

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL**

**ASSIMILAÇÃO E TRANSPORTE DE NITROGÊNIO EM  
*Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl**

**MARIA REGINA SOARES LOPES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Luciano do Amarante, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências (MS).

PELOTAS  
Rio Grande do Sul – Brasil  
Abril de 2008

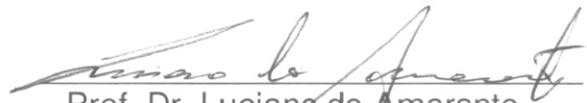
MARIA REGINA SOARES LOPES

**ASSIMILAÇÃO E TRANSPORTE DE NITROGÊNIO EM  
*Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof.Dr.Luciano do Amarante, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências (MS).

Aprovada : 11 de Abril de 2008

  
Prof. Dr. Nei Fernandes Lopes

  
Prof. Dr. Luciano do Amarante  
(Orientador)

  
Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza

***Ao Honscha, Gisele e Michael  
com todo amor.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

A Universidade Católica de Pelotas pelo apoio.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luciano do Amarante, por sua paciência, amizade e orientação.

À Professora Dra. Beatriz Rocha, por sua amizade durante o transcorrer do curso.

Aos amigos Sabrina Martinez, Leandro Araújo, Pablo Badineli, Ivan Zen Zen, Elisane Tessmann, Denis, Alitcia Kleinowski meus companheiros de incontáveis idas e vindas da casa de vegetação ou pelo auxílio nas avaliações laboratoriais dos meus experimentos.

À Professora Dra. Maria Antonieta de Oliveira por sua ajuda incansável e entusiasmo com relação à minha pesquisa.

Aos colegas e amigos Letícia Burlamaqui, Roberto Funck e Fabian T. Primo pelo incentivo.

Aos Professores e Funcionários dos Departamentos de Botânica e Bioquímica.

Merecem agradecimentos especiais a colega Heloisa Lagos e a Farmácia Dermakos pelo apoio e patrocínio desse trabalho.

E ao amigo dedicado Vitor Clasen que em todas as horas, dia ou noite, auxiliava em todas as tarefas tornando viável a execução do meu trabalho.

*Aquele que dá a semente ao semeador  
e o pão para comer,  
vos dará rica sementeira ,  
e aumentará os frutos da vossa justiça.*

*(II Cor 9 -10).*

## ÍNDICE

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>viii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS, ECOLÓGICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS DE <i>Brugmansia suaveolens</i> (WILLD.) BERCHT. & J. PRESL. ....	12
1.1.1 Aspectos botânicos e agronômicos .....	12
1.1.2 Aspectos Ecológicos .....	15
1.1.3 Aspectos Etnofarmacológicos .....	16
1.2 ALCALÓIDES TROPÂNICOS .....	18
1.3 ASPECTOS BÁSICOS DA ASSIMILAÇÃO PRIMÁRIA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS .....	22
1.3.1 Principais formas de N disponíveis às plantas .....	22
1.3.2 Absorção e transporte de N inorgânico em plantas .....	22
1.3.3 Redução do NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> em plantas .....	23
1.3.4 Assimilação de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> em plantas .....	26
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	29
2.1.1 Soluções nutritivas .....	29
2.2 TRATAMENTOS EMPREGADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	30
2.2.1 Influência do NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> e aminoácidos sobre o transporte e assimilação de N .....	30
2.2.2 Delineamento experimental .....	31
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	32
2.3.1 Coleta de exsudato do xilema .....	33
2.3.2 Extração de aminoácidos, nitrato e amônia de raízes e folhas .....	32
2.3.3 Extração de proteínas .....	34

2.3.4 Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema e de extrato de raízes e folhas .....	34
2.3.5 Dosagem de aminoácidos solúveis livres totais (ALT) .....	35
2.3.6 Dosagem de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).....	36
2.3.7 Dosagem de Amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).....	36
2.3.8 Dosagem de proteínas .....	37
2.3.9 Dosagem das enzimas da assimilação da amônia nas raízes e folhas.....	37
2.3.9.1 Glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2) .....	37
2.3.9.1.1 Extração .....	37
2.3.9.1.2 Dosagem da atividade da GS.....	38
2.3.9.2 Dosagem da redutase do nitrato ( E. 1.6.6.1).....	40
2.3.9.2.1 Obtenção da fonte de enzimas.....	40
2.3.9.2.2 Dosagem da atividade da RN.....	41
2.3.10 Determinação do teor de clorofilas.....	41
2.3.11 Análise de alcalóides.....	42
2.3.11.1 Obtenção da amostra .....	42
2.3.11.2 Extração .....	42
2.3.11.3 Identificação .....	43
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
3.1 TRANSPORTE E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE BRUGMANSIA SUAVEOLENS NUTRIDAS COM DIFERENTES FONTES NITROGENADAS.....	45
3.1.1 Composição nitrogenada da seiva do xilema e constituinte do sistema radical e aéreo de plantas de <i>Brugmansia suaveolens</i> nutridas com diferentes fontes de nitrogênio .....	45
3.1.2 Atividade das enzimas redutase do nitrato (RN; EC 1.6.6.1) e glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) em raízes e folhas de plantas de <i>Brugmansia suaveolens</i> nutridas diferentes fontes de nitrogênio .....	58
3.1.3 Caracterização e Identificação de alcalóides. ....	60
4 CONCLUSÕES .....	62
REFERÊNCIAS.....	63

## SUMÁRIO

LOPES, MARIA REGINA SOARES, M.Sc.Universidade Federal de Pelotas, abril de 2008. **Assimilação e transporte de nitrogênio em *Brugmansia suaveolens*** (Willd)Bercht & J.Presl. Professor orientador: Dr.Luciano do Amarante

Vários alcalóides com importantes atividades biológicas são isolados de espécies da família Solanaceae. *Brugmansia suaveolens* é cultivada com a finalidade de produção de medicamentos fitoterápicos e apresenta potencial como matéria prima para o isolamento de escopolamina para a indústria farmacêutica. No estado do Rio Grande do Sul, é encontrada em condições naturais e cultivada como planta ornamental. O conhecimento detalhado do processo de assimilação e do transporte de nitrogênio em *Brugmansia suaveolens* possibilita a elaboração de estratégias para o cultivo mais eficiente desta espécie, visando à produção de alcalóides, metabólitos secundários nitrogenados. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da nutrição sobre as atividades das enzimas redutase do nitrato (RN) e de glutamina sintetase (GS) em raízes e folhas, e sobre o teor de moléculas nitrogenadas importantes em folhas, raízes e seiva do xilema. Para isso, variou-se a fonte de nitrogênio entre  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos (glutamina, fenilalanina, arginina),  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . O aminoácido glutamina constituiu o principal componente orgânico da fração nitrogenada transportada no xilema frente às diferentes fontes de nitrogênio, exceto  $\text{NO}_3^-$ . Dentre as formas inorgânicas, teores elevados de amônio foram detectados em todos os tratamentos, ao passo que o nitrato predominou nas plantas sob tratamentos na presença desse íon. As atividades de RN e de GS foram elevadas nas folhas e pouco significativas nas raízes, o que sugere que as folhas são os sítios preferenciais de assimilação de nitrogênio nesta espécie.

## SUMMARY

LOPES, MARIA REGINA SOARES, M.Sc. Universidade Federal de Pelotas, abril de 2008. **Assimilação e transporte de nitrogênio em *Brugmansia suaveolens*** (Wild) Bercht & J. Presl. Major professor: Dr. Luciano do Amarante

Several alkaloids with important biological activities have been isolated from species of the Solanaceae family. *Brugmansia suaveolens* has been cultivated to the purpose of phytotherapeutic medicines production and shows a potential as raw material for the isolation of scopolamine for the pharmaceutical industry. In Rio Grande do Sul State, it is found in natural conditions and grown as ornamental plant. The detailed knowledge of the process of nitrogen assimilation and transport in *Brugmansia suaveolens* enables the development of strategies for more efficient cultivation of this species, aiming the production of alkaloids, secondary nitrogen metabolites. This study aimed to determine the effect of nutrition on the activities of the nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) enzymes in the roots and leaves, and on the content of important nitrogen molecules in leaves, roots and xylem sap. For that, the source of nitrogen varied among  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , amino acids (glutamine, phenylalanine, arginine),  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ . The amino acid glutamine was the main organic component of the nitrogen fraction carried in the xylem, among the different sources of nitrogen, except  $\text{NO}_3^-$ . Among the inorganic forms, high levels of ammonium were detected in all treatments, while the nitrate predominated in plants under treatments in the presence of that ion. The NR and GS activities were high in the leaves and little significant in the roots, which suggests that the leaves are the preferred sites of nitrogen assimilation in this species.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALT</b> .....	Aminoácidos solúveis livres totais
<b>AS</b> .....	Asparagina sintetase
<b>Asp</b> .....	Asparagina
<b>ATP</b> .....	Trifosfato de adenosina
<b>CCD</b> .....	Cromatografia de camada delgada
<b>DTT</b> .....	Ditiotreitol
<b>Fdx-GOGAT</b> ....	Ferredoxina glutamato sintase
<b>Gln</b> .....	Glutamina
<b>Glu</b> .....	Glutamato
<b>GOGAT</b> .....	Glutamato sintase
<b>GOT</b> .....	Glutamato oxalacetato transaminase
<b>GS</b> .....	Glutamina sintetase
<b>GS1</b> .....	Isoenzima citosólica da GS
<b>GS2</b> .....	Isoenzima plastídica da GS
<b>HPLC</b> .....	Cromatografia líquida de alta resolução
<b>NADH</b> .....	$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
<b>NADPH</b> .....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> .....	Íon amônio
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> .....	Íon nitrato
<b>OPA</b> .....	O-Ftaldialdeído
<b>RN</b> .....	Redutase de nitrato
<b>RNi</b> .....	Redutase de nitrito
<b>USP 24</b> .....	The United States Pharmacopeia 24

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	<i>Brugmansia suaveolens</i> (Willd.) Bercht. & J. Presl, arbusto de flores amarelas.....	13
<b>Figura 2 -</b>	Flor de <i>Brugmansia suaveolens</i> , biótipo rosa.....	14
<b>Figura 3 -</b>	Frutos de <i>Brugmansia suaveolens</i> com sementes.....	14
<b>Figura 4 -</b>	Trombeteira associada com <i>Ricinus</i> em córrego em bairro no Município de Pelotas, biótipo branco.....	16
<b>Figura 5 -</b>	Biossíntese de alcalóides tropânicos.....	19
<b>Figura 6 -</b>	Redução do Nitrato em Amônio.....	24
<b>Figura 7 -</b>	Enzimas que participam na assimilação de amônio.....	28
<b>Figura 8 -</b>	Esquema de extração de aminoácidos, amônio, nitrato e proteínas	33
<b>Figura 9 -</b>	Esquema de extração da enzima glutamina sintetase.....	38
<b>Figura 10 -</b>	Esquema de obtenção da enzima redutase do nitrato.....	40
<b>Figura 11 -</b>	Extração de alcalóides.....	43
<b>Figura 12 -</b>	Teor de nitrato em seiva de xilema, raiz e folha.....	46
<b>Figura 13 -</b>	Teor de amônio em seiva de xilema, raiz e folha.....	47
<b>Figura 14 -</b>	Teor de Aminoácidos totais de seiva de xilema, raiz e folhas.....	48
<b>Figura 15 -</b>	Composição de aminoácidos predominantes de seiva de xilema..	49
<b>Figura 16 -</b>	Composição de aminoácidos com teores abaixo de 4 % em xilema.....	50
<b>Figura 17 -</b>	Composição de aminoácidos predominantes ( %) em raízes...	51
<b>Figura 18 -</b>	Composição de aminoácidos presentes, inferior a 18 % em raiz.....	53
<b>Figura 19 -</b>	Composição de aminoácidos predominantes em folhas.....	54
<b>Figura 20 -</b>	Composição de aminoácidos inferior a 19 % em folha.....	55
<b>Figura 21 -</b>	Teor de proteínas solúveis em raízes e folhas.....	57
<b>Figura 22 -</b>	Teor de clorofila a, b e total em folhas.....	58
<b>Figura 23 -</b>	Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes.....	59
<b>Figura 24 -</b>	Atividade da glutamina sintetase em folhas e raízes.....	60
<b>Figura 25 -</b>	Análise cromatográfica de extrato de folhas e flores de <i>Brugmansia suaveolens</i> .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS, ECOLÓGICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS DE *Brugmansia suaveolens* (WILLD.) BERCHT. & J. PRESL.

#### 1.1.1 Aspectos botânicos e agronômicos

A denominação *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl. tem como origem, segundo Flora Ilustrada Catarinense (1966) o nome *Brugmansia* – em homenagem a Sebastian J. Brugmans, professor de História Natural em Leyden; e *suaveolens* do latim “suavis”: doce, agradável; “olens”: cheiro, aromático (pelas flores suavemente perfumadas), especialmente, abrindo de preferência à noite. Tem como nome popular trombeteira, coerana, saia-branca, aguadeira, buzina, trombeta-dos-anjos, trombeta, zabumba-branca, babado. Descrita pela bibliografia européia, ainda pelos nomes vulgares, trombetão, cornucópia, chamico, rainha da noite (COSTA, 1994).

Arbusto com até 2-3 m de altura, caule lenhoso e ramificado; folhas alternas, pecioladas, de limbo ovalado a elíptico de margem inteira ou sinuosa, com base obtusa e geralmente assimétrica, com ápice agudo ou acuminado, com até 0,3 m de comprimento por 0,14 m de largura, pilosas em ambas faces quando novas e geralmente glabrescentes, na face superior quando mais velhas Possuem cheiro pouco pronunciado ou nulo e sabor amargo (REITZ, 1966; COSTA, 1994) (Figura 1).



**Figura 1** - *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl, arbusto de flores amarelas.

Ocorrem variedades distinguidas pelas corolas simples ou múltiplas e pela coloração dessas corolas. Arbusto de vasta dispersão, sobretudo pela zona da mata pluvial da encosta atlântica, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (REITZ, 1966). Hoje vastamente dispersada por ser cultivada como ornamental. Planta perene geralmente multiplicada vegetativamente, pois a formação de frutos e sementes é rara.

As flores são aromáticas, campanuladas, isoladas, longamente pedunculadas, pendentes, com até 0,3 m de comprimento. O cálice é tubuloso, inflado e caduco, com até 0,12 m de comprimento, possui cinco pequenos lobos na parte terminal, glabro e verde. A corola com lobos longamente caudados, de coloração geralmente branca, havendo variedades de corolas amarelas ou róseas. Os estames são inseridos na base da corola, profundamente inclusos, sendo as anteras conglutinadas (REITZ, 1966; COSTA, 1994) (Figura 2).



**Figura 2** - Flor de *Brugmansia suaveolens*, biótipo rosa.

Os frutos são delgados fusiformes, medindo 100 a 150 mm de comprimento, com 20 mm de diâmetro, liso bilocular indeiscente. As sementes são angulosas e rugosas (REITZ, 1966) (Figura 3).



**Figura 3** - Frutos de *Brugmansia suaveolens*, com sementes.

A propagação por sementes em geral não é preferencial por ter grande variabilidade genética e desenvolvimento lento, enquanto que por estacas, o desenvolvimento é mais homogêneo, garantindo maior uniformidade até mesmo quanto à composição química da planta (REITZ, 1966).

As plantas desenvolvem-se melhor em solos ricos em matéria orgânica, drenados, aerados, preferencialmente arenosos, quando encharcados ou muito compactados afetam o desenvolvimento da espécie. No estado de Santa Catarina a trombeteira é cultivada como atividade econômica em agricultura familiar. Apenas 50 % da parte aérea (folhas e flores) são colhidas, totalizando três a quatro colheitas no ano, com produtividade de 5 a 8 t/ano. O produto, depois de desidratado, é encaminhado à indústria e transformado em xaropes ou procede-se o isolamento de escopolamina pura, na busca por alternativas na obtenção de maior rendimento (LUNARDI *et al.*, 2007).

A cultura de plantas medicinais, para utilização na produção de fitoterápicos, bem como a obtenção de seus metabólitos isolados, está sujeita a variações do clima, da disponibilidade de nutrientes do solo para semear, doenças, métodos variados de seleção e secagem, os quais influenciam a qualidade e quantidade, e variação inerente de componentes ativos que surgem de plantas das mesmas espécies com características genéticas diferentes (TREASE, 1996).

### **1.1.2 Aspectos Ecológicos**

É uma espécie que cresce frequentemente em lugares úmidos, que cresce espontaneamente à beira de rios e em várzeas úmidas, terrenos baldios, orla das matas, e nas proximidades das habitações. Desenvolve-se melhor em regiões de clima temperado até subtropical úmido. Geadas podem ser prejudiciais, mas a planta rebrota após o período mais crítico (REITZ, 1966).

*Brugmansia* é encontrada na natureza principalmente em locais destruídos, por exemplo, após destruição do “tapete de plantas” por deslizamento de terra ou vendavais. Na maioria das vezes, são culturas secundárias em lugares onde há influência humana, ou em regiões de impacto pela atividade humana, por exemplo, locais planos, ao redor de plantações, beira de estradas ou em locais de despejo. Em todos esses lugares, o solo é principalmente rico em nitrogênio. Na região que

envolve os municípios de Pelotas, Rio Grande, São Lourenço do Sul, Jaguarão, Canguçu, Tapes observa-se, como vegetação associada, a mamona (*Ricinus communis* L.) e ipoméia (*Ipomea purpurea* Lam.) (Figura 4).



**Figura 4** - Trombeteira associada com *Ricinus* em córrego em bairro no Município de Pelotas, biótipo branco.

### 1.1.3 Aspectos Etnofarmacológicos

O estudo das plantas bioativas cresce anualmente no Brasil e no mundo. Junto com estes estudos aumentam o interesse e o conhecimento sobre os diversos princípios ativos, dentre os quais, os alcalóides, que possuem atividade biológica e enorme utilidade.

Assim, são descobertas as plantas medicinais, mas também as tóxicas. Estas costumam ser belas, com suas flores coloridas e atrativas, trazendo um grande risco às pessoas que as desconhecem. A partir da utilização empírica das plantas, são obtidas novas drogas, formando um vastíssimo arsenal fitoterápico. O Brasil é detentor de diversidade cultural e étnica que resultou em conhecimentos passados de geração a geração sobre usos e manejo da planta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Na medicina popular, existe grande variação nas indicações e na forma de uso da trombetaira. Algumas citações como: banho de vapor com as folhas, bem como, o cigarro das folhas e flores secas e enroladas entre as mãos são usados para tratamento de tosses rebeldes e bronquites; suco das folhas é aplicado em queimaduras, escoriações, inflamações e hemorróidas.

