5-hidroxiferulato e, finalmente, a sinapato. Posteriormente, esses metabólitos são convertidos em seus respectivos álcoois que são polimerizados em lignina na parede celular. Então, é razoável supor que a inibição do crescimento pelo ácido cafeico, nas raízes de soja, é devido à excessiva produção de monolignóis causada pela aplicação exógena do aleloquímico. Como consequência, ele aumenta a polimerização e a rigidez da parede celular restringindo o crescimento das plantas de soja.

## **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (Pronex) Ministério da Ciência e Tecnologia e da Fundação Araucária - PR. O. Ferrarese-Filho e M.L.L. Ferrarese são pesquisadores do CNPq. G.A. Bubna é bolsista do CNPq. Os autores agradecem à Aparecida M. D. Ramos pelo seu hábil apoio técnico.

## Referências

- Andrade AB, Ferrarese MLL, Teixeira AF, Ferrarese-Filho O. Mimosine-inhibited soybean (*Glycine max*) root growth, lignification and related enzymes. *Allelopathy J* 2008;21: 145–53.
- Baleroni CRS, Ferrarese MLL, Braccini AL, Scapim CA, Ferrarese-Filho O. Effects of ferulic and caffeic acids on canola (*Brassica napus* L. cv. Hyola 401) seed germination. *Seed Sci Technol* 2000a;28: 201–07.
- Baleroni CRS, Ferrarese MLL, Souza, NE, Ferrarese-Filho O. Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives. *Biol Plant* 2000b;43: 313-16.
- Barkosky RR, Einhellig FA, Butler JL. Caffeic acid-induced changes in plant-water relationships and photosynthesis in leafy spurge (*Euphorbia esula*). *J Chem Ecol* 2000;286: 2095–09.
- Batish DR, Singh HP, Kaur S, Kohli RK, Yadav SS. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Plant Physiol* 2008;165: 297–05.
- Baziramakenga R, Leroux GD, Simard RR. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *J Chem Ecol* 1995;21: 1271–85.
- Baziramakenga R, Leroux GD, Simard RR, Nadeau P. Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings. *Can J Bot* 1997;75: 445–50.
- Blum U, Gerig TM. Interrelationships between caffeic acid, evapotranspiration, soil water content, and leaf expansion. *J Chem Ecol* 2006;32: 1817–34.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 2003;54: 519–46.
- Chakraborty M, Karun A, Mitra A. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *J Plant Physiol* 2009;166: 63–41.
- Devi SR, Prasad MNV. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Biol Plant* 1996;38: 387–95.
- Doblinski PMF, Ferrarese MLL, Huber DA, Scapim CA, Ferrarese-Filho O. Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to *p*-coumaric and *p*-hydroxybenzoic acids. *Braz Arch Biol Technol* 2003;46: 193–98.
- dos Santos WD, Ferrarese MLL, Finger A, Teixeira ACN, Ferrarese-Filho O. Lignification and related enzymes in soybean root growth-inhibition by ferulic acid. *J Chem Ecol* 2004;30: 1199–08.

