

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ALINE MARENGONI ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO DESTINO CELULAR DOS ÁCIDOS FERÚLICO E SINÁPICO
DEUTERADOS APLICADOS EXOGENAMENTE EM RAÍZES DE SOJA E MILHO**

Maringá
2018

ALINE MARENGONI ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO DESTINO CELULAR DOS ÁCIDOS FERÚLICO E SINÁPICO
DEUTERADOS APLICADOS EXOGENAMENTE EM RAÍZES DE SOJA E MILHO**

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

Orientador: Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Maringá
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

A447a Almeida, Aline Marengoni
Avaliação do destino celular dos ácidos ferúlicos e sinápico deuterados aplicados exogenamente em raízes de soja e milho / Aline Marengoni Almeida. -- Maringá, 2018.
46 f. : il., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, 2018.

1. Aleopatia. 2. Ácidos hidroxicinâmicos e lignificação. I. Santos, Wanderley Dantas dos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular. III. Título.

CDD 21.ed. 572.4
AHS-CRB-9/1065

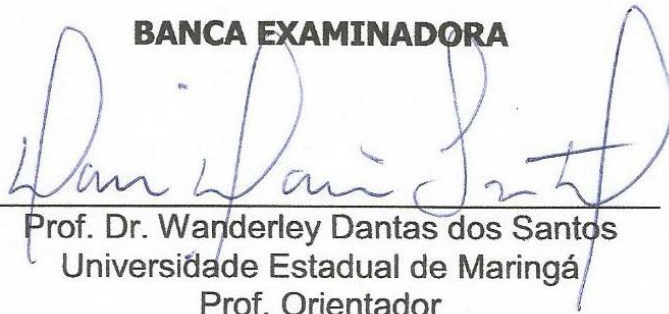
ALINE MARENGONI ALMEIDA

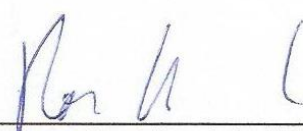
**AVALIAÇÃO DO DESTINO CELULAR DOS ÁCIDOS FERÚLICO E SINÁPICO
DEUTERADOS APLICADOS EXOGENAMENTE EM RAÍZES DE SOJA E MILHO**

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

Aprovado em: 21.02.2018

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos
Universidade Estadual de Maringá
Prof. Orientador


Dr. Rogério Barbosa de Lima
Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Bem-Estar Animal da Prefeitura
Municipal de Maringá


Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho
Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me amparar em mais esta etapa da minha vida. Aos meus pais Pedro e Márcia, ao meu irmão Gustavo por estarem sempre ao meu lado, por todo o apoio.

Agradeço a todos os professores que já passaram em minha vida, principalmente aqueles que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Ao professor Wanderley por mais uma vez ter aceitado ser meu orientador; obrigada pela paciência e compreensão.

Aos professores Dr. Kazuhiko Fukushima e Yasuyuki Matsushita, da Universidade de Nagoya no Japão, por sintetizarem e fornecerem cordialmente os compostos marcados. Ao professor Eduardo Pilau e sua orientanda Diany por terem auxiliado nas análises de espectrometria de massas, fundamentais para este trabalho.

Agradeço a Cidinha por toda ajuda e ensinamentos passados não apenas para meu desenvolvimento profissional, mas também pessoal.

A todos os meus amigos de laboratório, que fizeram o meu trabalho ficar mais leve mesmo em momentos de dificuldades.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a Universidade Estadual de Maringá.

BIOGRAFIA

Aline Marengoni Almeida nasceu em Maringá (PR) em 16/09/1995. Possui graduação em Tecnologia em Biotecnologia, pela Universidade Estadual de Maringá (2016). Iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular) também pela Universidade Estadual de Maringá em março de 2016.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de uma breve revisão bibliográfica e um artigo científico, “Avaliação do destino celular dos ácidos ferúlico e sinápico deuterados aplicados exogenamente em raízes de soja e milho”, que avalia a canalização de derivados do ácido cinâmico nas via dos fenilpropanóides ao serem empregados como aleloquímicos. Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, o artigo será redigido de acordo com a seguinte revista:

Almeida, A.M., dos Reis, D.L.S., Pilau, E.J., Fukushima, K., Matsushita, Y., dos Santos, W.D. Avaliação do destino celular dos ácidos ferúlico e sinápico deuterados aplicados exogenamente em raízes de soja e milho. *Plant Physiology and Biochemistry* (JCR = 2,724; Qualis B1)

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO – A alelopatia é um termo empregado para denominar a interação positiva ou negativa entre plantas por meio de compostos químicos, denominados aleloquímicos. Via de regra, aleloquímicos são provenientes do metabolismo secundário das plantas, como alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos. O ácido cinâmico é um composto fenólico, originado a partir da fenilalanina gerada da via do chiquimato, servindo como precursor para outros compostos, tais como os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. O mecanismo da atividade alelopática destes compostos já foi examinada em diversos trabalhos, que reuniram evidências de que estes compostos seriam canalizados para via dos fenilpropanoides. Esta conclusão, contudo, se baseia no fato de que a aplicação exógena destes compostos estimula a lignificação, com consequente restrição do crescimento. Todavia, nunca foi demonstrado de forma inequívoca se os compostos exógenos são de fato canalizados para o apoplasto ou se apenas estimulam a lignificação como outros agentes estressantes tais como metais pesados e elicitores fúngicos.

OBJETIVOS – Plântulas de soja e milho tratadas com ácidos ferúlico e sinápico não marcados e marcados com hidrogênio pesado (deutério, ^2H) e investigar os destinos, avaliando o teor de lignina, conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos esterificados à parede celular, composição monomérica da lignina e examinando seus efeitos sobre o crescimento.

MATERIAIS E MÉTODOS – Sementes de soja e milho foram dispostas em papel Germitest, sendo acondicionados em tubos próprios para germinação, permanecendo por 72 horas, 25°C , no escuro. Posteriormente, as plântulas foram selecionadas e colocadas em suportes para 25 plântulas, sendo transferidas para recipientes contendo solução nutritiva (pH 6,0) incluindo ou não ácido ferúlico ou sinápico (1mM), por 24 horas (fotoperíodo 12/12 h, $\pm 25^\circ\text{C}$). As raízes foram medidas antes da incubação e após o período de 24h, e a variação de crescimento foi obtida pela diferença entre as medidas. A biomassa fresca foi determinada após a retirada dos sistemas e a biomassa seca após secagem em estufa, até obtenção de peso constante. A técnica do brometo de acetila realizada em espectrofotômetro, foi empregada para avaliar o teor de lignina; a quantificação de ácidos hidroxicinâmicos esterificados à parede foi averiguada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para analisar a composição monomérica da lignina foi utilizada a técnica de oxidação alcalina com nitrobenzeno em HPLC. Além disso, foi utilizada cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) para identificar possível incorporação dos compostos no polímero de lignina. O teste de Dunnett foi aplicado para analisar as diferenças entre os parâmetros, e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO – O tratamento com ácido ferúlico ocasionou uma redução drástica no crescimento radicular em ambas as plântulas. Houve também um aumento expressivo na lignificação tanto na soja (67%) quanto no milho (30%). O conteúdo de ácido ferúlico esterificado à parede não aumentou significativamente no milho, mas houve um aumento significativo na soja. Por sua vez o conteúdo de ácido *p*-cumárico esterificado à parede foi reduzido no milho e elevado na soja. O tratamento com ácido ferúlico deuterado revelou que o ácido ferúlico exógeno serviu como precursor para síntese dos monômeros G e S da lignina. Os tratamentos com ácido

sinápico não afetaram nenhuma variável biométrica, apesar de terem promovido um significativo aumento no conteúdo de lignina (36%) na soja. Os tratamentos com ácido sinápico marcado permitiram verificar que o ácido sinápico exógeno foi canalizado exclusivamente para síntese do monômero S, tanto na soja quanto no milho. Observamos ainda uma extensiva esterificação do ácido sinápico às paredes celulares tanto nas plântulas de soja quanto nas de milho, após o tratamento com ácido sinápico. De forma similar ao verificado para os tratamentos com ácido ferúlico, no milho o tratamento com ácido sinápico reduziu o conteúdo de ácido *p*-cumárico, enquanto que na soja o tratamento elevou seu conteúdo. Os ácidos ferúlico e sinápico foram canalizados para via dos fenilpropanoides e destinados em parte para a síntese de monolignóis e em parte para esterificação à parede. Estes resultados sugerem que os dois ácidos hidroxicinâmicos são introduzidos na via dos fenilpropanoides a partir de sua ativação promovida pela enzima 4-cumarato-CoA ligase que os converte à sua forma ativada com coenzima A, intermediários importantes tanto para sua esterificação à parede celular, quanto para sua redução aos respectivos monolignóis. A aplicação do ácido ferúlico não alterou significativamente o conteúdo de ácido ferúlico esterificado à parede no milho, mas elevou sensivelmente o conteúdo de ácido ferúlico esterificado à parede na soja. Esta diferença pode ser devida ao milho apresentar parede tipo II, típica das Commelinídeas, onde o ácido ferúlico exerce um papel crucial interligando os polímeros da parede para controlar o crescimento celular e reduzir sua digestibilidade por enzimas. Ao contrário, a soja apresenta parede tipo I, onde a interligação dos polímeros é realizada principalmente por proteínas estruturais (extensinas). Por outro lado, em ambas as plantas, o ácido ferúlico exógeno foi canalizado para a formação de lignina, provavelmente porque a formação do feruloil-CoA contorna as etapas regulatórias da via. Por sua vez, o ácido sinápico exógeno, embora tenha sido incorporado à parede não afetou o crescimento das plantas.