Emplastos das folhas são aplicados em área artrítica e reumática, sendo as folhas esmagadas e aplicadas sobre a articulação afetada. Extratos das folhas misturados com manteiga são utilizados no tratamento de reumatismo articular (COSTA, 1994; SIMÕES *et al.*, 1999).

Deve-se salientar, também, que há relatos da população de desconfiança, medo e curiosidade com relação à aproximação e uso desta planta, informando que as mesmas não devem ser usadas como chá, nem ingeridas de outra forma natural (SCHULTES e HOFMANN, 2000). Os alcalóides contidos na trombetaira são tóxicos quando ingeridos sem estar quantificado por esta razão suas folhas e flores secas devem ser utilizadas exclusivamente como insumo farmacêutico.

As espécies de *Brugmansia* são nativas da América do Sul. No passado a *Brugmansia* v. era considerada como um subgênero da *Datura*. Entretanto, os recentes e minuciosos estudos biológicos destas plantas demonstram que devem ser classificadas dentro de um gênero próprio. As propriedades das espécies e sua distribuição local indicam uma grande relação com o homem (SCHULTES e HOFMANN, 2000).

O gênero *Datura* era empregado na Ásia. Na Europa ocorreu durante a Antigüidade, quando foi utilizado quase, exclusivamente, em bruxarias e adivinhações. Entre as principais plantas empregadas, o toloache (*Datura innoxia* Mill.), belenho (*Hyoscyamus niger* L.). Na África eram utilizados a mandrágora, a beladona e a erva de carniola (*Scopolia*), e no Novo Mundo, também o gênero *Brugmansia*, todos pertencentes à família das Solanáceas (COUTEUR e BURRESON, 2000)

É possível que o uso alucinógeno da *Brugmansia* seja proveniente do conhecimento de seu parente próximo, *Datura*, que os ancestrais dos indígenas trouxeram ao novo mundo em fins da era Paleolítica e no período Mesolítico. Tudo que se refere ao uso da *Brugmansia* é muito antigo, e tem um significado mágico e religioso na América do Sul (SCHULTES e HOFMANN, 2000).

Nas zonas quentes da Amazônia ocidental a *B. suaveolens*, *B. versicolor* e *B. insignis* são usadas sozinhas como alucinógenos ou misturadas com “ayahuasca” (bebida preparada geralmente com duas espécies do gênero *Banisteriopsis*). Os indígenas dos Andes da Colômbia utilizam várias espécies silvestres e um bom número de cultivares locais onde tem desenvolvido profundo conhecimento sobre os efeitos destas plantas. Estes cultivos recebem nomes nativos descritos com variabilidade botânica e uso (SCHULTES e HOFMANN, 2000).

## 1.2 ALCALÓIDES TROPÂNICOS

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas em plantas. Um ou mais átomos de nitrogênio, estão presentes como aminas, principalmente secundárias e terciárias, conferindo o caráter básico para o alcalóide, facilitando seu isolamento e purificação e permitindo a formação de sais solúveis em água na presença de ácidos minerais.

O átomo de N dos alcalóides é originado de aminoácidos, e em geral, o esqueleto de carbono de um aminoácido particular precursor, é também largamente mantido intacto na estrutura do alcalóide, embora o carbono do ácido carboxílico seja frequentemente perdido por meio de descarboxilação. Relativamente poucos aminoácidos precursores estão atualmente envolvidos na biossíntese de alcalóides. No caso dos alcalóides tropânicos, participam a ornitina, aminoácido não protéico, que em plantas é derivada principalmente do glutamato. A ornitina fornece o bloco de construção C<sub>4</sub>N, para a formação do anel pirrolidina dos alcalóides tropânicos, inicialmente como o cátion,  $\Delta^1$ -pirrolíneo. Os blocos de carbono freqüentemente incorporados são também de outras vias metabólicas, no caso dos carbonos extras do tropano, derivados do acetato via acetil-CoA. Entretanto há um grande número de alcalóides que vão adquirir seu átomo de N via reação de transaminação (DEWICK, 1997).

Os alcalóides deste grupo são ésteres de ácidos derivados do aminoácido fenilalanina, por processo de rearranjos (Figura 5)

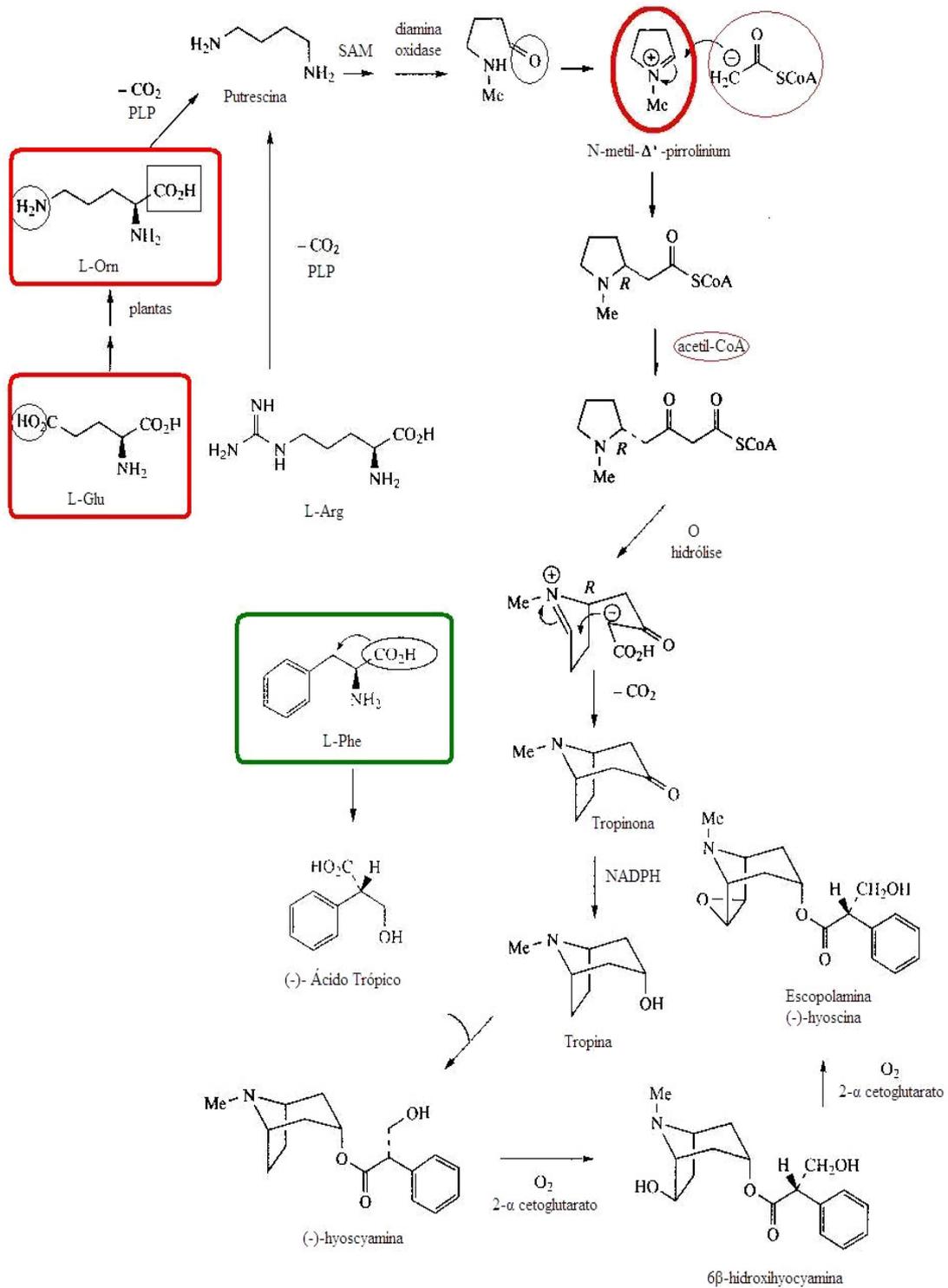


Figura 5 - Biossíntese de alcalóides tropânicos (DEWICK, 1997 modificado.)

As Solanáceas *B. arbórea*, *B. áurea*, *B. sanguinea*, *B. suaveolens* e *B. versicolor* contêm os mesmos alcalóides tropânicos que as Daturas. Os principais são escopolamina (hioscina), hiosciamina, atropina, e vários alcalóides secundários também do grupo tropânico, tais como norescopolamina, apoescopolamina, meteloidina, entre outros. A escopolamina é a que aparece em maior quantidade. As folhas e os talos de *B. áurea*, por exemplo, com um total de 0.3% de alcalóides, contem 80% de escopolamina, que também é o principal alcalóide das raízes da *Brugmansia*. Atualmente a espécie *B. sanguinea* é cultivada com fins comerciais no Equador para a produção de escopolamina (HOFMANN, 1996).

A *Brugmansia* assim como outras solanáceas contem importantes alcalóides usados por suas ações terapêuticas. A escopolamina (hioscina) e seus derivados têm considerável interesse farmacêutico por causa de sua ação parassimpaticolítica, anticolinérgica, antiemética e sedativa. É usada preferencialmente como pré-anestésico. É um potente agente midriático e cicloplégico, no que se assemelha à atropina. Difere, no entanto, não só quantitativamente, como por ser forte depressor central, com propriedades sedativa e tranqüilizante. Sua ação sobre a íris e as glândulas salivares, brônquicas e sudoríparas é mais intensa. O uso de escopolamina como antiespasmódica, em doses terapêuticas, causa normalmente sonolência, embora as mesmas doses possam ocasionalmente produzir excitação e alucinações. Estes efeitos são semelhantes aqueles provocados por doses tóxicas de atropina, e que mais comumente ocorrem após doses elevadas de escopolamina (WEINER,1991;BROWN,1991). A escopolamina pode ser usada na desintoxicação de viciados pela heroína sem causar dependência (YANG *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2004).

A atividade antimuscarínica da hiosciamina é devida a forma levógera (l-hiosciamina) normalmente existente e que é duas vezes mais potente que a atropina (dl-hiosciamina). Quanto à atividade central, a l-hiosciamina é 8 a 50 vezes mais potente que o isômero dextrógiro. É usada na medicina especialmente como midriática. A hiosciamina e seus derivados são de considerável interesse na indústria farmacêutica. Em combinação com outras drogas é usada em medicamentos contra tosse e asma. (BROWN, 1991; COSTA, 1994; BRINKER, 1993/94; SOUZA *et al.*, 2004).

A atropina é parassimpaticolítica, tendo efeito anticolinérgico e antiespasmódico sobre os músculos lisos. Também Inibe a secreção do suco

gástrico, das mucosas do nariz, boca, faringe e brônquios. Por via oral, parenteral ou instilação no olho, provoca midríase. Em doses tóxicas provoca inquietação, aumenta a irritabilidade e causa alucinações. A atropina não deprime o sistema nervoso central, quando em doses clínicas. É bronco-dilatadora (BUDAVARY1989; WEINER, 1991; BROWN, 1991; SOUZA *et al.*, 2004).

Existe pouco conhecimento detalhado da enzimologia de formação dos metabólitos secundários. Vias metabólicas secundários competem com metabolismo primário por precursores, podendo envolver a ligação de enzimas das vias primárias e secundárias e genes particulares que devem ser ativados, uma técnica que atualmente é importante área de pesquisa. Propor transformação expressiva requer conhecimento metuculoso da via de biossíntese dos alcalóides (TREASE, 1996).

Para obter fontes melhoradas de produtos farmacêuticos, a engenharia metabólica tem feito esforço em desenvolver plantas com modelo otimizado de alcalóide. A fonte comercial atual de escopolamina é a *Duboisia*, cultivada na Austrália, Indonésia e Brasil (TREASE, 1996).

O futuro da pesquisa desses alcalóides encontra-se no desenvolvimento de sistemas alternativos de produção e no desenvolvimento de plantas com espectro melhorado de alcalóides para a produção mais eficiente de fármacos atualmente isolados de plantas cultivadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Durante os últimos anos uma das áreas que vem se expandindo rapidamente é a aplicação da cultura artificial de células de plantas, tecidos e órgãos, desenvolvendo também o estudo de plantas medicinais. Os principais tópicos incluem o desenvolvimento e a expansão da produção comercial de biomedicamentos, a descoberta de metabólitos novos, a seleção de plantas medicinais, a elucidação dos caminhos de biossíntese de metabólitos secundários com isolamento de enzimas correspondentes, e a melhoria de plantas medicinais por intermédio da genética (TREASE e EVANS, 1996).

## 1.3 ASPECTOS BÁSICOS DA ASSIMILAÇÃO PRIMÁRIA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS

### 1.3.1 Principais formas de N disponíveis às plantas

O nitrogênio (N) figura entre os elementos minerais mais abundantes nas plantas e um dos principais fatores para seu crescimento. É constituinte de moléculas orgânicas importantes como clorofila, proteínas e os ácidos nucléicos, RNA e DNA, em fitohormônio ácido indolacético, citocininas e poliaminas, e ainda em metabólitos secundários, como alcalóides que embora com concentrações reduzidas, desempenham funções importantes (SALISBURY e ROSS, 1991; BUCHANAN, 2000; GRUISSEM, 2001 ;JONES,2005). As plantas possuem a capacidade de assimilar o N inorgânico, disponível no meio ambiente, representado pelo nitrato e amônia presentes no solo. O N do ar não é aproveitável diretamente pela planta, mas incorporado com ajuda de microorganismos, através de processo simbiótico (KERBAUY, 2004).

Os íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são prontamente utilizados pela planta, embora, na maioria dos solos, o  $\text{NH}_4^+$  seja rapidamente oxidado a  $\text{NO}_3^-$  por bactérias nitrificadoras. O  $\text{NH}_4^+$  prevalece em solos ácidos e inundados ou em áreas com vegetação cujas raízes exsudam inibidores do processo de nitrificação e resulta principalmente da mineralização de matéria orgânica (MARSCHNER 1995; MATTSSON e SCHJOERRING, 2002). Em solos agriculturáveis bem aerados, entretanto, a média anual de concentração de  $\text{NH}_4^+$  é geralmente de 10 a 1000 vezes menor que aquelas de  $\text{NO}_3^-$ , raramente excedendo a 50  $\mu\text{M}$  (MARSCHNER 1995).

### 1.3.2 Absorção e transporte de N inorgânico em plantas

Sob nutrição mista de N ( $\text{NO}_3^-$  mais  $\text{NH}_4^+$ ), o  $\text{NH}_4^+$  é frequentemente a forma preferencial de absorção de N pela planta (SASAKAWA e YAMAMOTO, 1978; GOJON *et al.*, 1986; GLASS e SIDDIGI 1995; GAZZARINI *et al.*,1999).

O  $\text{NH}_4^+$  é absorvido pelas raízes por processo ativo, quando a concentração externa é baixa, e por processo passivo em altas concentrações. O processo ativo é mediado por uma proteína transportadora localizada na membrana. Após absorção, o íon é rapidamente assimilado na forma orgânica, tendo em vista que o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  pode prejudicar a planta. O cultivo com alta concentração de  $\text{NH}_4^+$  pode levar à morte das plantas, porém, as concentrações toleradas variam de espécie para espécie. As gramíneas absorvem a maior parte do seu N como amônio, o qual é assimilado nas raízes. Algumas plantas (*Lolium*, *Bromus*) tratadas com esse íon, também pode transporta-lo via xilema, para ser assimilado nas folhas (MATTSSON e SCHJOERRING, 2002).

O  $\text{NO}_3^-$ , ao contrário do  $\text{NH}_4^+$ , é absorvido pelas raízes apenas por processo ativo. A absorção do  $\text{NO}_3^-$  é mediada por uma proteína transportadora localizada na membrana.

O nitrato absorvido nas células das raízes pode ser armazenado temporariamente no vacúolo ou reduzido a  $\text{NH}_4^+$ , que neste caso é usado principalmente para síntese de glutamina e asparagina. Estes dois aminoácidos podem ser transportados às folhas pelo fluxo transpiratório nos vasos do xilema. Em várias espécies, quando a capacidade de assimilação do nitrato pelas raízes está saturada, o  $\text{NO}_3^-$  liberado das raízes aos vasos do xilema, é carreado pelo fluxo transpiratório às folhas. Grandes quantidades de nitrato podem ser armazenadas nos vacúolo de folhas (HELDT, 1997).

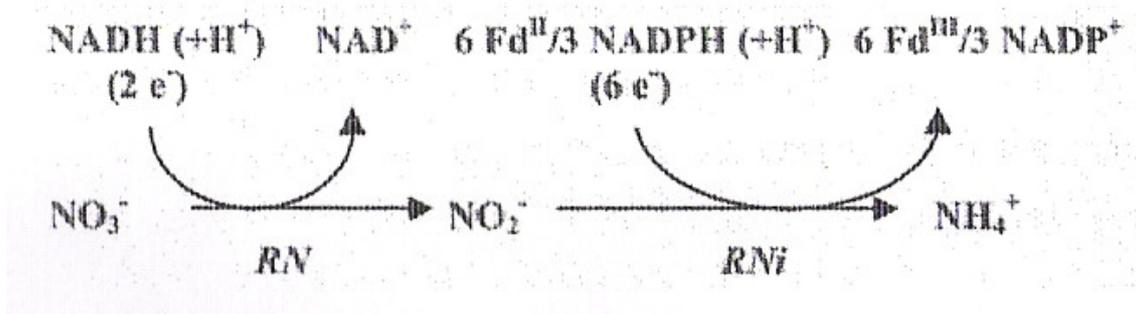
### 1.3.3 Redução do $\text{NO}_3^-$ em plantas

Os principais locais na planta para a redução do  $\text{NO}_3^-$  são as folhas e raízes (KERBAUY, 2004).