- dos Santos WD, Ferrarese MLL, Nakamura CV, Mourão KSM, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J Chem Ecol* 2008; 34: 1230–41.
- Ferrarese MLL, Rodrigues JD, Ferrarese-Filho O. Phenylalanine ammonia lyase activity in soybean roots extract measured by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Plant Biol* 2000;2: 152–3.
- Ferrarese, M.L.L.; Zottis, A.; Ferrarese-filho, O. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. *Biologia*. v.57, p.541–3, 2002.
- Glass ADM. Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. *Plant Physiol* 1973;51: 1037–41.
- Glass ADM. Influence of phenolic acids on ion uptake. III. Inhibition of potassium absorption. *J. Exp. Bot* 1974;25: 1104–13.
- Herrig V, Ferrarese MLL, Suzuki LS, Rodrigues JD, Ferrarese-Filho O. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. *Biol Res* 2002;35: 59–66.
- Inderjit, Duke SO. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* 2003;217: 529–39.
- Janovicek KJ, Vyn TJ, Voroney RP, Allen OB. Early corn seedling growth response to phenolic acids. *Can J Plant Sci* 1997;77: 391–3.
- Kong L, Wang F, Si J, Feng B, Li S. Water-soluble phenolic compounds in the coat control germination and peroxidase reactivation in *Triticum aestivum* seeds *Plant Growth Reg* 2008;56: 275–08
- Kováčik J, Klejdus B, Backor M, Repcak M. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Sci* 2007;172: 393–9.
- Miller HG, Ikawa M, Peirce LC. Caffeic acid identified as an inhibitory compound in asparagus root filtrate. *Hortscience* 1991;26: 1525–7.
- Ng PLL, Ferrarese MLL, Huber DA, Ravagnani ALS, Ferrarese-Filho O. Canola (*Brassica napus* L.) seed germination influenced by cinnamic and benzoic acids and derivatives: effects on peroxidase. *Seed Sci Technol* 2003;31: 39–46.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 2005;24: 255–65.

- Politycka B. Ethylene-dependent activity of phenylalanine ammonia-lyase and lignin formation in cucumber roots exposed to phenolic allelochemicals. *Acta Soc Bot Pol* 1999;68: 123–7.
- Politycka B, Kozłowska M, Mierlcarz B. Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. *Allelopathy J* 2004; 13: 29–35.
- Politycka B, Mielcarz B. Involvement of ethylene in growth inhibition of cucumber roots by ferulic and *p*-coumaric acids. *Allelopathy J* 2007;19: 451–60.
- Reigosa MJ, Pazos-Malvido E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *J Chem Ecol* 2007;33: 1456–66.
- Rice EL. *Allelopathy*. Orlando, FL: Academic Press; 1984.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón NC, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS, Pedreno MA. Basic peroxidases: the gateway from lignin evolution? *Phytochem Rev* 2004;3: 61–78.
- Sato T, Kiuchi F, Sankawa U. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochemistry* 1982;21: 845–50.
- Shann JR, Blum U. The utilization of exogenously applied ferulic acid in lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 1987;26: 2977–82.
- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Kohli KR. Caffeic acid inhibits in vitro rooting in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] hypocotyls by inducing oxidative stress. *Plant Growth Reg* 2009;57: 21–30.
- Soares AR, Ferrarese MLL, Siqueira RC, Bohm FMLZ, Ferrarese-Filho O. L-DOPA increases lignification associated with *Glycine max* root growth-inhibition. *J Chem Ecol* 2007;33: 265–75.
- Vaughan D, Ord B. Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. *J Sci Food Agric* 1990;52: 289–99.
- Weir TL, Park SW, Vivanco JM. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr Opin Plant Biol* 2004, 472–9.
- Whitehead DC. Identification of *p*-hydroxybenzoic, vanillic, caffeic and ferulic acids in soils. *Nature* 1974;202: 417–8.
- Zanardo DIL, Lima RB, Ferrarese MLL, Bubna GA, Ferrarese-Filho O. Soybean root growth inhibition and lignification induced by *p*-coumaric acid. *Environ Exp Bot* 2009;66: 25–30.

**Tabela 1.** Comprimento, biomassa fresca e seca das raízes de soja, tratadas com ácido cafeico por 24 horas.

Ácido cafeico (mM)	Comprimento das raízes		Biomassa fresca		Biomassa seca	
	(cm)	%	(g)	%	(g)	%
0	3,36 ± 0,21		2,68 ± 0,02		0,162 ± 0,001	
0,25	2,75 ± 0,14*	18,2	2,19 ± 0,13*	18,3	0,133 ± 0,007*	17,9
0,5	2,35 ± 0,13*	30,0	2,15 ± 0,04*	19,8	0,130 ± 0,004*	19,8
1	1,67 ± 0,06*	50,3	1,75 ± 0,13*	34,7	0,129 ± 0,009*	20,4
2	1,12 ± 0,09*	66,7	1,71 ± 0,12*	36,2	0,121 ± 0,005*	25,3

Médias ( $N = 5 \pm$  erro padrão da média) significativamente menores que o experimento controle (comparado ao teste Dunnett) estão sinalizadas com \*. ns = não significativo em nível de 0,05. O simbolo % representa inibição média em comparação com o controle (0 mM).