CONCLUSÃO – Tomados em conjunto, estes resultados sugerem fortemente que a restrição do crescimento radicular observada, se deveu à elevação do conteúdo de componentes reticuladores da parede celular, sobretudo ao conteúdo de ácido ferúlico, na soja e da lignina, no milho, a partir dos esqueletos carbônicos fornecidos exogenamente.

PALAVRAS-CHAVE: Alelopatia, ácidos hidroxicinâmicos e lignificação.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION – Allelopathy is a term used to denote the positive or negative interaction between plants by means of chemical compounds, called allelochemicals. As a rule, allelochemicals are derived from the secondary metabolism of plants, such as alkaloids, terpenoids and phenolic compounds. Cinnamic acid is a phenolic compound, originating from the phenylalanine generated from the chiquimate pathway, serving as a precursor for other compounds, such as *p*-coumaric, caffeic, ferulic and synapic acids. The allelopathytic mechanism of these compounds has already been examined in several studies, which gathered evidence that these compounds are channeled into the phenylpropanoid pathway. This conclusion, however, relies on the strong lignification resulting from exogenous application with consequent restriction of growth. However, it has never been unequivocally shown whether exogenous compounds are channeled into the apoplast or whether they simply stimulate lignification, as occurs with many other stressing agents such as heavy metals and fungal elicitors.

OBJECTIVES – Soybean and corn seedlings treated with ferulic and synapic acid marked and not marked with heavy hydrogen (deuterium, ²H) investigating its destination assessing lignin content, hydroxycinnamic acids ester-linked to cell wall polysaccharide content, monomeric composition of lignin and effects on plant growth.

MATERIALS AND METHODS – We displayed seeds of soybean and maize in Germitest paper, packed it in tubes suitable for germination and incubated for 72 h at 25°C in the dark. Seedlings were selected and placed in stands for 25 seedlings, and transferred to containers containing nutrient solution (pH 6.0), including or not ferulic or synapic acid (1 mM) for 24 h in a photoperiod of 12/12 h at 25°C. The roots were measured before incubation and after the 24 h period, the growth variation was considered as the difference between the measurements. Fresh biomass was measured immediately after and dry biomass after drying in an oven until constant weight. We determine lignin content by acetyl bromide method; hydroxycinnamic acids on the wall were assessed by high performance liquid chromatography (HPLC). Monomeric composition of the lignin was obtained after alkaline oxidation with nitrobenzene in HPLC. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) was used to identify possible incorporation of the compounds in the lignin polymer. The Dunnett test was applied to analyze the differences between the parameters, $p \leq 0.05$ and values were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION – Treatment with ferulic acid caused a drastic reduction in root growth in both seedlings analyzed. There was also an expressive increase in lignification in both soybean (67%) and maize (30%). The content of ferulic acid esterified to the wall did not increase significantly in corn, but a significant increase in soybean. In turn, the content of *p*-coumaric acid esterified to the wall was reduced in maize and high in soybean. Treatment with deuterated ferulic acid revealed that exogenous ferulic acid served as a precursor for the synthesis of the G and S monomers of lignin. The treatments with synapic acid did not affected any biometric variable, although they promoted a significant increase in lignin content (36%) in soybean. The treatments with marked synapic acid allowed to verify that the synapic acid was channeled exclusively for S monomer synthesis, both in soybean and corn. We

also observed an extensive esterification of the synapic acid to the cell walls in both soybean and maize seedlings after treatment with synapic acid. Like observed for ferulic acid treatments, in maize the treatment with synapic acid reduced the content of *p*-coumaric acid, whereas in soybean the treatment increased its concentration. From these data, we can conclude that ferulic and synapic acid were in part channelled into the phenylpropanoid pathway, in part for the synthesis of lignin and partly esterified directly to the wall. These results suggest that both hydroxycinnamic acids are introduced into the phenylpropanoid pathway by 4-coumarate coenzyme A ligase that converts them into their activated forms ester-linked to Coenzyme A, a step necessary for both esterification into the cell wall and reduction to produce monolignols. The application of ferulic acid did not significantly altered the content of ferulic acid esterified to the wall in maize, but significantly increased its content in soybean. This difference can be due to the corn type II typical wall of Commelinids, where ferulic acid plays a crucial role in the interconnection of wall polymers, control of cell growth and reduce its digestibility by enzymes. Unlike the type I soybean, where the interconnection of the polymers is carried out mainly by structural proteins (extensins). On the other hand, in both plants, exogenous ferulic acid was channelled into monolignol biosynthesis, probably because the direct production of feruloyl-CoA bypasses regulatory steps of the pathway. In turn, the exogenous synapic acid, although affected the composition of the wall, its presence did not affect the growth of the plants.

CONCLUSION - Taken together, these results strongly suggest that the restriction of root growth observed was due to the elevation of the content of the cell wall crosslinking components, mainly to the ferulic acid content, in soybean and lignin, in maize, from the carbon skeletons provided exogenously.

KEYWORDS: Allelopathy, hydroxycinnamic acids and lignification.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A redução do impacto ambiental e do risco para a saúde dos humanos decorrentes do uso de agroquímicos estão entre os maiores desafios da agricultura moderna. A alelopatia nos oferece um caminho para percorrer neste ideal de uma agricultura sustentável de alta produtividade (POPA et al., 2008, LI et al, 2010). Molisch (1937) atribuiu o termo alelopatia (do grego *allelon*: mútuo e *pathos*: sofrer), ao efeito de um organismo (planta ou microrganismo) no desenvolvimento/crescimento de uma planta por meio da liberação de compostos químicos, referidos como aleloquímicos, no meio ambiente (RICE, 1984). A liberação de aleloquímicos pode ocorrer por meio de lixiviação de folhas e outras partes aéreas das plantas, exsudação radicular, volatilização ou decomposição de parte e/ou da planta (WEIR, PARK, VIVANCO, 2004). A alelopatia é um fenômeno de interferência entre as plantas e seu meio ambiente que auxilia na competição por espaço, luz, água e nutrientes, via de regra inibindo o crescimento das plantas vizinhas, por meio da liberação de aleloquímicos (GERSTIENZON E ENGELBERTH, 2013).

A ação de um aleloquímico depende do metabolismo do receptor, atividade de microorganismos do solo e aspectos físico-químicos (TREZZI et. al., 2016). Assim, a identificação do mecanismo de ação alelopática é laboriosa e difícil de generalizar (STEENACKERS et al., 2016). Contudo, fatores alelopáticos afetam o processo de sucessão ecológica e devem ser considerados na rotação de culturas em práticas de plantio direto (FERREIRA E ÁQUILA, 2000). Além disso, interferências alelopáticas podem ser úteis para o controle de plantas daninhas (INDERJIT E DUKE, 2003, SOLTYS et al., 2013).

Salvo algumas exceções, os aleloquímicos são provenientes da via do chiquimato, metabolismo secundário (INDERJIT E DUKE, 2003; POPA et al, 2008), que faz parte de um conjunto de vias metabólicas comprometidas com a síntese de compostos voltados para a adaptação da planta ao meio ambiente. Estas vias e seus produtos não estão ubiquamente distribuídos no reino vegetal, como as do metabolismo primário, mas são restritas a certos grupos, daí o nome de metabolismo secundário. Não obstante, alguns metabólitos secundários são extremamente importantes e abundantes, como a lignina, que embora restrita ao grupo das traqueófitas (plantas vasculares) é o segundo composto mais abundante da natureza, depois apenas da celulose (BOERJAN, RALPH,

BAUCHER, 2003). Os metabólitos secundários, podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (GERSTIENZON E ENGELBERTH, 2013).

Os compostos fenólicos consistem em moléculas contendo um ou mais anéis aromáticos apresentando um ou mais grupos hidroxila. Os compostos fenólicos são metabólitos que desempenham funções importantes nas plantas, particularmente nos mecanismos de defesa (KULBAT, 2016). Alguns são conhecidos pela sua ação alelopática, que incluem aumentos na permeabilidade da membrana celular, redução no teor e taxa fotossintética, inibição enzimática e inibição da divisão celular (LI et al., 2010).

Os fenilpropanoides são uma classe de compostos fenólicos cujas moléculas apresentam em comum um anel fenólico ligado a uma cadeia alquílica de três carbonos (GERSTIENZON E ENGELBERTH, 2013). O ácido cinâmico é o precursor não fenólico que dá nome a uma classe de fenilpropanoides denominada de hidroxicinamatos. Entre seus principais representantes estão os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico todos com ações alelopáticas já demonstradas. O anel aromático destes compostos é proveniente da via do chiquimato, responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos. A desaminação da fenilalanina pela fenilalanina amônia liase (PAL) resulta na formação de ácido cinâmico, que serve como precursor para síntese de compostos fenólicos (KULBAT, 2016). Em raízes de milho, o ácido cinâmico apresentou maior atividade alelopática quando comparado com alguns de seus derivados (ferúlico, cafeico e *p*-cumárico), afetando significativamente processos fisiológicos e morfológicos (LUPINI et al., 2015). Em soja, o ácido cinâmico reduziu os parâmetros biométricos (comprimentos, pesos frescos e secos), aumentou a atividade de IAA oxidase e cinamato 4-hidroxilase (C4H) e aumentou o teor do monômero H e os teores de lignina total (SALVADOR et al., 2013).