A maioria das espécies já estudadas apresenta atividade da enzima redutase do nitrato (RN) nas folhas. Entretanto, a importância relativa da raiz e folha na assimilação do  $\text{NO}_3^-$  depende de dois fatores: a atividade da RN na raiz e a disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no meio. Espécies com capacidade muito baixa em assimilar o  $\text{NO}_3^-$  nas raízes (por exemplo, espécies de *Gossypium*, *Xanthium* e *Cucumis*) enviam todo o íon absorvido (via xilema) para assimilação nas folhas (HOPKINS, 1999). Espécies com alta capacidade em assimilar o  $\text{NO}_3^-$  nas raízes (por exemplo,

*Lupinus* spp.) dificilmente tem essa capacidade superada pelo  $\text{NO}_3^-$  absorvido, e, conseqüentemente, a importância da folha na assimilação do íon é pequena. Porém, a maioria das espécies são intermediárias em termos de capacidade de assimilar o  $\text{NO}_3^-$  nas raízes. Nesses casos, a folha torna-se importante apenas quando o  $\text{NO}_3^-$  no meio estiver em concentração suficiente para superar a capacidade de redução da raiz. Plantas como cevada (*Hordeum vulgare*) e girassol (*Helianthus annuus*) translocam proporções equivalentes de  $\text{NO}_3^-$ , aminoácidos e amidas, e rabanete (*Raphanus sativus*) transloca somente cerca de 15 % de nitrogênio como  $\text{NO}_3^-$  (PATE, 1973).

A redução completa do  $\text{NO}_3^-$  até  $\text{NH}_4^+$  requer oito elétrons. Ocorre em duas etapas, cada uma envolvendo doadores de elétrons específicos (SODEK, 2004) (Figura 6).



**Figura 6** - Redução do nitrato em amônio (SODEK,2004)

O primeiro passo é catalisado pela enzima redutase do nitrato (RN), localizada no citoplasma, enquanto a redutase do nitrito (RNi) está localizada no cloroplasto (tecidos verdes) ou plastídeos (tecidos não-verdes), catalisa o segundo.

Na maioria das espécies estudadas, a enzima RN tem NADH como doador específico de elétrons. Entretanto, em algumas espécies a enzima utiliza tanto NADH como NADPH. Essa enzima biespecífica pode ocorrer isoladamente ou junto com a enzima monoespecífica. Em soja são conhecidas três isoformas, uma induzida pelo  $\text{NO}_3^-$  e específica para NADH e duas formas constitutivas, uma específica para NADH e outra biespecífica. A estrutura molecular de RN é bastante complexa, sendo a enzima constituída de duas subunidades idênticas de 110 a 115

kDa. Cada subunidade é composta de regiões distintas, envolvidas na transferência de elétrons do NADH até o  $\text{NO}_3^-$  (SODEK, 2004).

Em função da importância estratégica da RN no metabolismo de N em plantas, constituindo a principal porta de entrada do N no metabolismo da planta. É natural que existam vários mecanismos de controle da sua atividade. Os dois principais pontos de regulação ocorrem a nível de transcrição (indução) e pós-tradução. A primeira é mais lenta (leva algumas horas) e é responsável por algumas das mudanças diárias de atividade, como, por exemplo, o aumento na atividade durante as primeiras horas de luz do dia, quando o fluxo transpiratório leva o  $\text{NO}_3^-$  até a folha, resultando na indução (síntese *de novo*) da enzima (SODEK, 2004).

Outro importante mecanismo de controle ocorre a nível de pós-tradução. Esse processo de ativação/desativação é bem mais rápido (leva alguns minutos) e pode ser importante, por exemplo, para “desligar” a enzima quando a planta passa da luz para o escuro, pois havendo falta de ferredoxina reduzida, evita-se o acúmulo de nitrito, que é tóxico às plantas. O processo de ativação/desativação envolve a transformação da enzima de uma forma inativa para ativa (e vice-versa) por mecanismo de fosforilação e desfosforilação (KERBAUY, 2004).

A luz influi indiretamente na atividade da RN na folha, provocando mudanças numa série de íons e metabólitos envolvidos nesse mecanismo de regulação. Com a fotossíntese, ocorre aumento no teor de açúcares fosforilados (como triose P) e queda em fosfato inorgânico (em função do aumento de ATP, por exemplo), proporcionando condições favoráveis para a ativação da RN (SODEK, 2004).

A luz também está envolvida na regulação da RN a nível de transcrição (via fitocromo). A oscilação diária de atividade entre os períodos de luz e escuro se mantém quando a planta é transferida para luz contínua, comprovando que a enzima obedece a um ritmo circadiano. Outros fatores que influem na síntese da enzima são o gás carbônico, sacarose e alguns metabólitos nitrogenados, estando  $\text{NO}_3^-$  entre os mais importantes. O  $\text{NO}_3^-$  tem forte influência sobre todos os componentes da sua assimilação. Além da própria RN, o  $\text{NO}_3^-$  regula as proteínas de transporte (absorção de  $\text{NO}_3^-$ ) e as enzimas RNi, glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase dependente de ferredoxina [GOGAT(Fd)]. No caso da folha, é importante frisar que não é o teor de  $\text{NO}_3^-$  presente que é importante na indução da enzima, mas a quantidade trazida pelo fluxo transpiratório (SODEK, 2004).

A segunda enzima do processo de assimilação do  $\text{NO}_3^-$ , a redutase do nitrito (RNi), é localizada nos cloroplastos das folhas e em plastídeos da raiz. A enzima do cloroplasto está melhor caracterizada: possui ferredoxina como co-fator, e, portanto os elétrons são fornecido pelas reações fotoquímicas. Sua estrutura é constituída por um único polipeptídeo de 60-70 kDa, que contem um grupo tetra-hidro porfirina contendo ferro (siro-heme) e um agrupamento 4Fe-4S no centro ativo, responsável pela transferência de seis elétrons da ferredoxina ao nitrito até a sua redução em  $\text{NH}_4^+$ . A enzima da raiz é menos conhecida. Aparentemente, recebe elétrons de uma proteína semelhante à ferredoxina, que, por sua vez é reduzida por NADPH gerado na via das pentoses-fosfato (SODEK, 2004).

#### 1.3.4 Assimilação de $\text{NH}_4^+$ em plantas

Em plantas superiores, a glutamina sintetase (GS, EC 6.3.1.2) é enzima chave envolvida na assimilação de nitrogênio inorgânico em formas orgânicas. A GS catalisa a condensação de amônio ATP-dependente com glutamato para produzir glutamina, que fornece grupos nitrogenados, diretamente ou via glutamato, para a biossíntese de todos os compostos nitrogenados na planta (FORDE e CULLIMORE, 1989).

Dois grupos de isoenzimas de GS, plastídica (GS2) e citosólica (GS1), foram identificadas em plantas superiores (CREN e HIREL, 1999). Na maioria de plantas superiores a GS2 é predominante em tecidos clorofilados, sendo localizada no estroma do cloroplasto (PEREIRA *et al.*, 1992). O isolamento do cDNA codificando GS2 permitiu a demonstração que em muitas espécies esta isoenzima é codificada por um gene nuclear único. Estudos prévios demonstraram que esta isoenzima é indispensável para a reassimilação de amônio liberado do ciclo de nitrogênio da fotorrespiração. A importância fisiológica da GS2 foi mais tarde demonstrada usando plantas transgênicas superexpressando a GS2 nas folhas. Estas plantas incrementam a capacidade fotorrespiratória quando crescem sob estresse osmótico e alta intensidade de luz (HOSHIDA *et al.*, 2000).

A conversão da glutamina (Gln) em outros aminoácidos envolve inicialmente a ação da glutamato sintase (GOGAT) que catalisa a transferência do grupo  $\delta$ -amino da Gln para a posição  $\alpha$ -ceto do  $\alpha$ -cetoglutarato, produzindo duas moléculas de

glutamato (Glu), às custas do poder redutor fornecido pelo NADH ou Fdx (ferredoxina) (LEA e IRELAND, 1999).

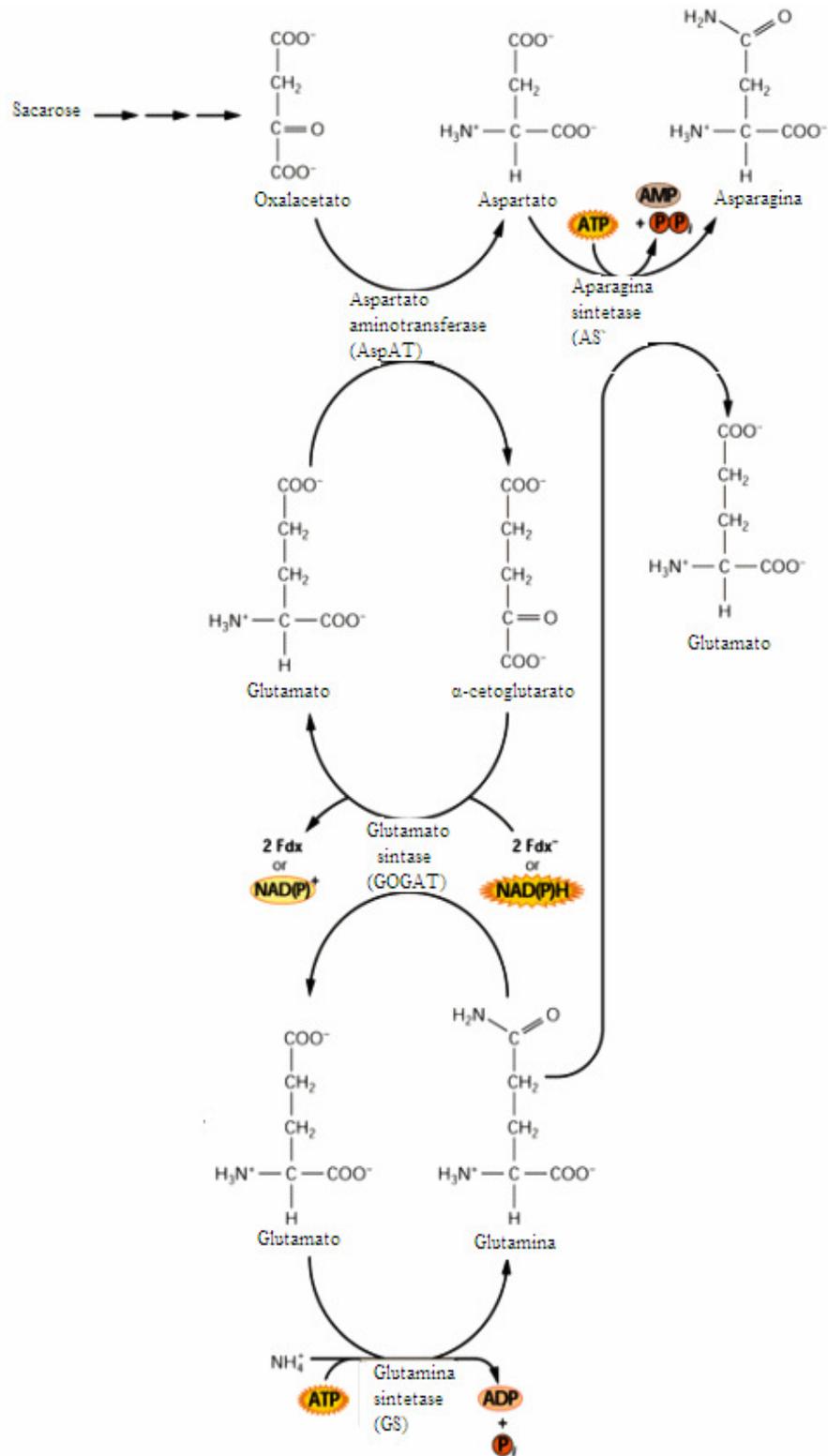
A distribuição órgão específica sugere maior papel da Fdx-GOGAT na assimilação primária de N e fotorrespiração nas folhas, enquanto NADH-GOGAT teria a função predominante na assimilação primária nas raízes (BUCHANAN,2000).

A assimilação de amônio em Glu e Gln é prontamente distribuída no metabolismo da planta, porque estes aminoácidos são doadores de nitrogênio na biossíntese de aminoácidos, ácidos nucleicos, e outros compostos contendo N (SALISBURY, 1991).

Uma vez que o  $\text{NH}_4^+$  foi assimilado pelo ciclo GS/GOGAT, o Glu pode ser rapidamente convertido em outros aminoácidos pela ação das transaminases. Uma dessas enzimas, é essencial para a formação de aspartato, necessário para a síntese de asparagina: envolve a transaminação entre Glu e oxaloacetato pela ação da glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), produzindo aspartato e  $\alpha$ -cetoglutarato (LEA e IRELAND, 1999). Portanto, a GOGAT, juntamente com a GS, mantém o fluxo de N a partir de  $\text{NH}_4^+$  em Gln e Glu (LEA *et al.*, 1990).

A asparagina (Asp), é formada via ação da enzima asparagina sintetase (AS), a partir de Asp e Gln, com hidrólise simultânea de ATP em AMP (LEA e FOWDEN, 1975; SHI *et al.*, 1997). Neste caso, a Gln tem o papel de doador de N para formar o grupo amida (Figura 7).

Este trabalho teve como objetivos caracterizar a composição nitrogenada transportada na seiva do xilema, o teor endógeno de moléculas nitrogenadas e a atividade da redutase do nitrato e da glutamina sintetase em raízes e folhas em plantas de *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio; verificar o potencial dessa espécie como matéria-prima para o isolamento de alcalóides tropicânicos.



**Figura 7** - Enzimas que participam na assimilação de amônio (BUCHANAN, 2001, modificado).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Estacas de *Brugmansia suaveolens* obtidas a campo no Município de Pelotas, RS, Brasil (Ponto 54 31 °45'S e 52 °19'W; elevação 8 m.), a partir de plantas selvagens de biótipo amarela, sob a orientação e identificação da Profa. Maria Antonieta Oliveira, profa de botânica da UCPel e do prof. Luciano do Amarante, do Departamento de Bioquímica-IQG da UFPel. Excicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, da UFPel.

As estacas desprovidas de folhas, com cerca de 0,3 m de comprimento e 0,01m de diâmetro, foram cultivadas em vasos plásticos de três litros, contendo vermiculita como substrato e mantidas em casa de vegetação. A vermiculita foi lavada em água corrente, durante 4-6 horas, antes de ser utilizada para o cultivo das estacas. As plantas floresceram cerca de 90 dias após o início da aplicação dos tratamentos.

As plantas foram nutridas, com solução Hoagland e Arnon (1938) com variações na fonte de nitrogênio, colocando-se duas vezes por semana 300 mL de solução por vaso, em vasos contendo uma planta, respectivamente.

#### 2.1.1 Soluções nutritivas

As plantas cultivadas foram nutridas com solução Hoagland completa ( $\text{NO}_3^-$  = 15 mM) ou substituindo-se a fonte de nitrogênio, seguindo-se as mesmas proporções estabelecidas para as plantas cultivadas com os tratamentos com as variadas fontes de nitrogênio.

Foram preparadas soluções baseadas na solução de Hoagland e Arnon (1938), uma com  $\text{NO}_3^-$  (+N10), 10 vezes concentrada, e outra sem  $\text{NO}_3^-$  (-N), e outras três utilizando-se a solução -N, anterior, acrescida de fontes alternativas de N, conforme abaixo:

**Solução +N10:**  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50 mM);  $\text{KNO}_3$  (50 mM);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (20 mM);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,46 mM);  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,091 mM);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (7,65  $\mu\text{M}$ );  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (3,20  $\mu\text{M}$ );  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (0,56  $\mu\text{M}$ ).

**Solução -N:**  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2 mM);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 mM);  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2 mM),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (2 mM);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,046 mM);  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (9,1  $\mu\text{M}$ );  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,765  $\mu\text{M}$ );  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,32  $\mu\text{M}$ );  $\text{H}_2\text{MoO}_4$  (0,56  $\mu\text{M}$ ).

**Solução de Aminoácidos :** Solução -N adicionada das soluções dos aminoácidos fenilalanina (5mM); arginina (5mM) e glutamina (5mM).

**Solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :** Solução -N acrescida de nitrato de amônia ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 7,5 mM

**Solução  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :** Solução -N mais sulfato de amônia ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 7,5 mM

Todas as soluções foram preparadas com macronutrientes e micronutrientes, exceto o ferro. O íon foi adicionado à solução +N ou -N apenas no momento de se colocar as soluções nas plantas. Para isso, acrescentou-se à solução +N (devidamente diluída) ou -N, 1 mL/L, de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada, contendo  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  (33,2 g/L);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (25 g/L) e  $\text{NaOH}$  (3,65 g/L).

## 2.2 TRATAMENTOS EMPREGADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

### 2.2.1 Influência do $\text{NO}_3^-$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_3\text{NH}_4$ e aminoácidos sobre o transporte e assimilação de N

Os experimentos foram conduzidos com a finalidade de caracterizar a composição nitrogenada transportada no xilema e a assimilação primária do N, na presença dos íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  e aminoácidos. O primeiro, foi constituído de quatro tratamentos: um controle com plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  como única fonte

nitrogenada, outro grupo de plantas recebendo  $\text{NH}_4^+$ , outro  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  e por último um grupo recebendo aminoácidos (fenilalanina, arginina e glutamina) como única fonte de nitrogênio, todas as soluções na concentração de 15 mM para o elemento N, durante aproximadamente doze semanas. Os tratamentos foram aplicados colocando-se inicialmente 1 L de solução contendo N na concentração 15 mM, sem impedimento da drenagem, visando saturar todo o vaso com a solução e nas etapas posteriores, 200 mL em intervalos de três dias. Nesse experimento foram coletadas a seiva de xilema, raízes e folhas, para análise da composição aminoacídica, teor de aminoácidos livres totais (ALT), teor de nitrato e amônio, e quantificação do teor de proteínas nas folhas e raízes e clorofilas nas folhas. Para coleta de folhas foi eleito o terceiro par de folhas, contando como primeiro, o par de folhas logo após o nó, enquanto que das raízes foram coletadas as extremidades.

O segundo experimento foi constituído de cinco tratamentos: um controle cultivado sem N (N-), além dos tratamentos com as diferentes fontes de N do experimento anterior, todos aplicados às plantas durante noventa dias, quando atingiam o florescimento. Nesse experimento foram coletadas, o segundo par de folhas expandidas a partir do ápice, descartadas as nervuras principais, e raízes da metade inferior, para análise da atividade da redutase do nitrato (RN) e a atividade da glutamina sintase (GS). O teor de amônia na seiva do xilema, nas folhas e raízes foi também determinado.

### **2.2.2 Delineamento experimental**

Os tratamentos foram dispostos em blocos ao acaso com quatro repetições. Um vaso, com uma planta, representava a unidade experimental. Aos dados quantitativos obtidos, foi aplicada a análise de variância e, nos casos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade (GOMES, 1990) utilizando-se o programa estatístico SPSS.