**Tabela 2.** Teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas raízes de soja tratadas com ácido cafeico por 24 horas.

	Ácido cafeico (mM)				
	0	0,25	0,5	1	2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol g <sup>-1</sup> )	100,4 ± 2,53	54,0 ± 9,8	27,0 ± 4,90	nd	nd

nd = não detectado

**Tabela 3.** Composição de monômeros de lignina de raízes de soja não tratadas (Controle) ou tratadas com 1 mM ácido cafeico (CA), 0,1 mM ácido piperonílico (PIP), 1 mM CA mais 0,1 mM ácido piperonílico (CA + PIP), 2 mM ácido metileno dioxocinâmico (MDCA) e 1 mM CA mais 2 mM ácido metileno dioxocinâmico (CA + MDCA) por 24 h. Resultados expresos em  $\mu\text{g}$  monômero  $\text{mg}^{-1}$  de parede.

Monômero	Control	CA	PIP	CA + PIP	MDCA	CA + MDCA
H	$0,34 \pm 0,007^b$	$0,50 \pm 0,032^a$	$0,34 \pm 0,006^b$	$0,48 \pm 0,011^a$	$0,46 \pm 0,014^a$	$0,53 \pm 0,043^a$
G	$1,70 \pm 0,102^b$	$2,59 \pm 0,116^a$	$0,62 \pm 0,023^d$	$1,66 \pm 0,126^b$	$1,08 \pm 0,027^c$	$1,37 \pm 0,016^d$
S	$0,33 \pm 0,036^a$	$0,37 \pm 0,012^a$	$0,11 \pm 0,010^b$	$0,31 \pm 0,067^a$	$0,18 \pm 0,017^b$	$0,21 \pm 0,018^b$
H+G+S	$2,37 \pm 0,095^b$	$3,46 \pm 0,099^a$	$1,07 \pm 0,019^d$	$2,45 \pm 0,162^b$	$1,72 \pm 0,055^c$	$2,11 \pm 0,219^b$

H, *p*-hidroxifenil; G, guaiacil; S, siringil

Valores médios $\pm$ epm ( $N = 4$ ) seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 2.** Efeitos do ácido cafeico na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL). Médias  $\pm$  SE ( $N = 3$ ) seguidas por mesma letras não são significativamente diferentes de acordo com o teste Dunnett ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 3.** Efeitos do ácido cafeico na peroxidase (POD) solúvel (A) e ligada a parede celular (B). Médias  $\pm$  SE ( $N = 5$ ) seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste Dunnett ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 4.** Efeitos do ácido cafeico no conteúdo de lignina. Médias  $\pm$  SE ( $N = 4$ ) seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste Dunnett ( $p \leq 0.05$ ).

**Fig. 5.** Mudanças no conteúdo de lignina em raízes de soja não tratadas (Controle) ou tratadas com 1,0 mM ácido cafeico (CA), 0,1 mM ácido piperonílico (PIP), 1 mM CA mais 0,1 mM ácido piperonílico (CA+PIP), 2 mM ácido metileno dioxocinâmico (MDCA) e 1 mM CA mais 2 mM ácido metileno dioxocinâmico (CA+MDCA) por 24 h. Médias  $\pm$  S.E. ( $N=4$ ) seguido por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Fig. 2