As gramíneas e alguns grupos relacionados podem desaminar a tirosina pela ação de uma tirosina amônia liase (TAL), gerando diretamente ácido *p*-cumárico. O ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico) apresenta diversas atividades terapêuticas como ação antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antimicrobiana, antidiabética e uricosúricos (PEI et al., 2016). Quanto sua ação alelopática apresenta diversos efeitos e na soja, sua aplicação reduz o crescimento radicular, aumenta do teor de lignina e afeta sua composição monomérica (H e G) (ZANARDO et al., 2009),

aumenta a atividade da peroxidase e peroxidação lipídica (DOBLINSKI et al., 2003). Em algumas variedades de arroz interfere negativamente no crescimento e na quantidade de matéria seca (GOGOI, DAS, BARUAH, 2000).

O ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) também apresenta atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticarcinogênica (NICIFOROVIC, ABRAMOVIĆ, 2014). Trabalhos apontam para efeitos positivos após exposição ao ácido sinápico. Em plântulas de *Arabidopsis* a germinação e o crescimento foram estimulados após a exposição a ácido sinápico, estando possivelmente relacionada com a homeostase de ABA (BI et al., 2017). Em soja, o ácido sinápico não interferiu no crescimento radicular; em contrapartida aumentou o teor dos monômeros (G e S) da lignina, sendo possivelmente canalizado para via dos fenilpropanoides (LIMA et al., 2013). O ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) é um dos compostos fenólicos mais profuso em plantas. Foi isolado pela primeira vez em 1866, em *Ferula foetida* (FAZARY E JU, 2007). O ácido ferúlico apresenta uma ampla utilização industrial devido a seu poder antioxidante, sendo utilizado na conservação de alimentos e protetores solares contra radiação UV. Além disso, há relatos apontando efeitos antidiabéticos, anticarcinogênicos, proteção pulmonar e cardiovascular. Ele é ainda precursor da vanilina, profusamente empregada como agente aromatizante (KUMAR E PRUTHI, 2014). Sua aplicação em milho ocasionou em redução do crescimento radicular com conseqüente aumento do teor de lignina, diminuição da atividade da PAL e TAL (FERRO et al., 2015), além de aumento da atividade de IAA oxidase e peroxidase (DEVI E PRASAD, 1996). Gmerek e Politycka (2011) observaram que após tratamento com ácido ferúlico e *p*-cumárico em milho, rabanete e ervilha houve aumento da atividade da lipoxigenase, possivelmente relacionado com o aumento na produção de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. Trabalhos realizados com soja resultaram na diminuição do crescimento, pesos frescos e secos, incremento da atividade da peroxidase, fenilalanina amônia liase e teor de lignina (HERRIG et al, 2002; DOS SANTOS et al., 2004). Alguns destes compostos fenólicos (ácido ferúlico, *p*-cumárico) podem ser encontrados ligados a componentes da parede celular, como polissacarídeos e lignina, influenciando na proteção contra o ataque de patógenos, no controle do crescimento celular e na organização da parede celular.

A parede celular é uma estrutura que envolve as células vegetais, composta por aproximadamente 90% de carboidratos (BUCKERIDGE, CAVALARI E SILVA,

2012). As paredes celulares podem ser divididas em primárias, que são depositadas no momento que a célula está em crescimento/alongamento, e secundárias, depositadas na parede primária após a cessação da expansão celular (HARRIS, 2006; KEEGSTRA, 2010; COSGROVE, 2013). A celulose é o componente mais abundante e ubíquo nas paredes celulares vegetais, mas além da celulose as plantas também apresentam hemiceluloses e polissacarídeos pécnicos, compostos fenólicos, proteínas estruturais, enzimas e sais minerais diversos. A celulose consiste em cadeias lineares não ramificadas de resíduos de glicose unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Sintetizadas em paralelo na membrana plasmática, as moléculas de celulose se ligam por pontes de hidrogênio, formando cristais extremamente resistentes a tensão, denominadas microfibrilas. As hemiceluloses são a segunda classe de polissacarídeos mais abundante na parede celular vegetal. Também formadas por um monossacarídeos unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, elas alternam regiões altamente ramificadas com regiões não ramificadas. Nestas regiões elas são similares à celulose e podem aderir aos cristais por meio de ligações de hidrogênio. Assim, se ligam alternadamente entre si e com diferentes moléculas de celulose interligando-as. Daí também serem conhecidas como ‘glicanos de interligação’. A pectina denomina uma ampla classe de polissacarídeos ácidos bastante complexos que desempenham diversas funções na parede celular como complexação de metais como boro e cálcio, adesão célula-célula na lamela média, controle da porosidade, pH e carga eletrostática, além de outros processos fisiológicos (CARPITA, RALPH, MCCANN, 2015).

De acordo com Carpita e Gibeaut (1993) a parede celular primária pode ser classificada em tipo I e II. A tipo I é encontrada em eudicotiledôneas e monocotiledôneas não-comelinides. Apresenta quantidades semelhantes de celulose e xiloglucano (principal hemicelulose nestas plantas), incorporados em uma matriz de pectina. Neste tipo de parede, os diferentes polissacarídeos podem ser reticulados por proteínas estruturais conhecidas como extensinas. Monocotiledôneas comelinides apresentam parede do tipo II, contendo microfibrilas de celulose interligadas por glucuronoarabinosilanos, com pouca pectina, e proteínas estruturais. Nestas paredes, a reticulação dos polímeros é desempenhada pelo ácido ferúlico e podem ter compostos fenólicos (ácido ferúlico) ligados peculiarmente quando as células param de expandir. Por sua vez, as paredes secundárias se distinguem por apresentarem lignina (CARPITA, RALPH, MCCANN, 2015) sendo o segundo mais abundante componente depois da

celulose (BOERJAN, RALPH, BAUCHER, 2003). Responsável por proporcionar suporte mecânico, auxiliar o transporte de água e nutrientes e dificultar a degradação enzimática dos polissacarídeos presentes na parede celular (HATFIELD, FUKUSHIMA, 2005; LUPOI et al., 2015). A sua biossíntese é resultante de um programa constitutivo normal da planta, mas também pode ocorrer em resposta a diferentes estresses (VANHOLME et al., 2010).

A lignificação inicia-se com a biossíntese dos seus componentes monoméricos, os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, também denominados monolignóis. Eles diferem entre si apenas no grau de metoxilação. Quando polimerizados são denotados como unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). Estas unidades são ligadas entre si por uma sucessão de ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio (éter), com vários tipos de ligações β -O-4, α -O-4, β -5, 5-5, 4-O-5, β -1 e β - β (LUPOI et al., 2015). Além de seus componentes básicos (lignina cor), a lignina apresenta dezenas de outros componentes que embora estejam presentes em menor quantidade, são igualmente importantes para a determinação das propriedades e funções do polímero (lignina não-cor). Entre estes componentes estão os ácidos benzoicos e hidroxicinâmicos com os ácidos ferúlico e *p*-cumárico abundantes nas paredes tipo II (BOERJAN, RALPH, BAUCHER, 2003; VANHOLME et al., 2010; ZHAO, 2016).

A síntese dos compostos fenólicos ocorre a partir dos aminoácidos aromáticos gerados da via do chiquimato, fenilalanina ou tirosina. Após a desaminação por meio da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) ou tirosina amônia liase (TAL; exclusivamente em comelinídes), forma-se uma dupla ligação na região alifática produzindo o ácido cinâmico ou ácido *p*-hidroxicinâmico, respectivamente (SHUAB, LONE, KAUL, 2016). O produto, ácido *t*-cinâmico, apesar de não ser estruturalmente um composto fenólico (não hidroxilado no anel aromático) é precursor imediato de todos os compostos fenólicos e dá nome à classe dos hidroxicinamatos (ANTEROLA E LEWIS, 2002). O ácido *t*-cinâmico é hidroxilado no carbono 4 do anel aromático pela enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H), o produto da reação é o ácido *p*-cumárico, o primeiro ácido fenólico da via. As outras formas livres dos principais ácidos hidroxicinâmicos são os ácidos cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico e sinápico, gerados por sucessivas hidroxilações e metoxilações no anel aromático. As formas ácidas livres dos fenilpropanoídes são ativadas por ligação à coenzima A numa reação catalisada pela enzima 4-cumarato:CoA-ligase (4CL), com gasto de ATP. A forma ativada dos

hidroxinamatos é importante tanto para sua esterificação nos polissacarídeos da parede celular, quanto para sua redução para formar os monolignóis. A redução dos produtos ligados à CoA para sua forma aldeídica correspondente é catalisada pela cinamoil-CoA redutase (CCR). Por fim, os aldeídos são reduzidos aos seus álcoois correspondentes por meio da cinamoil álcool desidrogenase (CAD), gerando os monolignóis (FUKUSHIMA et al., 2001). Após a síntese, os monolignóis são transportados do citosol para parede celular onde são oxidados e acoplados por radicais livres provenientes da ação de peroxidases e lacases (BOERJAN, RALPH, BAUCHER, 2003; VANHOLME et al., 2010; COSGROVE, 2013). Ao menos em angiospermas a redução do aldeído sinapílico à álcool é catalisada pela álcool sinapílico desidrogenase (SAD), essencial para biossíntese do siringil (LI et al., 2001; HUMPHREYS E CHAPPLE, 2002).