## 2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.3.1 Coleta de exsudato do xilema

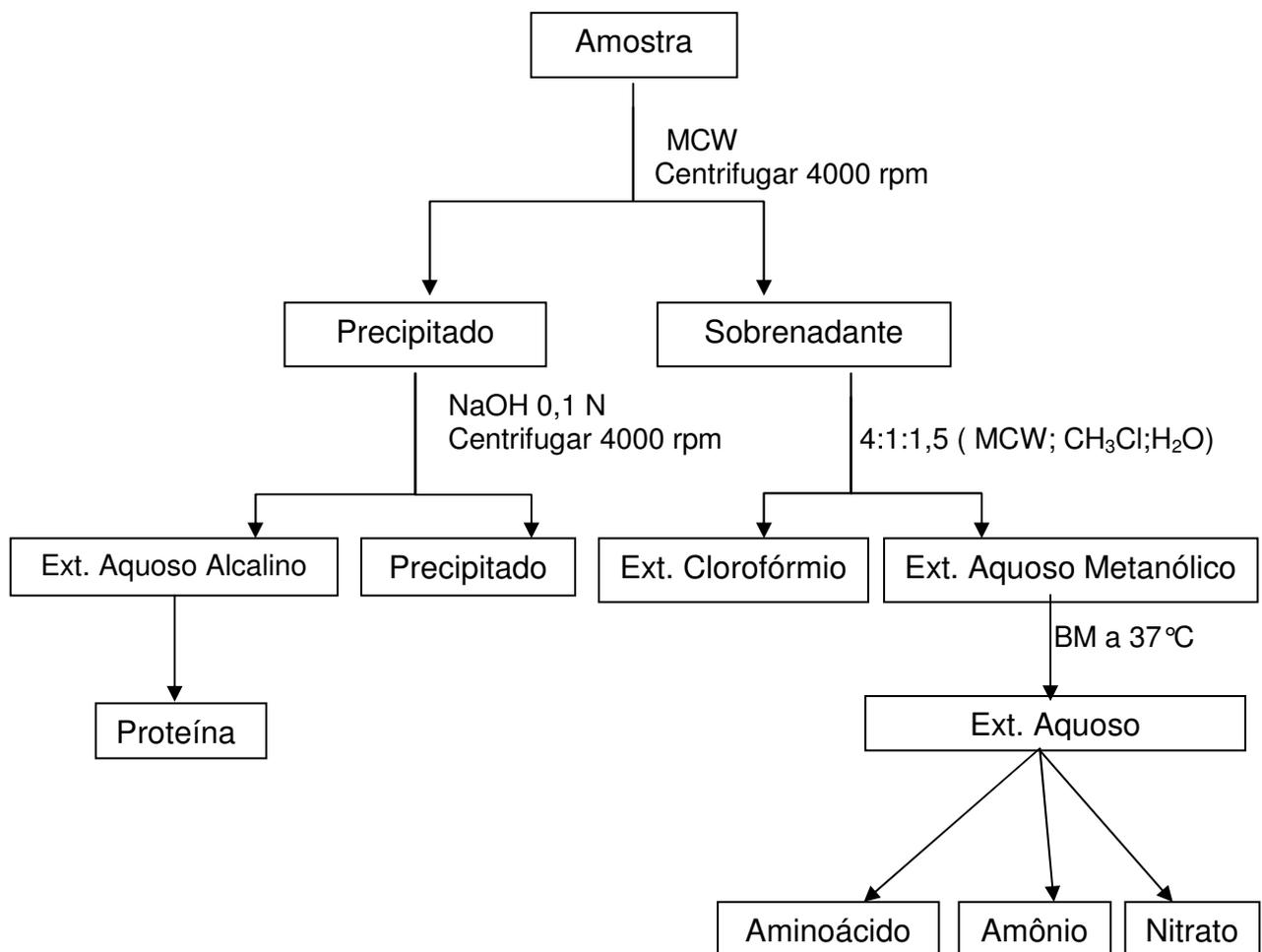
A coleta de exsudato de xilema foi realizada entre 10 h e 12 h conforme McCLURE e ISRAEL (1979). Com auxílio de lâmina de barbear foi feito um corte em bisel no caule principal, separando a parte aérea das raízes. Em seguida, a região do corte foi lavada com água destilada e enxugada com papel absorvente, iniciando-se então, a coleta de exsudatos com auxílio de microcapilares de vidro. Os exsudatos foram coletados durante uma hora em tubos do tipo Eppendorf, os quais permaneceram em banho de gelo. Após a coleta o material foi conservado em congelador, para análises posteriores.

### 2.3.2 Extração de aminoácidos, nitrato e amônia de raízes e folhas

O sistema radical previamente lavado em água corrente para retirada da vermiculita e sais aderidos à superfície, e posteriormente as raízes foram lavadas em água destilada gelada várias vezes, enxugadas em papel filtro e aferidas as massas. Para uniformizar o material utilizado, foram coletados cerca de 1 g das extremidades das raízes e folhas eleitas para análise, após limpeza com água destilada e secagem imediata em papel filtro, foram descartadas as nervuras principais e aproximadamente um grama de massa fresca foi amostrada das folhas selecionadas.

Após as raízes e folhas foram maceradas com N<sub>2</sub> líquido e armazenados em solução extratora M:C:W ( metanol:clorofórmio:água; 12:5:3; v/v/v) na proporção de 10 mL por grama de massa fresca, sob refrigeração. O extrato foi então obtido segundo Bieleski e Turner (1966), com pequenas modificações. O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 min, em tubos de vidro reforçado. O sobrenadante foi coletado e o precipitado ressuspenso novamente em MCW, seguido de nova centrifugação a 4000 rpm por 10 min. O precipitado (material vegetal, resíduo) foi mantido no tubo, para posterior extração de proteínas. Os sobrenadantes foram então reunidos, para se obter o extrato total de 15 mL, em

MCW. A cada 4 mL desse extrato, foi acrescentado 1,0 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água pura, filtrada em filtro milli-Q. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 24 horas, para separação de fases. A fase superior, aquosa, foi coletada com auxílio de pipetador automático e concentrada por evaporação até aproximadamente 10 mL de seu volume em banho-maria a 40°C por cerca de 24 h, com os objetivos de eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes. Os extratos foram então armazenados em tubos Eppendorf, em congelador, para posterior análise dos metabólitos (Figura 8).



**Figura 8** - Esquema de extração de aminoácidos, amônio, nitrato e proteínas.

### 2.3.3 Extração de proteínas

O resíduo obtido em 2.3.2 foi ressuspenso em 10 mL de NaOH 0,1 N, homogeneizado com auxílio de bastão de vidro. Após 24 h, centrifugou-se o extrato a 4.000 rpm por 9 min. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado mais 5 mL de NaOH para lavar o material vegetal, folhas ou raízes, mexendo com um bastão de vidro por aproximadamente 10 min. Após esse tempo, centrifugou-se novamente e juntou-se a fração sobrenadante inicial ( Figura 8).

### 2.3.4 Separação e análise da composição de aminoácidos da seiva do xilema e de extrato de raízes e folhas

A separação e análise de aminoácidos livres, realizada no Laboratório de Análise de Aminoácidos do Departamento de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob orientação do Prof. Ladaslav Sodek, foi efetuada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de fase reversa, após derivação com *o*-ftaldialdeído (OPA) conforme PUIATTI e SODEK (1999).

O aparelho de HPLC utilizado é constituído de duas bombas, A e B, da marca LKB mod. 2150, controladas por um gerador de gradiente da marca LKB mod. 2152.

A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com os solventes, tampão fosfato para a bomba A (= "A"): [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 50 mM, CH<sub>3</sub>COONa 50 mM, 1,5 mL de CH<sub>3</sub>COOH (pH 7,25), 20 mL de tetrahidrofurano e 20 mL de metanol específico para HPLC em 1 L de volume final] e metanol 65 % (= "B") para a bomba B. Ambas as soluções foram desaeradas, sendo o tampão A filtrado a vácuo, em filtro Millipore, por meio de membrana PVDF, com 0,45 µm de diâmetro.

O reagente OPA foi preparado dissolvendo-se, inicialmente, 50 mg de OPA em 1 mL de metanol específico para HPLC, misturando posteriormente a 6,5 mL de tampão borato-NaOH, pH 9,5 (ácido bórico 2,4 % p/v em H<sub>2</sub>O, pH ajustado com NaOH 2 N) e filtrado em seguida em filtro Millipore em PVDF, de 0,22 µm. No dia de uso, 5 µL de 2-mercaptoetanol foram adicionados a 625 µL desta mistura.

As amostras de seiva de xilema foram centrifugadas a 14.000 x g por 5 min, sendo os extratos de tecidos filtrados em membrana PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$ , para posterior derivação com a mistura OPA + mercaptoetanol.

Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de amostra ou padrão foi misturada com 60  $\mu\text{L}$  do reagente OPA + mercaptoetanol em Eppendorf e agitado. Após 2 min de reação, tempo suficiente para formar os derivados aminoácidos-OPA, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  devidamente diluída de amostra de seiva, contendo entre 0,5 a 10  $\mu\text{L}$  da amostra original nessa mistura, ou 10  $\mu\text{L}$  de extrato de folhas ou 20  $\mu\text{L}$  quando amostra de extrato de raízes, foi injetada na câmara de injeção de amostra do HPLC. Nesse momento foi iniciada a eluição da mistura em gradiente dos dois tampões, A e B através da coluna cromatográfica (Waters Spherisorb ODS-2, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, da SUPELCO INC.) com fluxo de 0,8 mL/min, em um gradiente formado por quantidades crescentes de "B" em relação à "A". O gradiente foi programado para aumentar linearmente a proporção de "B" em relação a "A" da seguinte forma: 20 % aos 0 min, 28 % aos 5 min, 58 % aos 35 min, 75 % aos 40 min, 95 % aos 56 min, 96 % aos 60 min e 100 % aos 61 min.

Ao passar pela coluna cromatográfica os derivados aminoácidos-OPA foram detectados pelo monitor de fluorescência Shimadzu modelo RF-530, ajustado com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de excitação de 265 nm e  $\lambda$  de emissão de 480 nm. O sinal do monitor foi processado por um integrador LKB, modelo 2221.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrados, comparados aos picos de um padrão Sigma AAS-18, com 15 aminoácidos protéicos, ao qual foram adicionados os aminoácidos Asn (asparagina) e Gln (glutamina), todos na concentração de 250 nmol L<sup>-1</sup>

### **2.3.5 Dosagem de aminoácidos solúveis livres totais (ALT)**

Os ALT foram determinados conforme método de YEMM e COCKING (1955). Extratos de tecidos da raiz e folha ou seiva de xilema devidamente diluídos em água, padrão de leucina (0-200 nmol) e água (branco) em volume de 1 mL, em tubo de ensaio, foram acrescidos de 0,5 mL de tampão citrato 0,2 M pH 5,0, 0,2 mL do reativo de ninhidrina 5 % em metil-celulose (éter monometílico de etilenoglicol) e

1 mL de KCN 2 % (v/v) em metil-celulose (preparada a partir da solução 0,01 M de KCN em água).

Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para banho-maria a 100°C por 20 min. Em seguida, os tubos foram colocados no escuro até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente foi acrescentado 1,3 mL de etanol 60 % (v/v) completando o volume para 4 mL e feita a agitação dos tubos. A densidade ótica dos padrões e amostras contra o branco foi medida a 570 nm, sendo feitas três repetições para cada amostra.

### 2.3.6 Dosagem de Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

A determinação de  $\text{NO}_3^-$  foi executada conforme método de CATALDO *et al.* (1975). Em tubo de ensaio, foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  de água (branco), amostras e padrões (0,25 a 1,0  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_3^-$ ) e 400  $\mu\text{L}$  do reagente salicílico (ácido salicílico 5 % p/v em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado), agitando cada tubo. Decorridos 20 min à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente 9,5 mL de NaOH 2 N. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e medidas as densidades óticas, a 410 nm, dos padrões e amostras contra o branco, sendo feitas três repetições para cada amostra.

### 2.3.7 Dosagem de Amônia

A determinação de amônia seguiu a metodologia estabelecida por McCULLOUGH (1967), utilizando 500  $\mu\text{L}$  de água, amostra ou padrão (20-400  $\mu\text{mol}$ ) e 2,5 mL dos reagentes I e II. Reagente I: Fenol 0,1 M + SNP 170  $\mu\text{M}$  (Nitroprussiato de sódio) e Reagente II: NaOH 0,125 +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,15 M + NaOCl (3%  $\text{Cl}_2$ ). Após a adição de 2,5 mL do reagente I, os tubos foram agitados para depois acrescentar 2,5 mL do reagente II. Os tubos de ensaio foram agitados, tampados com bolas de vidro e transferidos para banho-maria a 37°C, por 35 minutos. Em seguida, esperou-se até os mesmos atingirem a temperatura ambiente. A densidade ótica dos padrões e amostras contra o branco foi medida a 625 nm.

### 2.3.8 Dosagem de proteínas

A determinação de proteínas seguiu a metodologia do Kit Sensiprot Labtest: utilizando-se o seguinte reagente: Reagente de cor composto de vermelho de pirogalol  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ , molibdato de sódio  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , oxalato de sódio  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , e tampão  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 2,5 e polioxietanol 0,1%. Em tubos de ensaio foram pipetados  $50 \mu\text{L}$ , respectivamente, de água, amostras e padrões ( $10\text{-}100 \mu\text{g}$  de BSA) e adicionado 1 mL do reagente vermelho de pirogalol, sendo os tubos agitados e determinado a densidade ótica das amostras e padrões em 600 nm, contra o branco.

### 2.3.9 Dosagem das enzimas da assimilação da amônia nas raízes e folhas

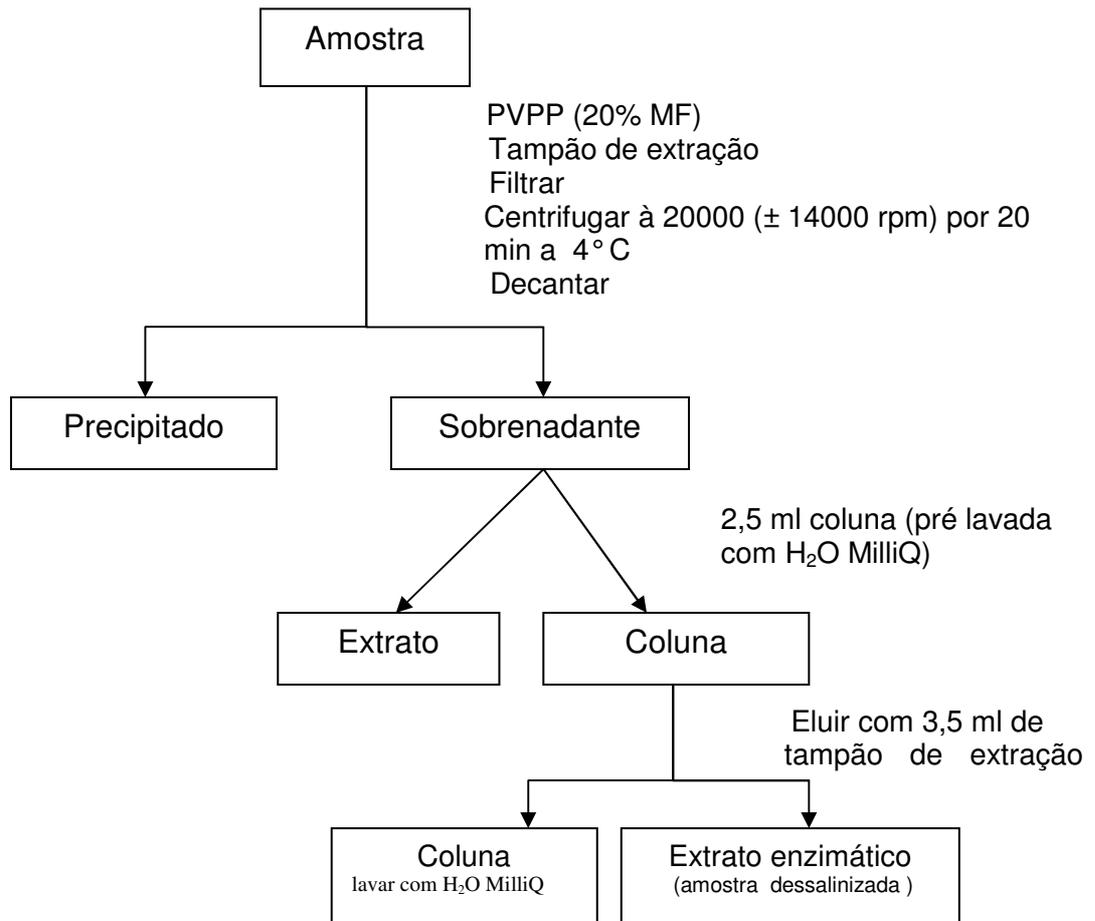
#### 2.3.9.1 Glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2)

##### 2.3.9.1.1 Extração

A extração da enzima foi realizada por método de CULLIMORE *et al.* (1983). Em folhas, cerca de um grama de material, recém coletado e previamente lavado em água destilada gelada, foi macerado em cadinho de porcelana com  $\text{N}_2$  líquido e posteriormente homogeneizado com tampão de extração Tris-HCl 100 mM, pH 7,8, contendo 1 mM de DTT, 5 mM de glutamato de sódio, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 10 % de glicerol, na razão de 5 mL por grama de massa fresca e 20 % de polyclar AT (PVPP) com base na massa fresca de tecido. O homogeneizado foi centrifugado a  $20.000 \times g$  por 20 min a  $4^\circ\text{C}$  e uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi dessalinizada em coluna Sephadex G-25 médio, com volume total de 10 mL (PD-10; Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão de extração.

O extrato enzimático foi obtido a partir de 1,2 g de extremidades das raízes, recém coletadas, previamente lavadas em água destilada gelada. O tecido triturado em cadinho de porcelana com  $\text{N}_2$  líquido foi homogeneizado em tampão, na proporção de 4 mL de tampão por grama de raízes e 20 % de polyclar AT, com base na massa fresca. O homogeneizado foi filtrado, em quatro camadas de gaze,

previamente lavadas e umedecidas com tampão de extração, e posteriormente centrifugado a 20.000 x g, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi então recolhido e dessalinizado em coluna Sephadex G-25 médio (PD-10; Amersham Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão de extração para os ensaios enzimáticos posteriores. Todos os procedimentos relativos à obtenção dos extratos enzimáticos foram realizados sob temperatura entre 0 e 4°C em câmara fria (Figura 9).