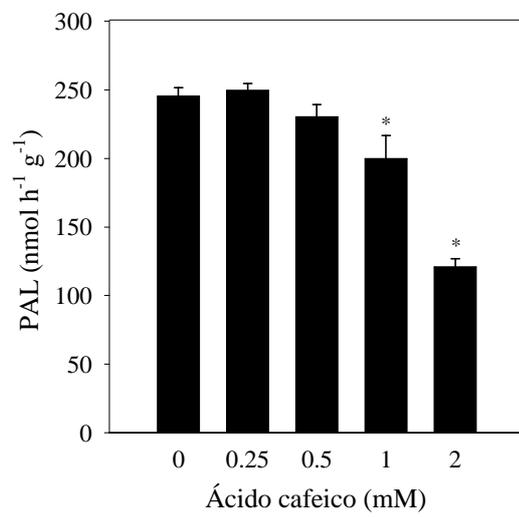


Fig. 3

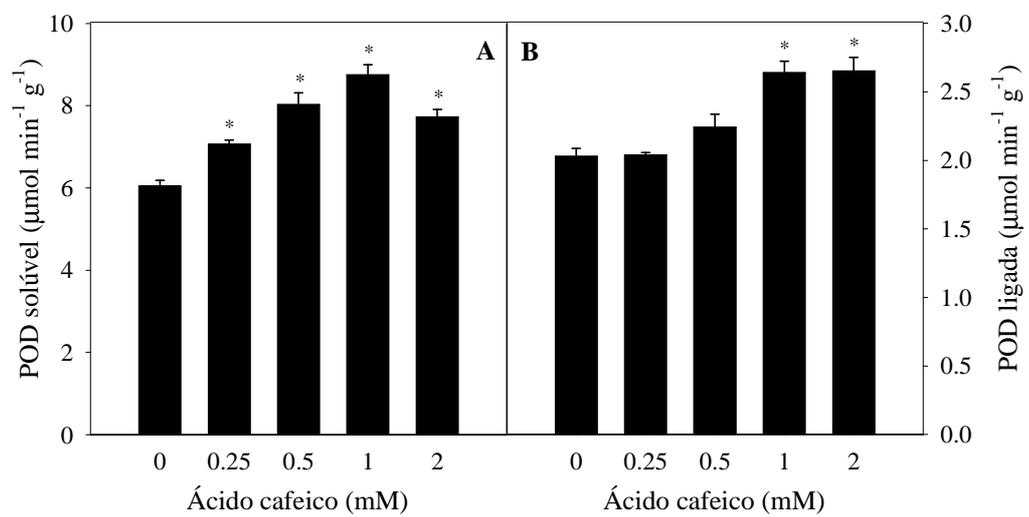


Fig. 4

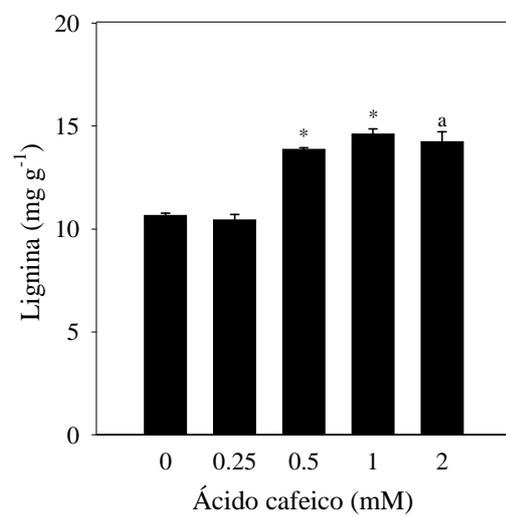
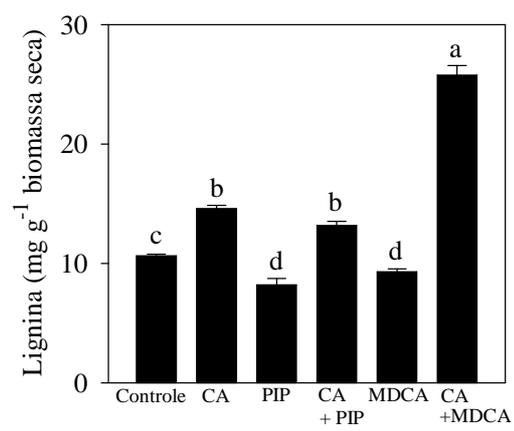


Fig. 5



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)