Os álcoois hidroxicinâmicos que formam a lignina podem se polimerizar entre si, mas são incapazes de formar ligações com os polissacarídeos da parede. Os ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, podem esterificar as hidroxilas dos açúcares que ramificam as hemiceluloses e pectinas. O ácido ferúlico, por sua vez, é capaz de ambos: esterificar polissacarídeos e se polimerizar com outros fenilpropanoides concomitantemente, conectando polissacarídeos à lignina ou a outro resíduo feruloil esterificado a um polissacarídeo vicinal, interligando-os (DOS SANTOS et al., 2008).

Trabalhos realizados com canola, milho e soja em sistema de hidroponia por período de 24 até 72 h, tratadas com ácido cinâmico e seus derivados fenilpropanoides (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido sinápico) promoveram aumentos da lignificação da parede celular com concomitante redução do crescimento, biomassa seca e fresca das plantas, além de aumento das atividades de enzimas relacionadas com a lignificação, como a peroxidase solúvel (POD) e fenilalanina amônio liase (PAL) (BALERONI et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2008; ZANARDO et al., 2009; BUBNA et al., 2011; LIMA et al., 2013; SALVADOR et al., 2013, FERRO et al., 2015). Estes estudos permitiram sugerir o mecanismo geral da ação alelopática destes aleloquímicos, pelo qual os ácidos hidroxicinâmicos exógenos seriam canalizados para via dos fenilpropanoides e incorporados à parede celular tanto diretamente como ésteres quanto alimentando a formação de monolignóis. Esta hipótese baseia-se principalmente no fato de que a inibição da enzima 4CL, responsável pela ativação dos hidroxinamatos impede a lignificação induzida por estes compostos, mas a inibição da C4H, fundamental para a

via, não afeta o processo de lignificação induzida pela aplicação dos hidroxicinamatos (DOS SANTOS et al. 2008; LIMA et al. 2013). Entretanto, diversos outros agentes estressantes orgânicos (elicitores fúngicos) e inorgânicos (estresse salino, déficit hídrico, metais pesados, etc.) são conhecidos por induzirem a lignificação (FAN et al., 2006; HANO et al., 2006; MENDEN, KOHLHOFF, MOERSCHBACHER, 2007; NEVES et al., 2010; FINGER-TEIXEIRA et al., 2010; PARK et al., 2011; GAL et al., 2015) usando fontes endógenas de carbono e a 4CL muito provavelmente também desempenha um papel relevante nestes processos. Assim, a demonstração de que a 4CL é crucial no processo de lignificação induzido por hidroxicinamatos, não demonstra de forma inequívoca que os esqueletos carbônicos dos hidroxicinamatos aplicados exogenamente são canalizados para a parede celular ou se, ao contrário, apenas induzem uma resposta de defesa. Experimentos complementares, empregando isótopos marcados (^{13}C ou ^2H) permitiriam identificar a origem da lignina e ácido ferúlico observados na parede celular após contato com estes aleloquímicos tão comuns na natureza (YAMAUCHI e FUKUSHIMA, 2004; ROLANDO et al., 2004).

REFERÊNCIAS

- ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, v. 61, p. 221-294, 2002.
- BALERONI, C. R. S. et al. Effects of ferulic and caffeic acids on canola (*Brassica napus* L. cv. Hyola 401) seed germination. **Seed Science and Technology**, v. 28, p. 201-207, 2000.
- BI, B. et al. Sinapic acid or its derivatives interfere with abscisic acid homeostasis during *Arabidopsis thaliana* seed germination. **BMC Plant Biology**, 17:99, 2017.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519-546, 2003.
- BUBNA et al. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). **Journal of Plant Physiology**, 168, pg. 1627-1633, 2011.
- BUCKERIDGE, M.S.; CAVALARI, A. A. & SILVA, G.B. Parede Celular. In: Kerbauy, G.B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 165-181.
- CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, **The Plant Journal**, 3(1), p.1-30, 1993.

- CARPITA, N.C.; RALPH, J.; MCCANN, M.C. The Cell Wall *In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L., Ed. Wiley Blackwell, 2015, p.45-110.
- COSGROVE, D. Parede Celulares: Estrutura, Biogênese e Expansão. *In: Taiz, L. e Zeiger, E.. Fisiologia Vegetal*, Artmed, 5. ed, 2013.
- DEVI, S.R.; PRASAD, M.N.V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Biologia Plantarum*, 38 (3), p. 387-395, 1996.
- DOBLINSKI, P.M. et al. Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to p-coumaric and p-hydroxybenzoic acids. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, n.21, 2003.
- DOS SANTOS, W.D. et al. Lignification and related enzymes in Glycine max root growth Inhibition by ferulic acid, *Journal of Chemical Ecology*, vol. 30, p.1203-1212, 2004.
- DOS SANTOS, W.D. et al. Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. *Journal Chemistry Ecol.*, 34, p. 1230-1241, 2008.
- FAN, L. et al. Progressive Inhibition by Water Deficit of Cell Wall Extensibility and Growth along the Elongation Zone of Maize Roots Is Related to Increased Lignin Metabolism and Progressive Stellar Accumulation of Wall Phenolics. *Plant Physiology*, 140, p.603-612, 2006.
- FAZARY, A., JU, H.Y. Feruloyl Esterases as biotechnological tools: current and future perspectives *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 39, p. 811-829, 2007.
- FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERRO, A.P. et al. Effects of cinnamic and ferulic acids on growth and lignification of maize roots. *Journal of Allelochemical Interactions*, 1 (2), p.29-38, 2015.
- FINGER-TEIXEIRA, A. et al. Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, p. 1959-1964, 2010.
- FUKUSHIMA, K. On the mechanism to regulate the ratio of syringil to guaiacyl moieties in lignin *Molecular Breeding of woody Plant*, p. 149-158, 2001.
- GAL, H.L. et al Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 4, p.112-166, 2015.
- GERSTIENZON, J.; ENGELBERTH, J.E. Metabólitos Secundários e Defesa Vegetal. *In: TAIZ, L. E ZEIGER, E.. Fisiologia Vegetal*, Artmed, 5. ed, 2013.
- GMEREK, J., POLITYCKA, B. Response of maize, pea and radish roots to allelochemical stress *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 53, 1, p. 32-37, 2011.
- GOGOI, B.; DAS, K.; BARAUAH, K.K. Effect of allelochemicals on germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) cultivares. *Allelopathy Journal*, 7(2), p. 279-284, 2000.
- HANO, C. et al. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta*, 223, p.975-989, 2006.

- HARRIS, P.J. Primary and Secondary Plant Cell Walls: a comparative overview. **New Zealand Journal of Forestry Science**, 36 (1), p.36-53, 2006.
- HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R.; Can Lignin Be Accurately Measured? **Crop Science**, 45, pg. 832-839, 2005.
- HERRIG, V. et al. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals e inhibited root growth of soybean. **Biological Research**, v. 35, n.1, 2002.
- HUMPHREYS, J., CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion in Plant Biology**,5, p. 224-229, 2002.
- INDERJIT, DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy **Planta**, 217, p. 529-539, 2003.
- KEEGSTRA, K. Plant Cell Wall. **Plant Physiology**, v. 154 (2), p. 483-486, 2010.
- KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and food science**, 80(2), p.97-108, 2016.
- KUMAR, N., PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v.4, p.86-93, 2014.
- LI, L. et al. The Last Step of Syringyl Monolignol Biosynthesis in Angiosperms Is Regulated by a Novel Gene Encoding Sinapyl Alcohol Dehydrogenase. **The Plant Cell**, v.13, p. 1567-1585, 2001.
- LI, Z-H. et al. Phenolics and Plant Allelopathy, **Molecules**, 15, p. 8933-8952, 2010.
- LIMA, R. B. et al. Enhanced lignin monomer production caused by cinnamic acid and its hydroxylated derivatives inhibits soybean root growth. **PLoS One**, 2013.
- LUPINI, A. et al. Morphological and physiological effects of trans-cinnamic acid and its hydroxylated derivatives on maize root types. **Plant Growth Regul.** 2015.
- LUPOI, J. et al. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 49, pg. 871-906, 2015.
- MENDEN B., KOHLHOFF M., MOERSCHBACHER B.M. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. **Phytochemistry**, 68, p. 513-520, 2007.
- MOLISCH, C.H. Der Einfluß einer Pflanze auf die andere Allelopathie. Jena, Fischer, 1937.
- NEVES, G.Y.S et al. Root Growth Inhibition and Lignification Induced by Salt Stress in Soybean. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 196, p. 467-473, 2010.
- NICIFOROVIC, N.; ABRAMOVIĆ, H. Sinapic Acid and its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13, p.34-51, 2014.