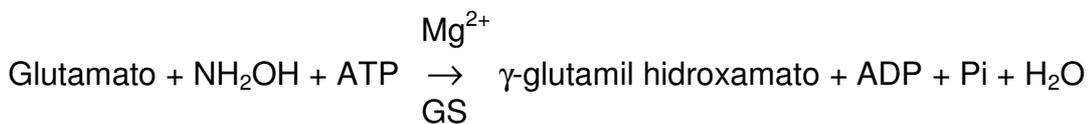


**Figura 9** - Esquema de extração da enzima glutamina sintetase.

#### 2.3.9.1.2 Dosagem da atividade da GS

A atividade da GS foi dosada pelo método semi-biossintético, segundo CULLIMORE *et al.* (1982). Nesse caso, foi realizada a medição de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato, produto da reação obtido quando a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) é utilizada como substrato alternativo para o NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Este método foi utilizado para análise de

rotina, devido a dificuldades em se obter uma rápida separação da glutamina, do substrato glutamato:



Após padronizados o tempo de reação e o volume de extrato, de forma a se ajustar a velocidade de reação dentro da região de linearidade da curva da atividade enzimática, foram definidos os ensaios para folhas e raízes conforme descrito a seguir. O ensaio foi realizado em tubos contendo Glutamato (Glu), 100 mM; hidroxilamina 8,0 mM; ATP, 8,0 mM; MgCl<sub>2</sub>, 16mM; Tris-HCl, 10 mM pH 7,8 e 160 µL de extrato bruto duas vezes diluído, para folhas e 960 µL de extrato bruto para raízes, em 1,6 mL de volume final. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação pré-incubado a 30<sup>0</sup>C, seguida de agitação suave do tubo. Após 1 min da adição do extrato ao meio foram retiradas alíquotas de 500 µL nos tempos 0, 10, 20 e 30 min. A essas alíquotas foram acrescentados 600 µL de FeCl<sub>3</sub> (HCl 0,67 M; TCA 0,20 M e FeCl<sub>3</sub> 0,37 M), para interromper a reação (FERGUSON e SIMS, 1971). Em seguida foi realizada a centrifugação dessa mistura a 10.000 x g durante 5 min, a temperatura ambiente, para remoção das proteínas. Durante os ensaios, nos controles foram incluídos o extrato enzimático e todos os reagentes do meio de reação conforme descrito acima, exceto o ATP. Para os cálculos de atividade enzimática foram consideradas as leituras observadas nesses controles.

As absorbâncias foram obtidas pela leitura em fotômetro semi-automático Labquest, usando como branco uma mistura de 600 µL do reagente paralizante e 500 µL de tampão do ensaio. A quantidade de γ-glutamil hidroxamato produzida foi estimada a partir da curva de calibração de γ-glutamil hidroxamato com concentrações de até 1 mM.

Foi adotado, como análise de rotina, o método semi-biossintético, por fornecer resultados confiáveis, relativamente próximos aos obtidos pelo método biossintético. Os valores de atividade obtidos por meio do ensaio colorimétrico (semi-biossintético) apresentaram cerca de 80 % dos valores de atividade estimados pelo método biossintético (AMARANTE, 2002).

### 2.3.9.2 Dosagem da redutase do nitrato ( E. 1.6.6.1)

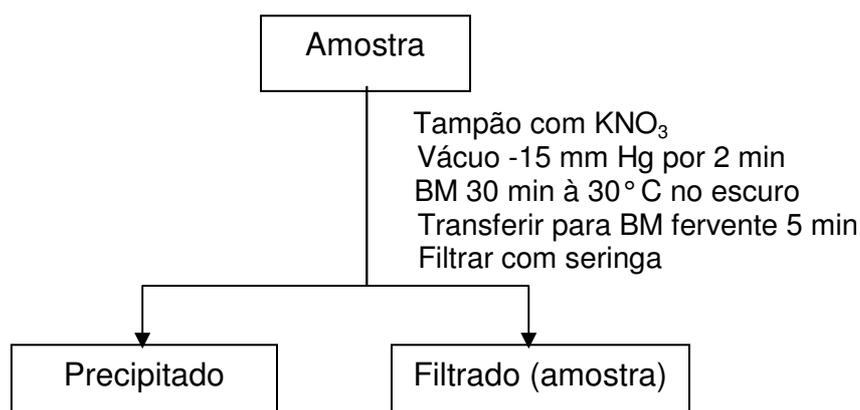
A determinação da redutase do nitrato foi feita empregando-se o ensaio *in vivo* modificado por QUEIROZ *et al.*, (1991).

#### 2.3.9.2.1 Obtenção da fonte de enzimas

As coletas de material vegetal, folhas e raízes foram realizadas em horário fixo, 9 h. Esse procedimento foi adotado, para permitir a comparação da ação enzimática nas diferentes condições do experimento, com o objetivo de minimizar a variação de irradiância ao longo do dia, sobre a atividade da enzima.

As amostras de tecido fresco de folhas e raízes foram lavadas com água Milli-Q gelada, e imediatamente colocadas 0,2 g de raiz e 0,05 g de folha , em tubos de ensaio contendo solução tampão fosfato 50mM, pH 7,5 contendo n-propanol 2% (v/v) e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) 200 mM.

Essas amostras foram infiltradas a vácuo, 15 mm Hg, duas vezes, durante um minuto, com a finalidade de aumentar a penetração da solução tampão e substrato nos tecidos (Figura 10).



**Figura 10** - Esquema de obtenção da enzima redutase do nitrato.

### 23.9.2.2 Dosagem da atividade da RN

Depois da obtenção da enzima redutase do nitrato, os tubos de ensaio contendo o material vegetal e tampão foram incubados em banho-maria a 30°C por 30 minutos ao abrigo da luz, e transferidos para banho-maria fervente por 5 minutos, objetivando a paralisação da reação. Imediatamente, o meio de reação foi filtrado com filtro de microfibras de vidro acoplado à saída de seringa descartável de volume de 10 mL, com a finalidade de retirar o material vegetal, sendo o filtrado obtido utilizado para dosagem de nitrito. O volume de 1 mL de filtrado foi transferido para tubo que continha previamente 0,5 mL de sulfanilamida a 1 % em HCl 2 N. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de n-(1) naftil etilenodiamino a 0,02%.

A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, sendo a atividade da enzima determinada pela quantidade de  $\text{NO}_2^-$  produzido, comparando os valores obtidos com a curva padrão de nitrito em quantidades variando de 50 a 500 nmol de  $\text{NO}_2^-$ .

### 2.3.10 Determinação do teor de clorofilas

As dosagens foram realizadas a partir de solução extratora de dimetilsulfóxido (DMSO), com base em HISCOX e ISRAELSTAM (1979).

Discos foliares com 177 mm<sup>2</sup> foram retirados do terceiro par de folhas recém coletada, sendo desprezadas as nervuras centrais e colocados em DMSO, na proporção de 10 mL por disco foliar, em balões volumétricos com tampa, de 10 mL, utilizados para evitar a perda do solvente. Os balões foram fechados e mantidos em banho-maria a 65 °C, durante 30 min. Após terem sido resfriados no escuro, foram determinadas, em espectrofotômetro, as densidades óticas a 645, 646 e 663 nm. Os teores de clorofila a, clorofila b e clorofilas totais (a + b) foram calculados com base nas equações propostas por ARNON (1949):  $C_a = (12,70 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})$ ;  $C_b = (22,90 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})$  e  $C_{a+b} = (20,20 \times A_{645}) + (8,02 \times A_{663})$ .

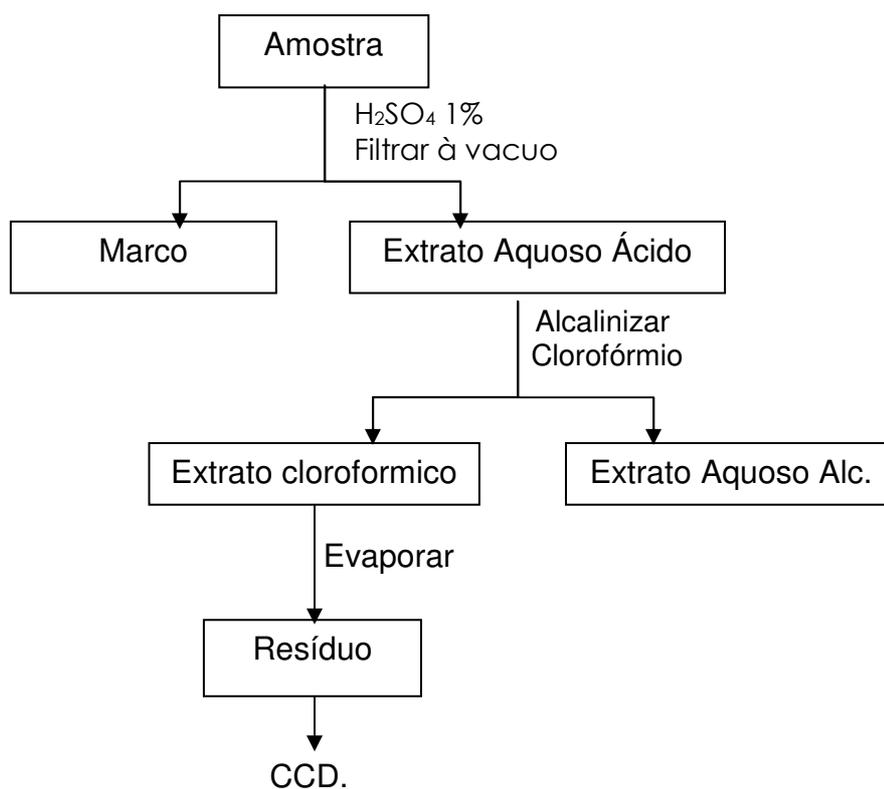
## **2.3.11 Análise de alcalóides**

### **2.3.11.1 Obtenção da amostra**

Folhas apicais e flores de *Brugmansia suaveolens*, selecionadas da planta selvagem, usada para obtenção de estacas, foram retiradas a fim de servirem como material vegetal a ser realizada a prospecção. Todo o material coletado para análise passou pelo processo de seleção, conforme SHARAPIN (2000). Quatro amostras de 10 g de material fresco e triturado com N líquido foram utilizadas para extração de alcalóides.

### **2.3.11.2 Extração**

As alíquotas obtidas conforme descrito no item anterior, foram submetidas ao refluxo com 100 mL de ácido sulfúrico 1% (Merck), por 15 minutos. Os extratos foram filtrados a vácuo, e, a três alíquotas de 1 mL, foram adicionadas 0,1 mL, respectivamente, dos Reagentes de Dragendorff, Mayer e Bertrand (BP Appendix), para verificar o aparecimento de precipitado. O extrato ácido restante foi alcalinizado com amônia concentrada (pH maior que 10, medido com papel indicador de pH Merck). O extrato aquoso alcalino foi extraído duas vezes com 15 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi reunida e evaporada em temperatura ambiente. A fase aquosa foi acidificada, realizadas as reações anteriores, para verificar se todo alcalóide foi extraído, e após descartada (Figura 11).



**Figura 11** – Esquema de extração de alcalóides.

### 2.3.11.3 Identificação

A cromatografia de camada delgada (CCD) foi escolhida por dar informações rápidas e portanto aplicada frequentemente para uma triagem inicial (DRÄGER, 2002).

A identificação qualitativa dos alcalóides em extratos obtidos de folhas e flores de *Brugmansia* foi realizada por meio de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando-se placas do tipo sílica-gel G F254 (20x20) Merck.

O resíduo da amostra foi dissolvido em metanol Merck para HPLC, e o hidrobromidrato de escopolamina e atropina, de referência (Sigma), foram preparadas conforme United State Pharmacopeia (USP 24) na concentração de 10 e 20 mg, respectivamente .

Após aplicação de aproximadamente 2  $\mu\text{L}$  de solução das amostras e substância química de referência, a placa foi transferida para cuba cromatográfica saturada contendo: clorofórmio, dietilamina e acetona. Após o sistema eluente atingir 150 mm acima do ponto de aplicação, a placa cromatográfica foi retirada e mantida em repouso até evaporação completa do sistema eluente.

A visualização das manchas foi obtida após a revelação em UV 254 nm e exposição da placa cromatográfica a vaporização com o reagente iodo platínico.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 TRANSPORTE E ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE *Brugmansia suaveolens* NUTRIDAS COM DIFERENTES FONTES NITROGENADAS

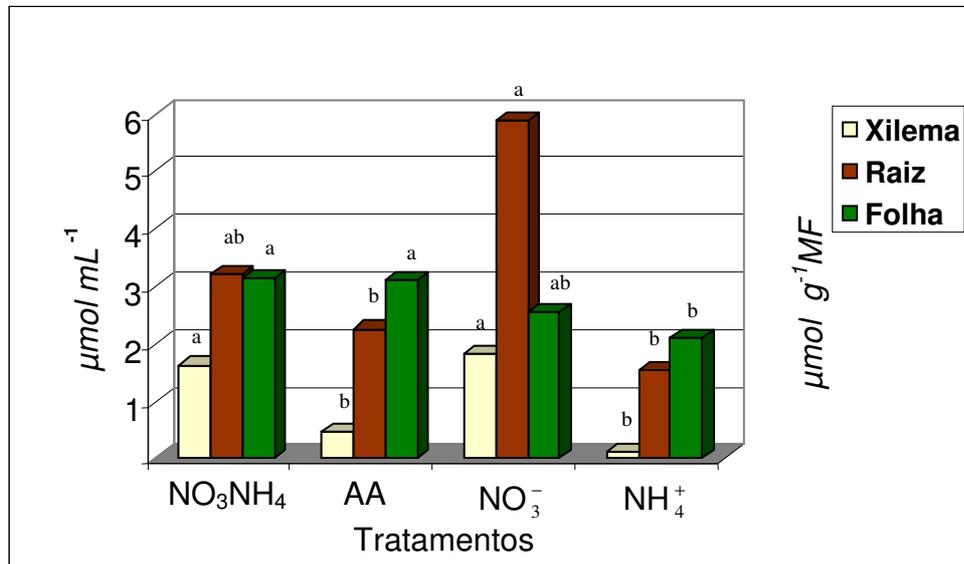
Um conjunto de experimentos foi conduzido para estabelecer os padrões de transporte e de assimilação de N em *Brugmansia suaveolens* cultivadas na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ .

#### 3.1.1 Composição nitrogenada da seiva do xilema e constituinte do sistema radical e aéreo de plantas de *Brugmansia suaveolens* nutridas com diferentes fontes de nitrogênio

Na seiva do xilema a concentração de nitrato foi significativamente superior nos tratamentos  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  em relação às plantas crescidas com aminoácidos e  $\text{NH}_4^+$ , apresentando valores próximos entre si. Os teores de nitrato na seiva de xilema das plantas cultivadas na presença de amônio ou aminoácidos como única fonte de N, mostraram-se reduzidos não diferindo entre si (Figura 12).

A concentração de nitrato em raízes das plantas sob o tratamento com  $\text{NO}_3^-$  foi mais elevada, não havendo diferença significativa em relação ao tratamento  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . No entanto, teores significativamente inferiores foram detectados nos tratamentos com  $\text{NH}_4^+$  e aminoácidos. Em folhas, os tratamentos com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e aminoácidos provocaram diferença significativa superior nos níveis de nitrato em relação ao tratamento com  $\text{NH}_4^+$ , enquanto no tratamento com  $\text{NO}_3^-$  o teor desse íon

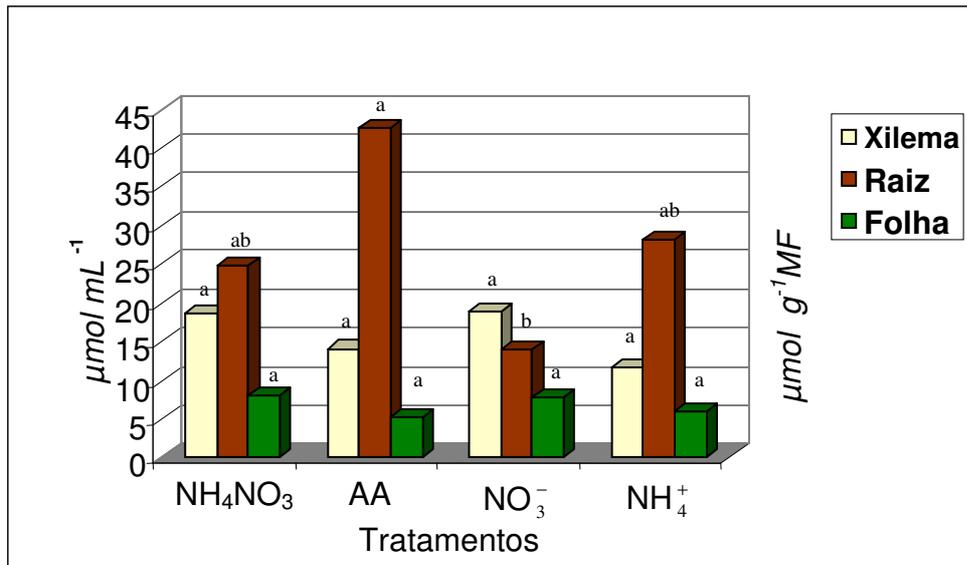
foi intermediário, não diferindo significativamente dos demais tratamentos (Figura 12).



**Figura 12** - Teor de nitrato em seiva do xilema, raiz e folha de plantas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos (AA),  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Médias seguidas de mesma letra entre tratamentos, para xilema, raiz ou folha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

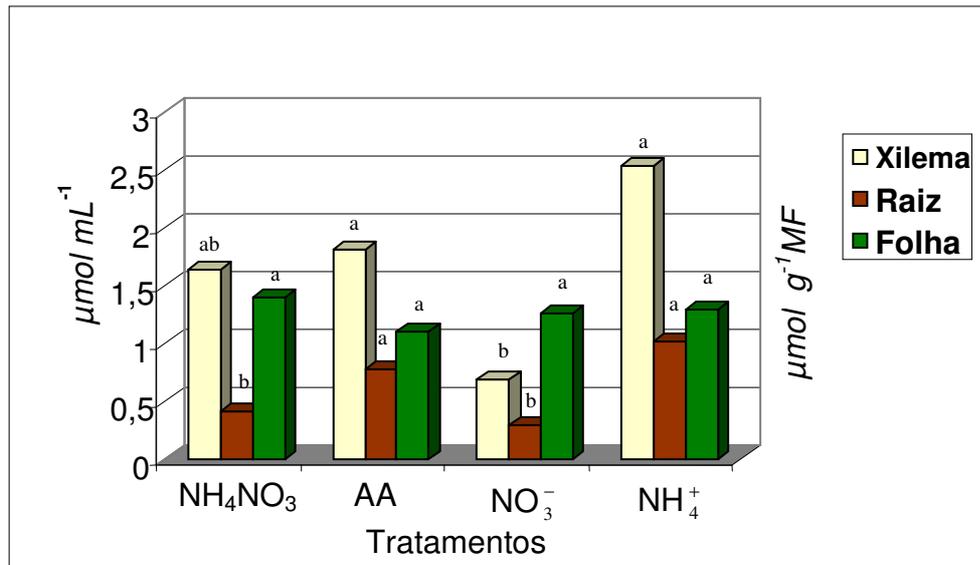
O teor de amônio no xilema embora não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5%, mostrou resposta semelhante à encontrada em relação ao íon nitrato: teores mais elevados na seiva de plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , e inferiores nos tratamentos com aminoácidos e  $\text{NH}_4$  (Figura 13).

Em raízes, concentração significativamente maior de amônio foi determinada no tratamento com aminoácidos, em relação aos das plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , ocorrendo menor valor entre os tratamentos com as quatro fontes nitrogenadas. Os teores de amônio nos tratamentos  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foram semelhantes não diferindo significativamente daqueles encontrados nos demais tratamentos. Em relação aos teores de amônio nas folhas não houve uma variação considerável (Figura 13).



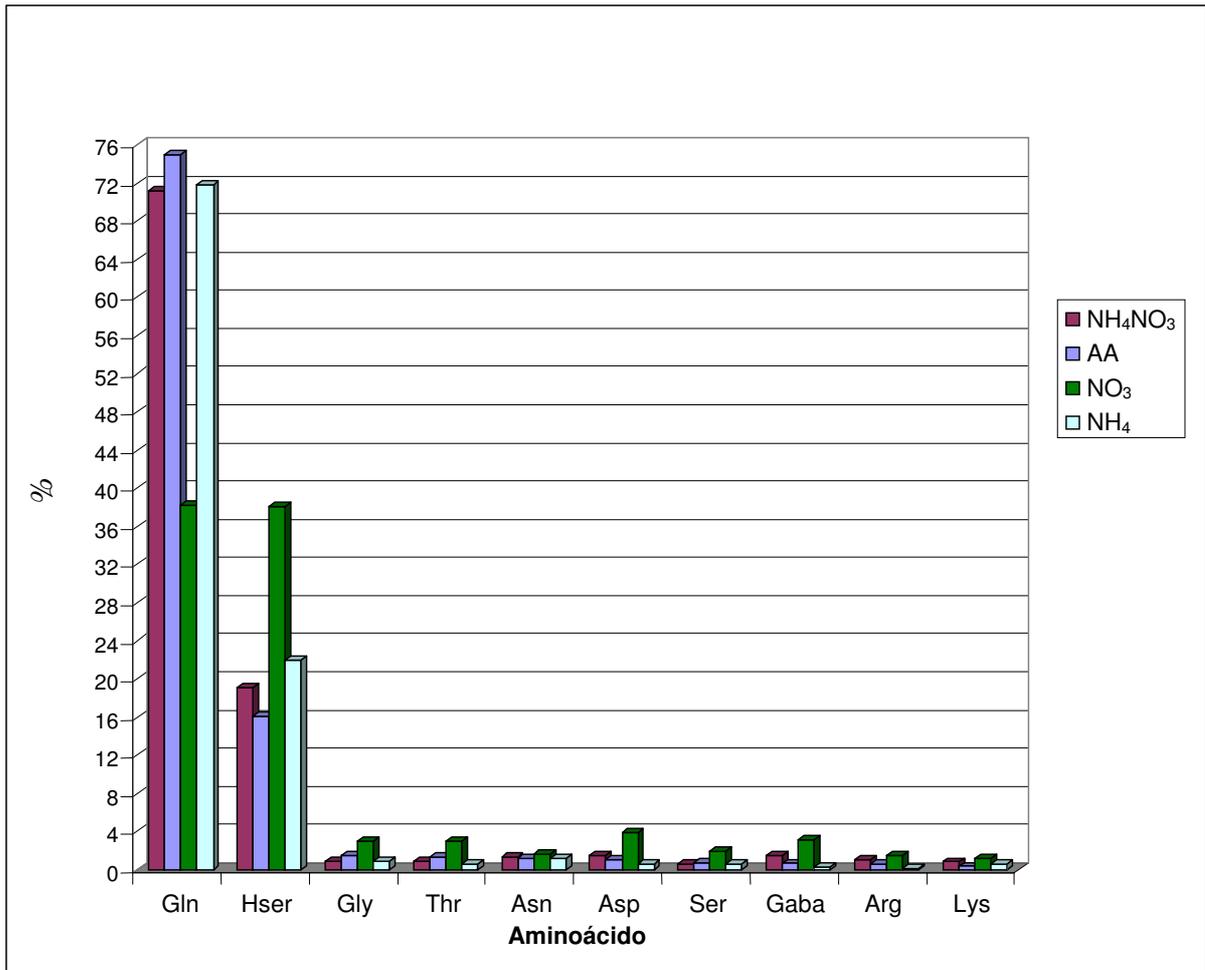
**Figura 13** - Teor de amônio em seiva do xilema, raiz e folha, de plantas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Médias seguidas de mesma letra entre tratamentos, para xilema, raiz ou folha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e AA, ocorreu um aumento significativo do teor de aminoácidos totais (ALT) na seiva do xilema e na raiz, em relação ao tratamento com nitrato. Na presença de nitrato de amônio foram determinados valores intermediários, sem diferir dos demais tratamentos, no xilema. Enquanto, na raiz o teor de AA foi significativamente inferior, não diferindo com tratamento com nitrato. Em folhas, os teores foram semelhantes nos quatro tratamentos (Figura 14).



**Figura 14** - Teor de aminoácidos totais em seiva do xilema, raiz e folha de plantas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Médias seguidas de mesma letra entre tratamentos, para xilema, raiz ou folha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

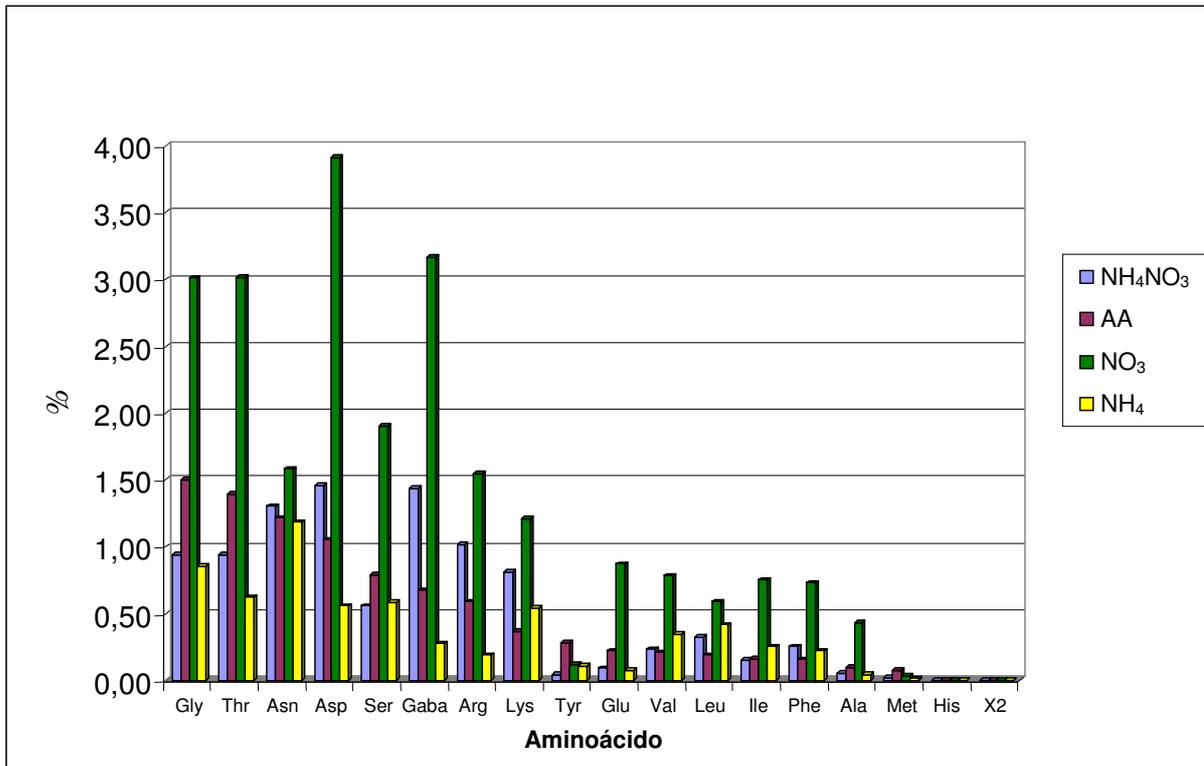
A composição aminoacídica transportada no xilema de *B. suaveolens* indicou que glutamina (Gln) é o principal aminoácido presente nas plantas nutridas com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA) e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Embora o teor de Gln tenha sido também elevado na seiva de plantas nutridas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nesse tratamento houve uma mudança do perfil aminoacídico comum aos demais tratamentos, com teores de homoserina (Hser) em quantidades semelhantes aos do aminoácido Gln. Proporção elevada de Gln, acima de 70%, foi obtida nos tratamentos com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (71,19%); AA (74,93%); e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (71,80 %), seguida de Hser (20 %). Enquanto, no tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> esta proporção foi equivalente entre Gln (38,29%) e Hser (38,06%), sendo, portanto, os aminoácidos predominantes na seiva do xilema (Figura 15).



**Figura 15** - Composição de aminoácidos (%) predominantes da seiva do xilema de plantas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

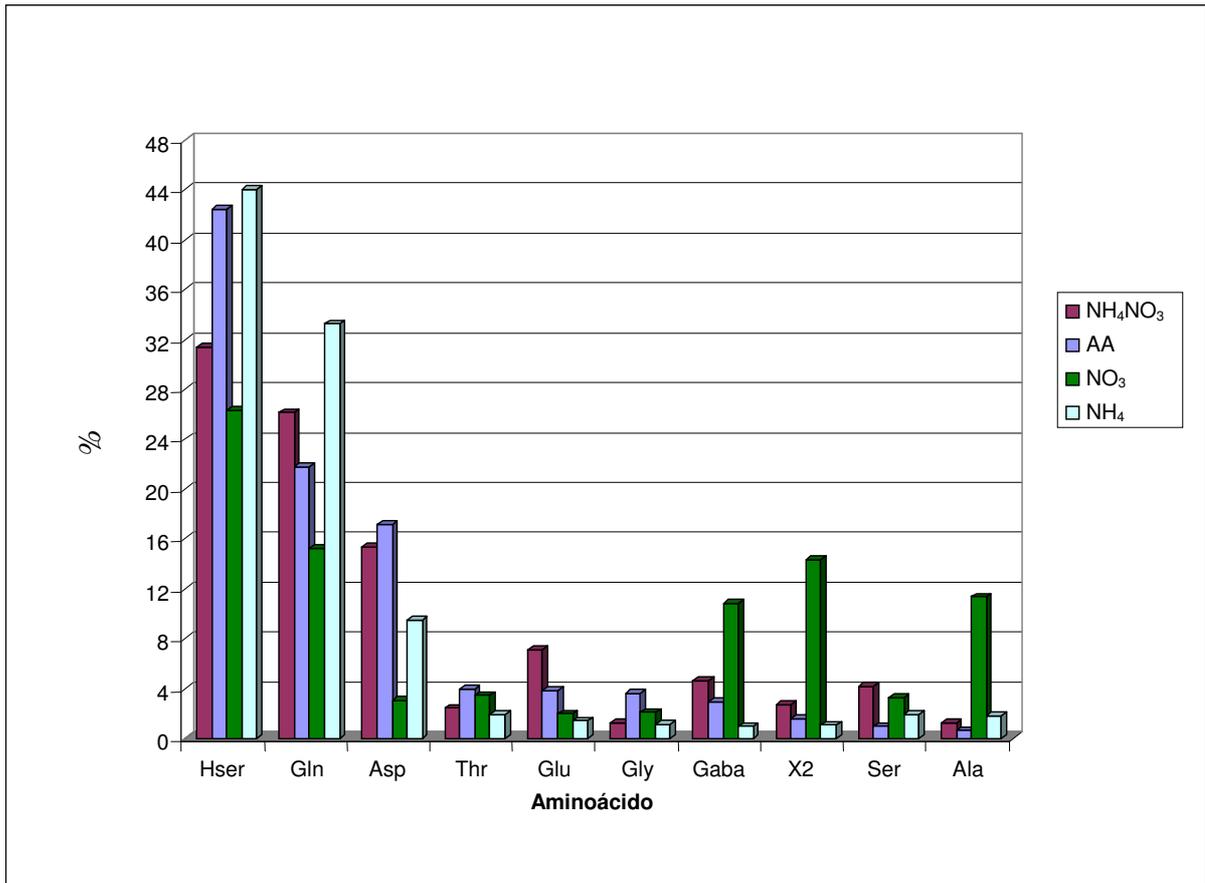
Outros aminoácidos foram encontrados no xilema em concentrações muito inferiores, assim o aspartato (Asp) maior no tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (3,91%) e em menor proporção no tratamento com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,46%), sendo o terceiro aminoácido nestes dois tratamentos. Menor teor foi registrado no tratamento com aminoácidos (1,05%) e bem inferior no tratamento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (0,55%). A Gly (1,50%) foi o terceiro aminoácido, em quantidade no tratamento com aminoácidos como fonte de nitrogênio, e no tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (3,01%) e inferior a 1% nos demais tratamentos. Na presença de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, a Asn (1,18%) foi quantitativamente o terceiro aminoácido transportado. Ainda no xilema, no tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, considerável teor de ácido gama-aminobutírico (Gaba) (3,17%) foi detectado. Valores inferiores foram detectados no tratamento com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,44%) e abaixo de 1% nos demais

tratamentos. Ainda, a treonina (Thr) foi o aminoácido com maior concentração no tratamento com  $\text{NO}_3^-$  (3,01%) e no tratamento com aminoácido (1,39%) ( Figura 16).



**Figura 16** - Composição de aminoácidos com teores abaixo de 4 % transportados em seiva de xilema de plantas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos (AA),  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ .

Em raízes, predominaram os aminoácidos Hser (31,42 %; 42,46 %; 44 %); Gln (26,14 %; 21,82 %; 33,25 %) e Asp (15,41 %; 17,15 %; 9,48 %), concentrações determinadas respectivamente nos tratamentos com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; aminoácidos e  $\text{NH}_4^+$ . Enquanto que na presença do íon  $\text{NO}_3^-$  houve uma distribuição mais homogênea entre os quatro aminoácidos Hser (26,34%), Gln (15,29%), Ala (11,35%) e Gaba (10,88%) (Figura 17).



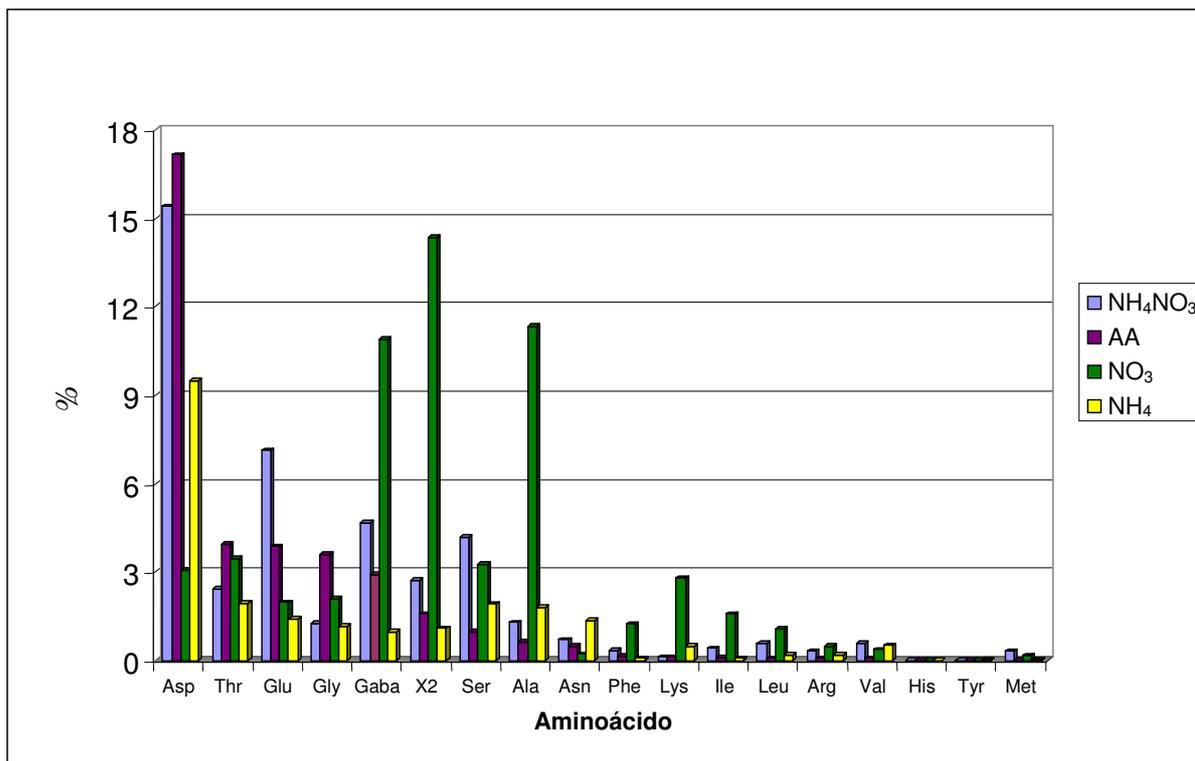
**Figura 17** - Composição de aminoácidos (%) predominantes em raízes de plantas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

No tratamento com amônio, Hser e Gln juntamente, corresponderam à proporção de 77,25% do total de aminoácidos, maior valor encontrado entre os tratamentos, que associado ao maior incremento de ALT, sugere a importância desses dois aminoácidos na assimilação de N na presença exclusiva de amônio. O aminoácido Asp com 9,48% e os aminoácidos Thr, Ser, Ala e Glu cada um com concentrações menores de 2% e os demais com valores inferiores a 1% (Figuras 15 e 17).