- PARK, S.C. et al. Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (*IbLEA14*) gene influences lignification and increases osmotic- and salt stress-tolerance of transgenic calli. **Planta**, 233, p. 621-634, 2011.
- PEI, K. et al. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Society of Chemical Industry**, 96, p.2952-2962, 2016.
- POPA et al. Lignin and polyphenols as allelochemicals. **Industrial Crops and Products**, 27, p. 144-149, 2008.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. Orlando: Academic Press, 1984.
- ROLANDO, C. et al. Lignification in poplar plantlets fed with deuterium labelled lignin precursor. **Comptes Rendus Biologies**, 327, p. 799-807, 2004.
- SALVADOR, V.H. et al Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root growth **Plos One**, v. 8, issue 7, e69105, 2013.
- SHUAB, R., LONE, R., KAUL, K.K. Cinnamate and cinnmate derivatives in plants **Acta Physiologiae Plantarum**, 38:64, p.1-9, 2016.
- SOLTYS, D. et al. Allelochemicals as Bioherbicides — Present and Perspectives, Herbicides - Current Research and Case Studies in Use, Dr. Andrew Price (Ed.), InTech, 2013, DOI: 10.5772/56185.
- STEENACKERS et al., The allelochemical MDCA inhibits lignification and affects auxin homeostasis. **Plant Physiology**, 172, p.874-888, 2016.
- TREZZI et al. Allelopathy: driving mechanisms governing its activity in agriculture. **Journal of Plant Interactions**, 11, p. 53-60, 2016
- VANHOLME, R. et al. Lignin Biosynthesis and Structure **Plant Physiology**, vol. 153, p. 895-905, 2010.
- WEIR, T.L., PARK, S-W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**, 7, p. 472-479, 2004.
- YAMAUCHI, K., FUKUSHIMA, K. The regulation from guaiacyl to syringyl lignin in the differentiating xylem of *Robinia pseudoacacia*. **Comptes Rendus Biologies**, 327, p.791-797, 2004.
- ZANARDO et al. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. **Environmental and Experimental Botany**, 66, pg. 25-30, 2009.
- ZHAO, Q. Lignification: Flexibility, Biosynthesis and Regulation **Trends in Plant Science**, v. 21, n.8, p. 713-721, 2016.

AVALIAÇÃO DO DESTINO CELULAR DOS ÁCIDOS FERÚLICO E SINÁPICO DEUTERADOS APLICADOS EXOGENAMENTE EM RAÍZES DE SOJA E MILHO

Aline Marengoni Almeida¹, Diany Lucy Silveira dos Reis², Eduardo Jorge Pilau², Kazuhiko Fukushima³, Yasuyuki Matsushita³, Wanderley Dantas dos Santos^{1*}.

¹Laboratório de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

²Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

³Universidade de Nagoya, Japão

Autor para correspondência:

Wanderley Dantas dos Santos

Laboratório de Bioquímica de Plantas

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790

CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Tel.: +55 44 3011 4717

E-mail: wdsantos@uem.br

Resumo

Produzidos principalmente por gramíneas, os hidroxicinamatos apresentam efeitos alelopáticos sobre plantas vicinais e sucessoras. Seu mecanismo de ação envolve produção de espécies reativas de oxigênio e aumento da lignificação, seguido por uma forte redução na velocidade do crescimento de plantas sensíveis. Diversos fatores de estresse induzem a lignificação como resposta. Entretanto, como são precursores da lignina, os hidroxicinamatos podem fornecer intermediários da via dos fenilpropanoides que contornam etapas de regulação, levando a uma produção precoce e descontrolada de lignina. Para testar esta hipótese, investigamos o destino metabólico dos ácidos ferúlico e sinápico fornecidos exogenamente a plântulas de soja e milho cultivadas em hidroponia. Para isso, adicionamos 1 mM de ácido ferúlico ou sinápico marcados com deutério à solução nutritiva e, após 24 h, analisamos os conteúdos de lignina, monolignóis, hidroxicinamatos esterificados à parede celular, bem como parâmetros biométricos. O ácido ferúlico elevou o conteúdo dos monômeros S e G, a lignina total, o conteúdo de ácido ferúlico esterificado à parede e reduziu o crescimento. O conteúdo de ácido *p*-cumárico esterificado à parede também foi elevado na soja, mas inibido no milho. O ácido sinápico induziu a lignificação na soja, mas não no milho, aumentando apenas o monômero S da lignina. O conteúdo de ácido sinápico esterificado à parede foi elevado em ambas as espécies, sem prejuízo ao crescimento. Os resultados permitem concluir que o ácido sinápico e ferúlico são parcialmente canalizados para a síntese de lignina e acilação de polissacarídeos da parede celular, induzindo a cessação prematura do crescimento.

Palavras-chaves: Alelopatia; Ácidos hidroxicinâmicos; Lignificação; Ácido ferúlico; Ácido sinápico.

1. Introdução

Determinadas espécies vegetais produzem metabólitos que não exibem uma conexão direta com o desenvolvimento das plantas, denominados metabólitos secundários (Gerstienzon e Engelberth, 2013). Alguns destes metabólitos podem apresentar ação alelopática, como por exemplo, compostos fenólicos (Li et al., 2010). A alelopatia é o termo utilizado para definir a interação entre plantas ou plantas e microrganismos por meio de compostos químicos denominados aleloquímicos (Rice, 1984). Os aleloquímicos podem interferir na germinação e crescimento de plantas vizinhas por interromper diversos processos fisiológicos, dentre eles fotossíntese, equilíbrio hormonal, etc. (Soltys et al., 2013). Entre os compostos fenólicos com ação alelopática está o ácido cinâmico (Salvador et al., 2013) e seus derivados, os ácidos *p*-cumárico (Doblinski et al., 2003; Zanardo et al., 2009; Gmerek e Politycka, 2011), cafeico (Bubna

et al., 2011), ferúlico (Rama Devi e Prasad, 1996; Herrig et al., 2002; dos Santos et al., 2004) e sinápico (Velasco et al., 2013; Šežiene et al., 2017).

Alguns destes trabalhos apontam como principais efeitos após a aplicação destes aleloquímicos o aumento da atividade de enzimas envolvidas na via dos fenilpropanoides com conseqüente aumento do teor de lignina e restrição no crescimento (Rama Devi e Prasad, 1996; Herrig et al., 2002; dos Santos et al., 2004). A lignina é um heteropolímero fenólico resultante do acoplamento oxidativo de álcoois fenilpropênicos encontrados na parede celular secundária das plantas (Ralph et al., 2004). A lignificação inicia-se com a biossíntese dos monômeros, começando com a desaminação da fenilalanina ou tirosina, no caso de monocotiledôneas, provenientes da via do chiquimato (Shuab et al., 2016), seguida por uma série de hidroxilações, metilações e reduções (Zhao, 2016). A fenilalanina é desaminada pela fenilalanina amônia-liase (PAL) produzindo cinamato e amônio. O cinamato é hidroxilado pela cinamato 4-hidroxilase (C4H), uma monooxigenase que produz *p*-cumarato. A enzima 4-cumarato CoA ligase (4Cl) usa o *p*-cumarato, ATP e coenzima A para formar o tioéster CoA, *p*-cumaroil-CoA. Determinadas plantas contêm uma família sucinta de genes de 4Cl, onde as enzimas correspondentes exibem diversas seletividades de substratos (Kutchan et al., 2015). A coenzima A é substituída pelo ácido chiquímico através da hidroxicinamoil-CoA transesterase (HCT). As subseqüentes hidroxilação e metoxilação na posição 3 do anel aromático para formar os radicais cafeoil e feruloil é realizada nos respectivos ésteres. A hidroxilação é catalisada pela cinamato 3-hidroxilase (C3H) e a metilação pela cafeoil CoA *O*-metiltransferase (CCoAOMT). Os ésteres novamente transesterificados pela HCT para formar o feruloil-CoA que pode sofrer uma hidrólise redutiva pela ação da cinnamil CoA redutase (CCR) para formar o coniferaldeído. A ferulato 5-hidroxilase (F5H) adiciona um grupo hidroxil em C5 gerando 5-hidroxiconiferaldeído, que por ação da cafeato ortometil transferase (COMT) origina sinapaldeído. Alternativamente, a cinamil álcool desidrogenase (CAD) reduz o coniferaldeído a álcool coniferílico. A CAD também pode reduzir álcool *p*-coumaraldeído a *p*-cumaril álcool e o sinapaldeído a sinapil álcool (Fukushima, 2001), embora uma sinapil álcool desidrogenase (SAD) também já tenha sido descrita (Li et al., 2001). Após serem exportados ao apoplasto, peroxidases e lacases oxidam os álcoois gerando radicais livres que se polimerizam para formar a lignina. A origem das unidades monoméricas da lignina pode ser inferida a partir da análise do padrão de

metoxilação do anel aromático sendo denominados de unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S)(Boerjan et al., 2003; Vanholme et al., 2010; Cosgrove, 2013). A lignificação das plantas pode ocorrer por um programa ontogenético de desenvolvimento ou em decorrência de estresses bióticos e abióticos (Vanholme et al., 2010).

O aumento da lignificação induzida pelo ácido cinâmico e seus derivados pode ser devido ao estresse promovido por estes compostos estimulando os mecanismos de defesa da planta. Entretanto, o fato de estes compostos serem intermediários da via sugere que os próprios aleloquímicos poderiam alimentar a via de produção de lignina (dos Santos et al., 2004). Contudo, embora evidências apontem nesta direção (Lima et al., 2013; Salvador et al., 2013), ainda não foi demonstrado de forma inequívoca que os esqueletos carbônicos dos aleloquímicos sejam introduzidos na via dos fenilpropanoides e direcionados à parede celular. A quantificação dos três principais monômeros de lignina (H, G e S) pode ser realizada por meio da oxidação por nitrobenzeno (Dean, 1997), derivatização seguida por clivagem redutiva (DFRC)(Lu e Ralph, 1997) ou tioacidólise (Lapierre et al., 1985). Todavia, tais métodos não permitem diferenciar entre os monômeros nativos da planta daqueles que foram alimentados exogenamente. O emprego de isótopos marcados como carbono (^{13}C) ou hidrogênio pesado (deutério, ^2H) possibilita identificar a origem dos compostos da parede celular (Yamauchi e Fukushima, 2004). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a incorporação dos isótopos estáveis de ácido ferúlico e ácido sinápico marcados ou não com hidrogênios deuterados (ácido ferúlico-[3-OCD₃] e ácido sinápico-[3,5-OCD₃]) apresentados na Figura 1, a fim de aprofundar nosso conhecimento sobre o mecanismo de ação alelopática dos hidroxicinamatos na via de lignina em soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*).

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

Sementes de soja (BRS-232) e milho (IPR-164) foram utilizadas para a realização dos experimentos. As sementes de soja foram adquiridas da Embrapa Soja (Londrina) e as de milho pelo IAPAR (PR).

2.2. Produtos químicos

Os ácidos ferúlico e sinápico foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Os isótopos estáveis de ácido ferúlico e ácido sinápico marcados com hidrogênios deuterados (ácido ferúlico-[3-OCD₃] e ácido sinápico-[3,5-OCD₃]) foram sintetizados (Yamauchi et al., 2002) e cordialmente cedidos pelo Prof. Dr. Kazuhiko Fukushima e Yasuyuki Matsushita, da Universidade de Nagoya no Japão.

2.3. Germinação e crescimento das plantas em solução nutritiva

As sementes foram previamente desinfetadas em solução hipoclorito de sódio (NaClO) 2% durante 5 minutos, e a seguir lavadas exaustivamente com água deionizada. A seguir, as sementes foram depositadas entre folhas de papel Germitest, previamente umedecidas, as quais foram enroladas e acondicionadas em tubos de germinação contendo água para manutenção da umidade. A germinação ocorreu em câmara escura, a 25°C, durante 3 dias. Plântulas com três dias de desenvolvimento, foram transferidas para um suporte com placa de acrílico ajustável para vinte e cinco plântulas, sendo acondicionados em recipientes de vidro com 200 ml de solução nutritiva Dong (pH 6,0) com ou sem o fenilpropanóide (1mM). As soluções nutritivas foram tamponadas com um tampão fosfato de sódio e potássio 67 mM, para eliminar possíveis efeitos de pH. Os recipientes foram acondicionados em câmara para crescimento (25°C ± 2, fotoperíodo de 12/12 h) durante 24 horas. As raízes foram medidas antes e depois do período de incubação, a diferença nos comprimentos foi calculada para todas as amostras, correspondendo a variação de crescimento (Δ_{growth}), expressa em centímetros. Em seguida, as raízes e os caules foram separados com auxílio de um estilete e, imediatamente, determinada a respectiva biomassa fresca. Raízes foram acondicionadas em estufa, à temperatura de 60°C, até a obtenção de peso constante (biomassa seca). Os valores médios das repetições de biomassas frescas e secas obtidos foram expressos em gramas. A matéria seca foi utilizada para determinação dos teores e composição monomérica da lignina e para quantificação de ácidos hidroxicinâmicos esterificados a parede celular.

2.4. Processamento para determinação do teor e composição monomérica da lignina

Após obtenção do material seco, em gral de porcelana, macerando 0,3 g de tecido em 7,0 mL de tampão fosfato de sódio e potássio (50 mM, pH 7,0) e transferido o material para um tubo de centrífuga de 15 mL (Ferrarese et al., 2002). A seguir foi efetuada a centrifugação, a 1500xg, por 4 min. O sobrenadante foi desprezado e o material restante submetido a mais duas centrifugações com 7,0 mL da mesma solução tampão. O material foi ressuspensionado em 7,0 mL de Triton X-100 (dissolvido a 1% no tampão fosfato) e centrifugado, por duas vezes consecutivas, eliminando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado com 7,0 mL de solução de 1 mol L⁻¹ NaCl (preparado no tampão) e centrifugado. O sobrenadante foi eliminado, repetindo a operação por mais uma vez. O precipitado restante foi ressuspensionado com 7,0 mL de água destilada e centrifugado por 4 min. a 1500xg, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, o precipitado obtido acima foi ressuspensionado com 5,0 mL de acetona e centrifugado por 4 min. a 1500xg, e repetido mais uma vez, sendo o sobrenadante eliminado. O precipitado foi acondicionado em estufa, a 60°C, durante 24 horas, e resfriado em dessecador a vácuo. O precipitado obtido representa a parede celular, isenta de proteínas.

2.5. Determinação de lignina total

Para a quantificação da lignina total foi empregado o método de brometo de acetila (adaptado de Su et al., 2005). Uma porção (20 mg) da parede celular isenta de proteínas obtida após as sucessivas lavagens, foi acondicionada em tubo de centrífuga e 500 µL de solução a 25% de brometo de acetila foram acrescentados. As amostras foram aquecidas a 70°C por 30 min., transferidas para banho de gelo e a reação foi interrompida com adição de 0,9 mL de 2 mol L⁻¹ NaOH. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de 7,5 mol L⁻¹ hidroxilamina-HCl e 2,0 mL de ácido acético P.A. gelado. As amostras foram centrifugadas (1.000xg, 5 min), o sobrenadante diluído e usado para a realização das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com o Epsilon da curva padrão realizada (20,2 mg/ml) e sendo expressa por mg lignina g⁻¹ de parede celular isenta de proteínas.

2.6. Determinação da composição monomérica por oxidação com nitrobenzeno

A oxidação com nitrobenzeno foi utilizada para determinar a composição monomérica da lignina (Dean, 1997). Fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi selada

em uma ampola Pyrex[®] contendo 1,0 mL de 2,0 mol L⁻¹ NaOH mais 100 µL de nitrobenzeno e aquecida a 170°C por 2:30 horas, com agitação ocasional da amostra durante a reação. Após oxidação, aguardou o resfriamento das amostras, as ampolas foram lavadas com 4,0 ml de água e duas vezes com clorofórmio (5,0 ml cada), acidificada para pH 3-4 com 5,0 mol L⁻¹ HCl, e extraída duas vezes com clorofórmio (5,0 ml cada). Os extratos orgânicos foram combinados, secos e ressuspensos em metanol P.A. Todas as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e analisadas por cromatografia líquida de alto desempenho, Shimadzu[®] (HPLC) modelo LC-10ADvp, equipado com detector UV. A fase móvel usada foi 4% ácido acético em metanol/água (20:80, v/v), com fluxo de 1,2 mL min⁻¹ para corrida isocrática de 20 min, coluna Supelco C18 (15cm x 4,6mm, 5 µm). A quantificação de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foi realizada a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg⁻¹ de parede celular isenta de proteínas.

Para identificação de possíveis deuteriações nos monômeros que compõem o polímero de lignina após os tratamentos, foi efetuado análises em um cromatografo líquido de ultra performance (Shimadzu, Nexera X2), coluna Waters Xbridge[™] C18 (4,6 x 50 mm x 3,5 µm), acoplado ao espectrômetro de massa Quadrupolo-Time of Flight (Bruker, Impact II), empregando a ionização por eletrospray (ESI), modo negativo de análise. Para análise de MRM (multiple reaction monitoring) foram monitorados os seguintes íons m/z: 121.0284, 151.0389, 154.0578, 181.0498, 184.0746, 187.0871, com energia de colisão de 25 eV. A corrida cromatográfica foi adaptada de Zheng et al. (2017), solventes da fase móvel água (A) e metanol (B), fluxo 0,25 ml min.⁻¹.

2.7. Quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos esterificados

Para quantificar o ácido ferúlico, *p*-cumárico e sinápico esterificados na parede (De Ascensao e Dubery, 2003 com adaptações) 0,1 g da biomassa seca e triturada foi macerada em um gral de porcelana em 4,0 ml de metanol 50% e, a seguir, foram transferidas para tubos de centrifuga e incubadas em banho-maria (80°C, 90 min.). Ao término do tempo os tubos foram inseridos imediatamente no gelo para parar a extração. Após o resfriamento das amostras, estas foram centrifugadas (12.000xg, 15 min., 4°C).