Nas plantas nutridas com AA, a proporção (Hser + Gln) foi de 64,28 % do total de aminoácidos encontrados em raízes, concentração mais baixa em relação ao tratamento com amônio, devido à menor concentração de Hser, além de menor concentração de ALT. Houve, também, incremento significativo na concentração de Asp, 17,15 %. Ainda, os aminoácidos Thr, Glu, Gly e Gaba atingiram cada um proporção próxima de 4 %, contribuindo os demais aminoácidos com menos de 1 %.

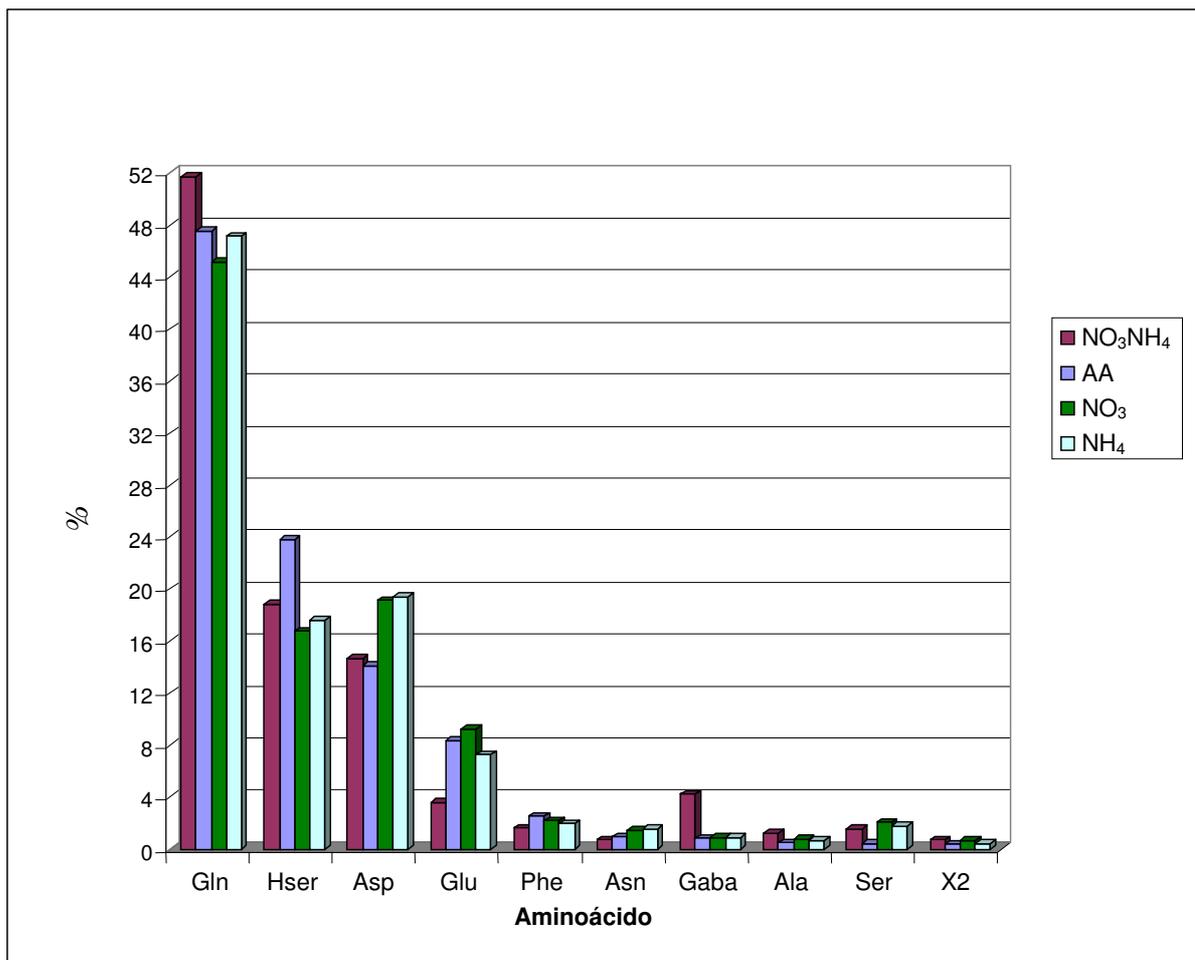
No tratamento com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a proporção Hser + Gln alcançou o menor valor em relação aos tratamentos AA e  $\text{NH}_4^+$  (57,56 %), ocorrendo nesse caso menor teor de Gln. Do total de aminoácidos, Asp contribuiu com 15,41 %, o Glu com 7,12 %, sendo o percentual mais elevado deste aminoácido encontrado entre as quatro diferentes formas de N. Ainda, o Gaba e Ser atingiram individualmente 4,5 % do total, Thr e Ala aproximadamente 2 % e outros com menos de 1 % (Fig.15 e 17).

A maior alteração no perfil aminoacídico em raízes foi observado no tratamento com íon  $\text{NO}_3^-$ , onde tanto o teor de ALT foi significativamente menor, quanto a proporção Hser + Gln, perfazendo apenas 41,64 %. O Asp correspondeu ao menor teor entre todos os tratamentos (3,05%), que somado à Thr, Ser e Lys giraram em torno de 12,50% do total. Por outro lado, Ala e Gaba corresponderam a concentrações significativas entre os tratamentos (11,35% e 10,88%), respectivamente. Ainda, uma substância não identificada designada por  $X_2$ , contribuiu também em teor relativamente elevado (14,34%). O aminoácido Gly foi detectado em concentração inferior a 3 % e Glu, Phe, Ile e Leu contribuíram individualmente com menos de 2 % do total (Fig.14, 17 e 18).



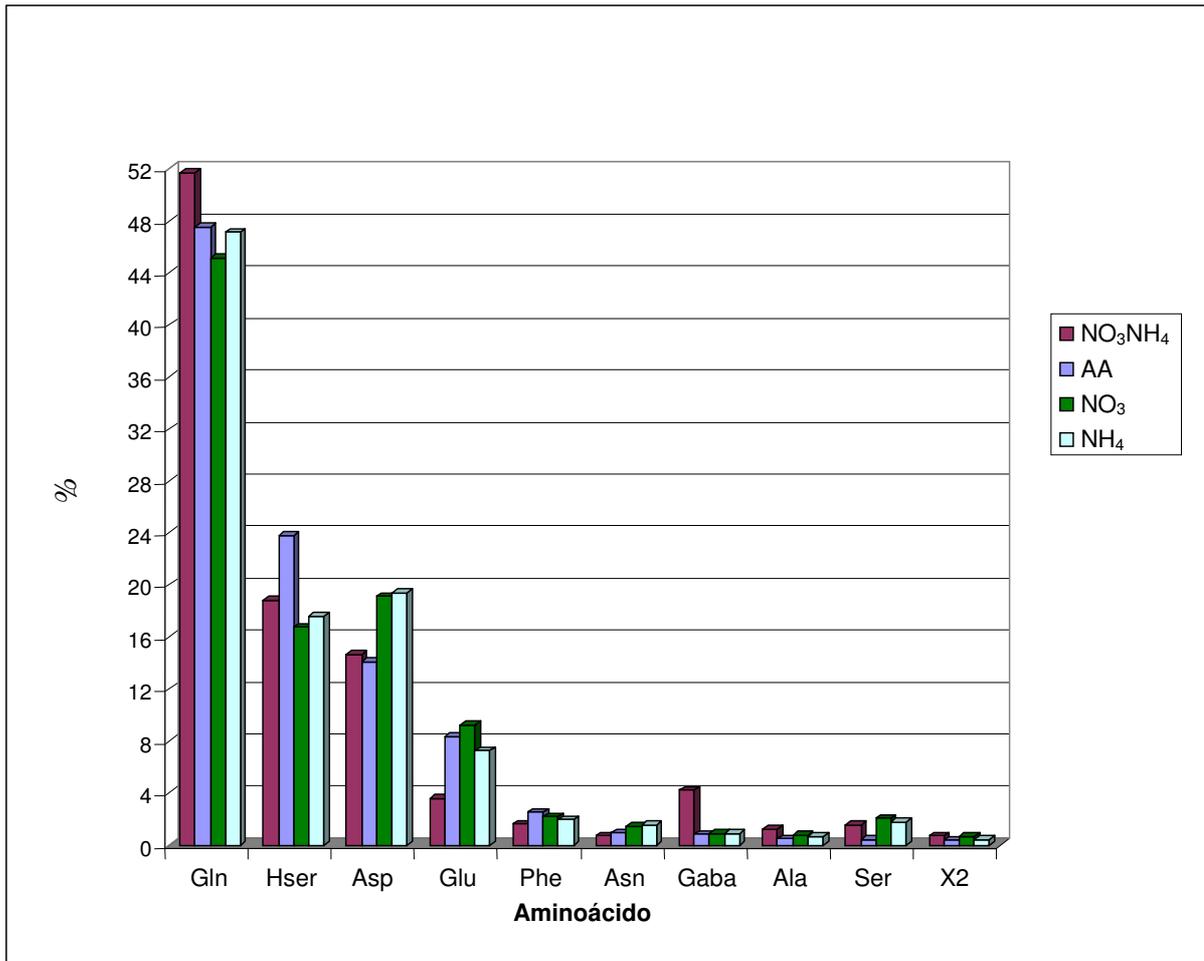
**Figura 18** - Composição de aminoácidos presentes em proporção inferior a 18 % em raiz de plantas de *Brugmansia suaveolens*, cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Em folhas, o aminoácido Gln predominou em todos os tratamentos, correspondendo a valores próximos entre si, desse modo, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (51,69%), AA (47,48%), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (45,12%) e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (47,14%). Entretanto, a proporção dos demais aminoácidos variou com a fonte de N, sendo estabelecido para os tratamentos com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ou AA, as seguintes proporções respectivas: Hser (18,82 % e 23,83 %), e Asp em menor quantidade (14,62 % e 14,05 %). Nos tratamentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram determinados teores relativamente mais elevados de Asp em relação a Hser para esses tratamentos: Asp (19,13% e 19,36%) e Hser (16,73% e 17,62%). O Glu correspondeu ao quarto aminoácido em ordem decrescente de concentração encontrado em folhas para a maioria dos tratamentos, sendo verificada a seguinte ordem entre os tratamentos: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (9,21%), AA (8,35%), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (7,27%) e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (3,55 %). Nesse último tratamento o Gaba foi detectado em concentração levemente superior ao Glu (4,19%), e presente em proporção inferior a 1 % nos outros tratamentos. A Phe contribuiu com 2,52 %, 2,18 %, 1,95 % e 1,96 %, respectivamente para os tratamentos com AA, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Figura 19).



**Figura 19** - Composição de aminoácidos predominantes em folhas de plantas de *Brugmansia suaveolens*, cultivadas em vermiculita na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos (AA),  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ .

Outros aminoácidos em concentrações inferiores a Gln, Hser, Asp e Glu foram encontrados em folhas: Ser variou entre 1,50 % e 2,0 % para os tratamentos  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e menos de 1% no tratamento com AA. O aminoácido Asn foi equivalente em  $\text{NH}_4^+$  (1,54%) e  $\text{NO}_3^-$  (1,41%) e inferior a 1% nos outros tratamentos. Ala correspondeu a 1,19% em  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e inferior a 1% nos outros. Os aminoácidos Arg, Val, Ile, Leu, Lys, proporcionalmente inferiores a 1% em todos os tratamentos, bem como Tyr, apenas não detectada no tratamento AA e Met registrada somente em  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . O aminoácido His não foi detectado em nenhum dos tratamentos (Figura 20).



**Figura 20** - Composição de aminoácidos inferior 19 % em folha de plantas de *Brugmansia suaveolens*, cultivadas em vermiculita na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos (AA),  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ .

Ao se comparar a influência das diferentes fontes nitrogenadas sobre o padrão de transporte de aminoácidos no xilema verificou-se nas plantas tratadas com o  $\text{NO}_3^-$  um padrão diferenciado em relação ao encontrado em plantas sob as outras formas de nutrição. A aplicação do  $\text{NO}_3^-$  na concentração de 15 mM causou diminuição considerável da proporção de Gln e aumento de Hser no xilema e o efeito inverso, teores elevados de Gln e mais baixos de Hser nos tratamentos com aminoácidos, amônio e nitrato de amônio.

As folhas de plantas de trombeta tiveram proporções relativamente altas de Gln e Hser seguida por Asp e Glu, tendo este último aminoácido um decréscimo no tratamento com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e, também, onde foi detectado maior concentração de Gaba (Figuras 19 e 20).

A proporção mais baixa de Gln nas folhas, em relação à transportada no xilema sugere uma utilização rápida dessa amida na parte aérea. Por outro lado, as diferenças encontradas com relação ao teor de Gln nas folhas, parece explicar muito pouco as variações encontradas no xilema frente ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ .

O elevado teor de Gln no xilema de plantas nutridas com amônio comparado aquelas sob  $\text{NO}_3^-$ , sugere que a proporção deste aminoácido na seiva de xilema é dependente da concentração do íon  $\text{NH}_4^+$ . O elevado teor de ALT, neste tratamento reforça esta hipótese, indicando incremento da síntese de aminoácidos nas plantas, especialmente Gln. O aumento dessa síntese induzido pelo  $\text{NH}_4^+$  poderia ser justificado, pelo menos em parte, por não haver necessidade de reduzir  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$  antes de ser incorporado em compostos orgânicos. Por outro lado, a elevação de Gln no xilema das plantas crescidas sob AA sugere absorção desta amida presente neste tratamento. Ainda não pode ser descartada, a produção de Gln decorrente da assimilação de nitrato, uma vez que foram detectados teores significativos desse íon em raízes submetidas a esse tratamento, provavelmente decorrente de processo bacteriano, uma vez que tais experimentos foram desenvolvidos em um período de três meses em condições não-assépticas.

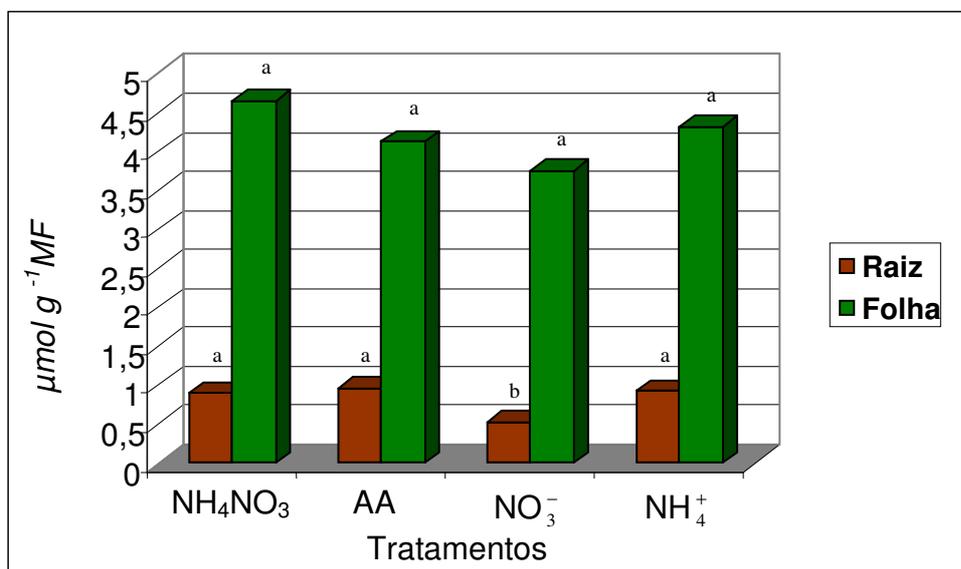
Os teores de Gln no xilema mantiveram correspondência com os teores de Gln nas raízes. Nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , os teores detectados no xilema e raízes foram inferiores aos encontrados nas plantas sob os demais tratamentos.

Os teores elevados de Gaba e Ala encontrados nas raízes, em comparação com os encontrados na seiva de xilema, nas plantas tratadas com  $\text{NO}_3^-$ , sugere que esses aminoácidos desempenham funções específicas no metabolismo desse órgão. Em tecidos de raízes de *Ricinus*, a composição de aminoácidos foi significativamente diferente daquela transportada no xilema, a qual sugere que a absorção de aminoácidos no xilema é um processo seletivo (SCHOBERT e KOMOR, 1990).

Entre os diferentes tratamentos, no xilema e raízes e mesmo nas folhas, foram detectados teores inferiores de ALT nas plantas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ , bem como as maiores alterações da composição de aminoácidos, sugerindo mudança na via de assimilação do N e maior grau de similaridade entre a composição de aminoácidos transportada no xilema das plantas nutridas com AA,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

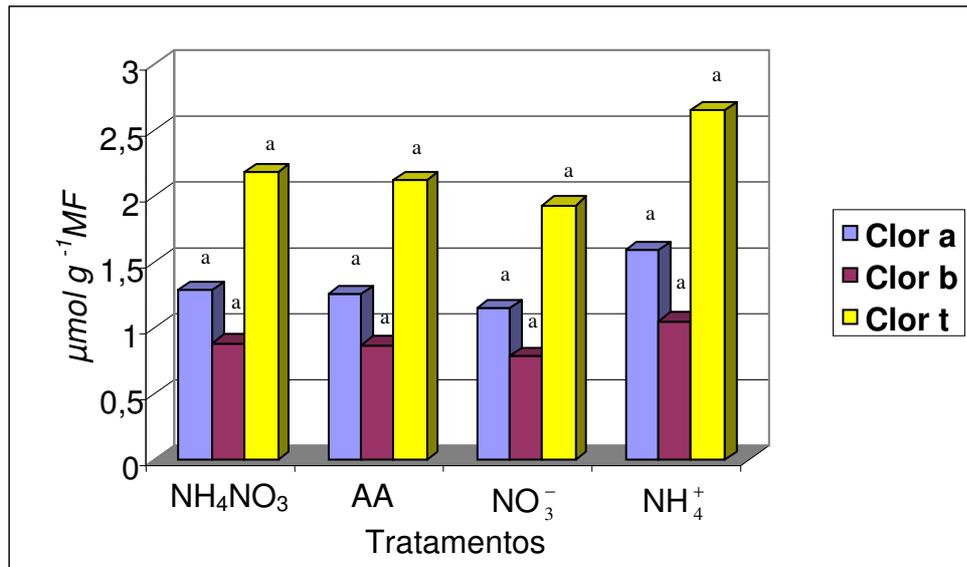
Em raízes, a concentração de proteínas foi relativamente baixa em todos os tratamentos. Porém, as plantas nutridas com aminoácidos,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

apresentaram valores significativamente superiores em relação ao tratamento com  $\text{NO}_3^-$ . Em folhas os teores detectados foram muito semelhantes sem diferir estatisticamente ( $P \leq 0,05$ )(Figura 21).