O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido mais duas vezes com 1,0 ml de metanol 50% e o precipitado ficou na estufa a 60°C até a secagem completa. Ao precipitado foi adicionado 5,0 ml de NaOH 0,5 M e incubado (96°C, 2 h). Após esse tempo, os tubos foram inseridos imediatamente em banho de gelo para parar a reação. Em seguida, as amostras foram acidificadas a pH 2,0 com 700µL de HCl 5M e centrifugadas (12.000xg, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e adicionado 6,0 ml de éter etílico, fração aquosa foi retirada e reservada para segunda extração. Em seguida, foi coletada a fração etérea e reservada em um balão. Depois a fração aquosa voltou para o funil, foi adicionado o éter e repetido a extração, combinando as duas frações etéreas no balão. As amostras foram rotaevaporadas e analisadas em cromatógrafo líquido de alto desempenho Shimadzu® (HPLC) modelo LC-20VP, equipado com detector diodo. Para separação dos ácidos hidroxicinâmicos esterificados a parede de interesse foi realizada uma corrida cromatográfica de gradiente adaptada de Bunzel et al. (2004a), fase móvel TFA 1 mM, metanol e acetonitrila 90%, fluxo 1,0 ml/min., temperatura do forno a 45°C, volume de injeção 20 µl, coluna Supelco C18 (25cm x 4,6mm, 5 µm), o comprimento de onda para o ácido ferúlico e sinápico foi de 322 nm e para o ácido p-cumárico 309 nm. A quantificação dos ácidos hidroxicinâmicos esterificados à parede celular foi expressa por µg de ácido hidroxicinâmico g⁻¹ de biomassa seca.

2.8. Análise estatística

O software *Graph Pad Prism*® (versão 7 Graph Pad Software Inc., EUA) foi empregado para a realização da análise estatística. Os dados foram expressos como a média de quatro experimentos independentes ± erro padrão da média. A diferença entre os parâmetros foi analisada pelo teste de comparação múltipla de Dunnett, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Efeitos dos ácidos sinápico e ferúlico no crescimento radicular

A Tabela 1 apresenta os efeitos dos ácidos sinápico e ferúlico no crescimento radicular de plântulas de soja e milho. O ácido sinápico não afetou os parâmetros biométricos analisados. Por sua vez, o tratamento com ácido ferúlico levou a uma redução na

variação do comprimento radicular, sendo de aproximadamente 34% na soja e 54% no milho. Ambas as plantas apresentaram decréscimo na média da biomassa fresca e seca. Após os tratamentos com ácido ferúlico e sinápico, as radículas apresentaram coloração castanha e avermelhada, respectivamente (não mostrado).

3.2. Efeito dos ácidos sinápico e ferúlico no teor de lignina

A aplicação exógena de ácido ferúlico estimulou a lignificação em ambas as plântulas analisadas (67% na soja e 30% no milho). Por sua vez, a exposição da soja ao ácido sinápico provocou uma maior lignificação na soja (36%), mas não no milho (Fig. 2).

3.3. Efeito dos ácidos sinápico e ferúlico na composição monômerica da lignina

Ao analisarmos a composição monomérica da lignina observamos que o tratamento com ácido sinápico aumentou de forma significativas os conteúdos do monômero S em ambas as plântulas. Por outro lado, o tratamento com ácido ferúlico ocasionou aumentos significativos dos monômeros G e S em soja (Fig. 3 A), aumento do monômero G e aumento na média do S em milho (Fig. 3B).

A oxidação alcalina da lignina com nitrobenzeno (Dean, 1997) produz *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído derivados dos monômeros H, G e S, respectivamente. Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa identificamos de forma precisa a razão massa/carga (m/z) 121, 151 e 181 que correspondem respectivamente aos compostos *p*-hidroxibenzaldeído (Fig. 4A), vanilina (Fig. 4B) e siringaldeído (Fig. 4C). Quando as plantas foram submetidas aos tratamentos com ácido ferúlico contendo 3 deutérios na metoxila do anel aromático, além das m/z citadas acima, observamos a presença de íons com m/z 154 e 184 que correspondem precisamente à m/z da vanilina e siringaldeído triplamente deuterados, respectivamente (Figuras 5 e 7). Por sua vez, a análise de monômeros da lignina em plantas tratadas com ácido sinápico deuterado apresentaram íons com m/z 154 e 187 que correspondem à m/z da vanilina e siringaldeído com três e seis deutérios, respectivamente (Figuras 6 e 8).

3.4. Efeito dos ácidos sinápico e ferúlico no teor de ácidos hidroxicinâmicos esterificados a parede celular

Ácidos hidroxicinâmicos (HCA) podem se esterificar à parede celular de plantas em quantidades que difere de acordo com a espécie, tecido e o estágio de desenvolvimento. Em gramíneas, os ésteres dos ácidos ferúlico (FA) e *p*-cumárico (*p*-CA) são encontrados em altas concentrações. O conteúdo de FA esterificado à parede celular das plântulas de milho tratadas com ácido ferúlico apresentou apenas uma tendência de aumento estatisticamente não significativa de acordo com os parâmetros adotados (Fig. 9 B). Todavia, na soja o tratamento com ácido ferúlico provocou um aumento de aproximadamente 1000% (Fig. 9 A). O tratamento com ácido ferúlico no milho reduziu o conteúdo de *p*-CA esterificado à parede em 37% (Fig. 9 D). Por outro lado, as plântulas de soja tratadas com ácido ferúlico apresentaram um aumento de aproximadamente 300% no conteúdo de *p*-CA (Fig. 9 C).

Em ambas as espécies analisadas, o tratamento com ácido sinápico não interferiu no teor de FA esterificado (Fig. 9 A e B). Por outro lado, reduziu o conteúdo de *p*-CA em 28% no milho (Fig. 9 D), e aumentou aproximadamente 260% no conteúdo de *p*-CA esterificado à parede celular da soja (Fig. 9 C). Nos tratamentos com ácido sinápico, verificamos uma extensiva esterificação do mesmo à parede celular (Fig. 9 E e F).

4. Discussão

O crescimento radicular é um dos principais pontos afetados pela utilização de aleloquímicos, já que apresentam alta atividade metabólica (Weir et al., 2004). Neste trabalho, constatamos que as espécies de plantas tratadas com ácido ferúlico (FA) apresentaram restrição no crescimento radicular acompanhada por incrementos significativos no teor de lignina. Trabalhos realizados em plântulas soja após exposição à FA resultaram em redução do comprimento radicular e nos pesos frescos e secos acompanhado de aumento na lignificação e na atividade de enzimas envolvidas na via dos fenilpropanoides (PAL e POD solúvel e ligada; Herrig et al., 2002; dos Santos et al., 2004). Em plantas de milho, o FA promove resposta similar, diminuindo o crescimento e aumentando o conteúdo de lignina e compostos fenólicos, acompanhado por aumentos nas atividades da POD e ácido indolacético oxidase (Rama Devi e Prasad, 1996). Estes estudos sugerem que a redução no crescimento pode resultar, ao menos parcialmente, no aumento dos teores de lignina e ácido ferúlico. Adicionalmente, o efeito do FA sobre a enzima responsável pela decomposição do ácido indolacético, fitormônio promotor de crescimento, pode ter um fator mais relevante do que a lignificação na redução de

crescimento (Rama Devi e Prasad, 1996). De fato, o tratamento com SA elevou o conteúdo de lignina na soja, sem afetar o crescimento. O FA é um dos ácidos hidroxicinâmicos mais abundantes ligados à parede celular tipo II, estando principalmente ligado a polissacarídeos da parede celular por ligações ésteres e covalentemente ligado a monômeros de lignina por ligação éter, interligando hemiceluloses com a lignina (Buanafina, 2009). O FA pode realizar ligações cruzadas (pontes diferuloil) interligando duas cadeias de polissacarídeos (Harris, 2006; Cosgrove, 2013) (Fig. 10). Essas reticulações são catalisadas por POD ligadas à parede celular e estão envolvidas com a cessação no crescimento celular, defesa contra ação de patógenos, além de servirem como sítios de nucleação de lignina (Faulds e Williamson, 1999; Buanafina, 2009; de Oliveira et al., 2015). Uma vez que o tratamento com FA aumentou o teor de FA esterificado a parede celular e induz aumentos na atividade de POD tanto em soja quanto em milho (dos Santos et al., 2004; Rama Devi e Prasad, 1996) é possível inferir que a redução no crescimento esteja mais fortemente relacionada com o aumento da reticulação dos polímeros da parede do que com o conteúdo de lignina, em si.

Em gramíneas e outras comelinídes, o *p*-CA também pode ser encontrado esterificado aos arabinoxilanos, mas em quantidade bem inferior, se comparado a FA (Santiago et al., 2013). Todavia, o *p*-CA é esterificado à lignina, principalmente ao monolignol siringil, de modo que sua concentração pode ser correlacionada o conteúdo de lignina (Hatfield et al., 2017). Não obstante, no milho, ambos os tratamentos reduziram *p*-CA, mesmo tendo elevado à concentração de lignina S (Fig. 9 D).