**Figura 21** - Teores de proteínas solúveis totais em raízes e folhas, de plantas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos (AA),  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Médias seguidas de mesma letra entre tratamentos, para raiz ou folha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os teores de clorofila a, b e total, nos tratamentos com  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aminoácidos e  $\text{NO}_3^-$  não foram significativos entre si pelo Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 22).

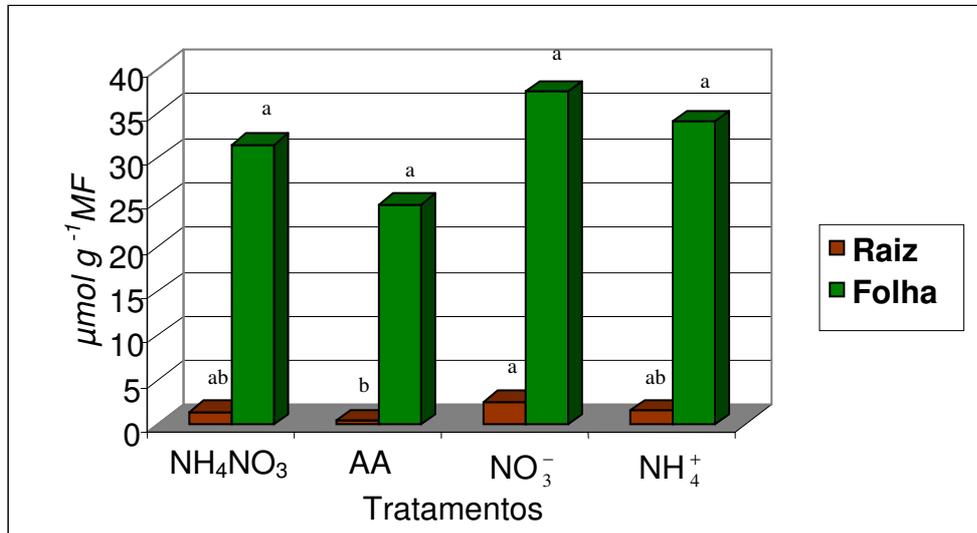


**Figura 22** - Teores de clorofilas a, b e total em folhas de *Brugmansia suaveolens* cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Médias seguidas de mesma letra entre tratamentos para folha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.1.2 Atividade das enzimas redutase do nitrato (RN; EC 1.6.6.1) e glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) em raízes e folhas de plantas de *Brugmansia suaveolens* nutridas diferentes fontes de nitrogênio

A atividade da redutase do nitrato (RN) nas raízes atingiu valores significativamente superiores nas plantas nutridas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tratamento no qual o teor de nitrato no tecido de raiz alcançou os maiores níveis, portanto onde esteve presente a maior disponibilidade do substrato da enzima. A atividade de RN decresceu nos tratamento com NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sendo severamente reduzida no tratamento com AA. A atividade da RN nas folhas e raízes pode ser induzida pela presença do substrato (GALANGAU *et al.*, 1998; VICENTZ *et al.*, 1993) então a concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estimula a síntese da enzima (HEWITTET *et al.*, 1976) a qual junto com a quantidade de Gln livre sejam provavelmente os metabólitos chave que governam a capacidade de redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na planta (SOLOMNSON e BARBER, 1990). Em condições de baixo teor de Gln e disponibilidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a atividade da RN e a capacidade de redução de N aumentam, enquanto que em quantidades elevadas de Gln diminuem a redução do N e decresce a atividade da

RN. A RN é uma enzima chave no processo de assimilação de nitrato pelas plantas (Figura 23).

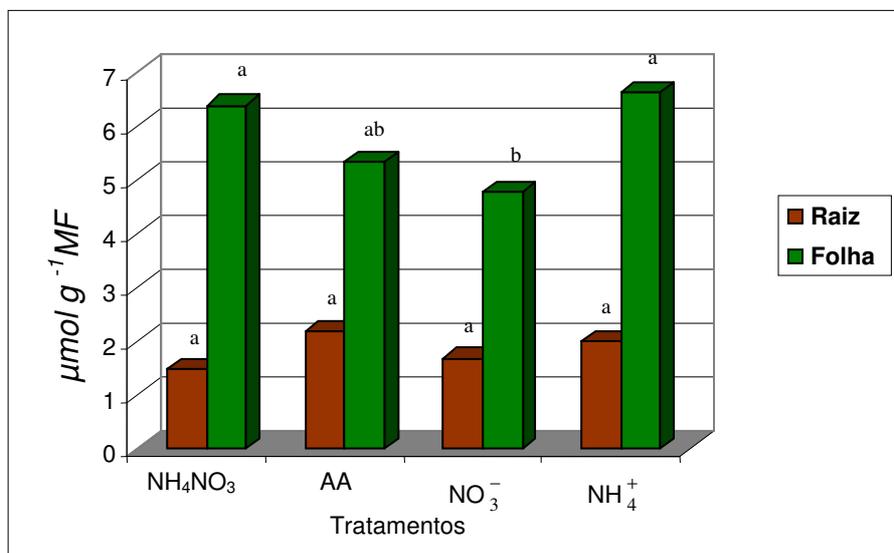


**Figura 23** - Atividade da redutase do nitrato em folhas e raízes de plantas de *Brugmansia suaveolens*, cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Médias seguidas de mesma letra entre tratamentos para raiz ou folha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nas folhas a atividade da RN foi muito superior à atividade em raiz, cerca de 25-30 vezes, quando foi fornecido N na forma mineral e cerca de 80 vezes no tratamento AA. Entre os tratamentos não houve diferença considerável, sendo detectada no tratamento AA a menor atividade. Os resultados demonstram que a redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em *B. suaveolens* ocorre preferencialmente na parte aérea, independente da disponibilidade de nitrato, o que pode ser apoiado pelas quantidades de nitrato encontradas no xilema e presentes nos tecidos das raízes e foliares nos tratamentos com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e AA, concentrações provavelmente disponibilizadas pelo processo de nitrificação.

A atividade da GS nas raízes foi igual para todos os tratamentos, pois não diferiram estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ). No entanto a atividade da GS nas folhas foi bem superior do que na raiz. Nas plantas nutridas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a atividade da GS foi significativamente inferior em relação aos demais tratamentos. As elevadas atividades de GS e da RN reforçam a hipótese de serem as folhas os sítios

preferências de redução do nitrato e de assimilação de amônio, independente da fonte nitrogenada (Figura 24).

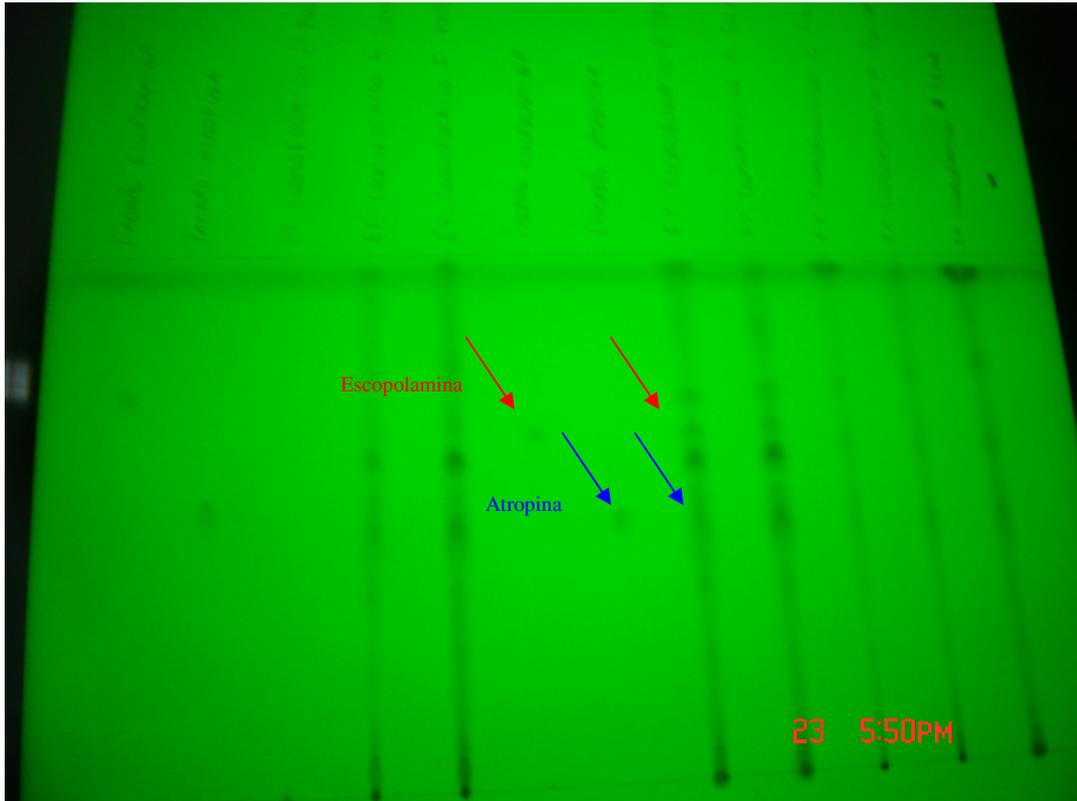


**Figura 24** - Atividade da glutamina sintetase em folhas e raízes de plantas de *Brugmansia suaveolens*, cultivadas em vermiculita na presença de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, aminoácidos (AA), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Médias seguidas de mesma letra entre tratamentos para raiz ou folha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.1.3 Caracterização e Identificação de alcalóides

No intuito de oferecer alternativa mais simples e menos onerosa, foi testada a cromatografia de camada delgada contra padrão, como método para detectar os alcalóides escopolamina e atropina em folhas e flores de *Brugmansia suaveolens*.

O resultado obtido demonstra a similaridade das manchas, comprovando a presença da escopolamina e atropina nas amostras analisadas. A proximidade entre os valores de R<sub>f</sub> obtidos nos padrões e nas amostras e o espectro de absorção no UV e revelação química com o reagente iodo platínico indicaram a presença destes dois fármacos. Ainda, outras manchas foram detectadas mas não identificadas com características de alcalóides. Os valores de R<sub>f</sub> 0,63 e 0,79 representam respectivamente os alcalóides atropina e escopolamina (Figura 25).



**Figura 25** - Análise cromatográfica de extrato de folhas e flores de *Brugmansia suaveolens*.

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados mostrados no presente trabalho permitem concluir que em *Brugmansia suaveolens* a redução do nitrato e assimilação do amônio ocorre preferencialmente nas folhas. O aminoácido glutamina constitui o principal composto orgânico nitrogenado de transporte no xilema, resultante da assimilação do íon amônio, seguido de homoserina. O fornecimento exclusivo de nitrato resulta no transporte de proporções equivalentes de glutamina e homoserina, como consequência da assimilação do íon. A espécie selvagem coletada no estágio de floração apresenta os alcalóides escopolamina e atropina em folhas e flores.

## REFERÊNCIAS

ALVES, M.N. **Alocação de alcalóides tropânicos em *Brugmansia suaveolens* (SOLANACEAE)**. 2003. 92p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

AMARANTE, L. **Transporte e Metabolismo de glutamina em soja [*Glycine max*(L.)Merril]: uma relação estreita com a fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico**. 2002. 92p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BACKES, A.; NARDINO, M. **Nomes populares e científicos de plantas do Rio Grande do Sul**. São Leopoldo: Unisinos, 2001. 202p.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.I. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Maringá: Manole, 2003. 439p.

BRANDÃO, A. D. **Papel da Redutase do Nitrato em soja sob condições de hipóxia do sistema radicular**. 2005. 101f. Tese (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BRINKER, F. The rational treatment of coughs with botanical medicines. **Phytotherapy**. Oak Glade, UK. v.3, n.3, p 103, 1993/94.

BROWN, J.H. Atropina, escopolamina e drogas antimuscarínicas relacionadas. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P. (eds.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.98-108.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 3.ed. Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists, 2001. 1367p.

BUDAVARI, S. **The MERCK Index**. Ed Rahway, New Jersey:Merck & Co.,1996. Monografia n°907: Atropine.p.148.

CORREA, A.P.R.; RODRIGUES, A.G.; BARBANO, D.B.A. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, Ministério da Saúde. 2006. 60p.

COSTA, A. F.. **Farmacognosia**. 5.ed. I.vol. Lisboa, Portugal, Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. 1081p.

COUTEUR, P. e BURRESON, J. **Os Botões de Napoleão- as 17 moléculas que mudaram a História**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar., 2006. 342p.

CREN, M.; HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants: regulation of gene and protein expression from the organto the cell. **Plant Cell Physiology**.Versailles. n.40, p.1187-1193, 1999.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. West Sussex, England: John Wiley & Sons LTD, 2000. 466p.

DRÄGER, B. Analysis of tropane and related alkaloids:**Journal of Chromatography A**. Elsevier. com. 2002.

EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 14.ed. London: WB Saunders Company Limited, 1996. 612p.

FORDE, B.G.; CULLIMORE, J.V..The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. **Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**,Oxford. v.5 p.246-296, 1989

HELDT,H.W. **Plant Biochemistry & Molecular Biology**.New York: Oxford University Press Inc.1997. 522p.

HOPKIS, W.G. Introduction to Plant Physiology. **Plants and Nitrogen**. New York: John Wiley & Sons. 1999. 512p. Cap 6, p.99-121.

HOSHIDA, .;TANAKA,Y;HIBINO,T.;HAYASHI,Y.;TANAKA,A.;TAKABE,T.;TAKABE,T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**.Springer,Netherlands. n.43, p.103-111, 2000.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

LEA, P.J.; MOROT-GAUDRY, J.F. **Plant Nitrogen**. New York: Springer Verlag, 2001. 407p.

LIMA, A.L.da S. **Relação entre longevidade foliar, nitrogênio e compostos secundários em folhas de leguminosas arbóreas**. 2005. 73p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)-Instituto de Biologia,Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

LORENZI, H.; MATOS,F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil:ativas e exóticas**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LUNARDI, J.K.D.;SILVA JR.,A.A.;MATOS,J.A;SOUTO,A.A.;SCHÜTZ,M.K. e ALBUQUERQUE JR,C.L.. Trombeteira – dos rituais à industrialização. **Agropecuária Catarinense** (Florianópolis SC) v.20, n.2, p.32-35, jul. 2007.

MARENCO, R.A.;LOPES.N.F. **Fisiologia Vegetal** : Fotossíntese, Respiração, Relações Hídricas, Nutrição Mineral. Viçosa: UFV, 2005. 451p.

MATTISON, N.; SCHJOERRINHG, J.K. Dynamic and steady-state responses of inorganic nitrogen pools and NH<sub>3</sub> exchange in leaves of *Lolium perenne* and *Bromus erectus* to changes in root nitrogen supply. **Plant Physiology**.Stanfor,CA. v.128, p.742-750, 2002.

MENDONÇA, E.H.M..**Fixação e reações de assimilação de Nitrogênio em *Crotalaria juncea* L.** 2002. 73p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

NETTO, J.F.de A. **Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica**. 2005. 60p.Tese (Mestrado em Agronomia-Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,Piracicaba,SP.

OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P.; COSTA, F.B. **PLANTAS TÓXICAS: Conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003. 64p.

OTT, J. **Pharmacotheon: Drogas enteógenas, sus fuentes vegetales y su historia**. Barcelona: Los libros de la Liebre de Marzo ,S.L.,1996. 627p.

PATE,J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants.**Soil Biology and Biochemistry**.Belfast. v1, n.5, p.109-119. 1973.

PEREIRA, S.; CARVALHO, H.; SUNKEL, C.; SALEMA , R. Immunocytolocalization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves os *Solanum tuberosum* L.*Protoplasma*.Viena. v.167, p.66-73. 1992.

REITZ, P. RAULINO. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC. Conselho Nacional de Pesquisas, Departamento de Recursos Naturais Renováveis, 1966. 319p.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER,V.E. **Pharmacognosy and Pharmacobio Biotechnology**. Tradução de Ivone Castilho Benedetti. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372p.

SALISBURY, F.B.; ROSS,C.W. **Plant Physiology**. 4.ed. Belmont, USA: Wadsworth Publishing Company, 1991. 682p.

SCHOBERT, C.; KOMOR, E. Transfer of amino acids and nitrate from the roots into the xylem of *Ricinus communis* seedlings. **Planta**.Bayreuth. v.181, p.85-90. 1990.

SCHULTES, R.E.; HOFMANN, A. **Plantas de los Dioses**: San Pedro de los Pinos, México: Solar Servicios Editoriales, 2000. 208p.

SHARAPIN,N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**.Bogotá,Colômbia.Ed.Roberto Pinzón S.1.ed.2000.248p

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS e UFSC, 1999. 821p.

SODEK, L. & SILVA, D.M. Nitrate inhibits soybean nodulation and nodule activity when applied to root regions distant from the nodulation sites. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Londrina. n.8, p.187-191. 1996.

SOUZA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2.ed. Fortaleza: UFC, 2004. 445p.

TAIZ,L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TEIXEIRA, J.;PEREIRA, S.; CANOVAS, F; SALEMA, R. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L.cv.Désirée) plants: cell and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. **Journal of Experimental Botany**.Oxford. v.56, n.412,p663-671. 2005.

THOMAS, A.L..**Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine Max*) com sistemas radiculares sob deficiência de Oxigênio**. 2004.102p..Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

WEINER,N. Atropina,escopolamina e drogas antimuscarinicas correlatas.In: GILMAN, A.G.;RALL, T.W.,NIES, A.S.,TAYLOR, P.(eds.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,1991.1232p. Part 7.p.86-97.

YANG, G., XU, K., LUO,Q. Clinical study of scopolamine detoxification for treatment of heroin addicts. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**.Bethesda v.76, n.2, p.141-144. 1996.In:Chem.Abstr.,v.125:185712z.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos-Editora Universitária, 2001. 500p