Em gramíneas, em geral, apenas pequenas quantidades de SA podem ser encontradas esterificadas à parede, embora algumas plantas, como o arroz, possam apresentar quantidades significativas (Bunzel et al., 2002, 2004b). Em milho e soja, não observamos quantidades significativas de SA, exceto após os tratamentos com ácido sinápico (Fig. 9 E e F). Estes resultados indicam a possível existência de transferases promíscuas capazes de ligar ácidos fenólicos aos polímeros da parede celular em ambas as culturas (milho e soja). Estas enzimas podem estar relacionadas ao metabolismo de xenobióticos, cuja em plantas pode incluir a imobilização dos mesmos nos polímeros do apoplasto (Sandermann, 1992).

Plantas de milho cultivadas com ácido 2-aminoadipato-2-fosfônico (AIP), um inibidor competitivo da PAL, apresentaram uma significativa inibição da via dos

fenilpropanoides, reduzindo significativamente o crescimento (na maior dose utilizada). Não obstante, a adição de FA levou uma reversão dos sintomas (Jones et al., 2013). Em experimentos realizados em soja, Lima e colaboradores (2013) observaram que a aplicação exógena de FA aumentou a lignificação, bem como dos monômeros G e S. Porém quando o inibidor da 4CL (MDCA) foi ministrado juntamente FA, o aumento da lignificação foi revertido. A 4Cl esterifica hidroxicinamatos à CoA (Steenackers et al., 2016). Utilizando o MDCA, Dos Santos et al. (2008) e Ferro et al., (2015) inferiram que o ponto de entrada do FA exógeno na via dos fenilpropanoides é a enzima 4Cl que o converte em feruloil-CoA um intermediário ativado da via que pode ser destinado tanto à síntese dos monômero G e S, quanto utilizado como precursor para sua esterificação aos polissacarídeos da parede celular. Em soja, foram isolados 4 cDNAs 4Cl estruturalmente e funcionalmente distintos, dentre as isoenzimas isoladas uma com capacidade de converter sinapato (4Cl1) (Lindermayr et al., 2002).

A marcação com deutério é uma técnica que não envolve o manuseio de materiais radioativos, portanto não causa lesão ou interferência no crescimento das plantas (Rolando et al., 2004). Utilizando hidroxicinamatos marcados com deutério constatamos que o FA exógeno foi convertido em lignina G na soja e milho e também em lignina S, no milho (Fig. 5 e 7). Já, o tratamento com SA foi convertido exclusivamente no monômero S em ambas as plântulas estudadas (Fig. 8). Yamauchi e Fukushima (2004) rastream o destino do FA e SA também por meio da deuteração em cortes de xilema de robínia (*Robinia pseudoacacia* L.) constatando que o FA foi incorporado nos monômeros G e S e o SA apenas no monômero S. Em calos de álamo a adição de SA e FA deuterados, ou não, aumentaram a lignificação. Não obstante, o FA exógeno foi canalizado para formação dos monômeros G e S, enquanto no tratamento com SA apenas traços do composto foram encontrado na parede (Hamada et al., 2003). Ainda empregando deuteração em cultura de álamo, Rolando et al. (2004) apuraram que siringina (álcool sinapílicos glicosilado na hidroxila do anel aromático) foi direcionada exclusivamente para o monômero S, enquanto que o coniferina foi encontrada nos monômeros G e S. Esses dados indicam que a conversão de FA ao monômeros S é resultante de modificações no anel aromático (hidroxilação/metilação), assim como reações de redução (ácido em álcoois), enquanto o SA passa apenas por reações de redução (Rolando et al., 2004; Yamauchi e Fukushima, 2004).

Em um estudo no qual foi aplicado ácido sinápico heptadeuterado em robínia (*Robinia pseudoacacia*) e oleandro (*Nerium indicum*) foram encontradas unidades siringil contendo 7 deutérios, sugerindo que o SA é convertido em álcool sinápílico via sinapoil-CoA e posteriormente reduzido a sinapaldeído pela CCR. Além disto, unidades de siringil com 4 deutérios também foram identificadas, indicando que o SA pode perder seu grupo metoxila original durante a biossíntese de siringil. Não obstante, não foram detectadas unidades guaiacil com 4 deutérios derivadas do SA (Yamauchi et al., 2002). Aqui, nós constatamos que em soja, o tratamento com SA levou a formação do monômero G (Fig. 6), o que não foi apontado por nenhum trabalho até o momento. Lacases de fungos podem catalisar a desmetilação de determinados compostos fenólicos (Leonowicz et al., 2000), no entanto tal fato não é notório em enzimas das plantas (Yamauchi et al., 2002). Uma possível explicação para este achado pode ser a técnica escolhida para analisar a composição monomérica da lignina. A técnica (Dean, 1997) emprega nitrobenzeno como agente oxidante, meio alcalino e temperatura elevada. É possível que tal reação possa ocasionar perdas de grupos nas moléculas resultantes da reação (metil, hidroxil). A fim de verificar esta possibilidade seria necessário o uso de uma técnica complementar para averiguar tal resultado. De fato, nós dedicamos vários meses para padronizar a técnica de derivatização seguida por clivagem redutiva (DFRC) que emprega condições mais brandas para quebrar a lignina e reconstituir seus monolignóis que podem ser analisados por GC-MS. A técnica foi padronizada, no entanto, não foi possível neste trabalho realizar os ensaios com os isótopos marcados do FA e SA.

5. Conclusão

O ácido ferúlico exógeno apresentou atuação negativa sobre as plântulas analisadas, restringindo o crescimento radicular associado a aumentos de componentes reticuladores da parede celular, como lignina e FA estrutural. Em contrapartida a aplicação de SA não interferiu no crescimento, embora tenha estimulado a lignificação na soja. Por meio da utilização de isótopos pesados destes compostos, vimos que o FA exógeno é incorporado nos monômeros G e S da lignina, enquanto que o SA é quase exclusivamente destinado à formação do monômero S. Em plântulas de soja observamos também a conversão do SA no monômero G, todavia, estudos adicionais devem ser realizados para assegurar que este resultado não seja apenas um artefato da

técnica. Em suma podemos concluir que ácidos ferúlico e sinápico aplicados exogenamente são canalizados para a formação de monolignóis e esterificados à parede celular.

Referências

- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. LIGNIN BIOSYNTHESIS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519–546.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- Buanafina, M.M., 2009. Feruloylation in Grasses: Current and Future Perspectives. *Mol. Plant* 2, 861–872. <https://doi.org/10.1093/MP/SSP067>
- Bubna, G.A., Lima, R.B., Zanardo, D.Y.L., dos Santos, W.D., Ferrarese, M. de L.L., Ferrarese-Filho, O., 2011. Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*). *J. Plant Physiol.* 168, 1627–1633. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.03.005>
- Bunzel, M., Allerdings, E., Sinwell, V., Ralph, J., Steinhart, H., 2002. Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 482–488. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0512-3>
- Bunzel, M., Funk, C., Steinhart, H., 2004a. Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran. *J. Sep. Sci.* 27, 1080–1086. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301703>
- Bunzel, M., Ralph, J., Steinhart, H., 2004b. Phenolic compounds as cross-links of plant derived polysaccharides. *Czech J. Food Sci.* 22, 39–42.
- de Ascensao, A.R.F.D.C., Dubery, I.A., 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* 63, 679–686.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00286-3)
- Dean, J.F.D., 1997. Lignin Analysis, in: *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. p. 199–215.
- de Oliveira, D.M., Finger-Teixeira, A., Rodrigues Mota, T., Salvador, V.H., Moreira-Vilar, F.C., Correa Molinari, H.B., Craig Mitchell, R.A., Marchiosi, R., Ferrarese-Filho, O., Dantas dos Santos, W., 2015. Ferulic acid: A key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnol. J.* 13, 1224–1232.

<https://doi.org/10.1111/pbi.12292>

- Doblinski, P.M.F., Ferrarese, M. de L.L., Huber, D.A., Scapim, C.A., Braccini, A. de L. e, Ferrarese-Filho, O., 2003. Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to p-coumaric and p-hydroxybenzoic acids. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 46, 193–198. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000200009>
- dos Santos, W.D., Ferrarese, M.D.L.L., Finger, A., Teixeira, A.C.N., Ferrarese-Filho, O., 2004. Lignification and related enzymes in Glycine max root growth-inhibition by ferulic acid. *J. Chem. Ecol.* 30, 1203–1212. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000030272.83794.f0>
- dos Santos, W.D., Ferrarese, M.L.L., Nakamura, C. V., Mourão, K.S.M., Mangolin, C.A., Ferrarese-Filho, O., 2008. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J. Chem. Ecol.* 34, 1230–1241. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9522-3>
- Faulds, C.B., Williamson, G., 1999. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J. Sci. Food Agric.* 79, 393–395. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<393::AID-JSFA261>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<393::AID-JSFA261>3.0.CO;2-H)
- Ferro, A.P., Marchiosi, R., Siqueira-soares, R.D.C., Bonini, E.A., 2015. Effects of cinnamic and ferulic acids on growth and lignification of maize roots. *J. Allelochem. Interact.* 2015, 29–38.
- Fukushima, K., 2001. On the Mechanism to Regulate the Ratio of Syringyl to Guaiacyl Moieties in Lignin, in: *Progress in Biotechnology, Progress in Biotechnology.* Elsevier, p. 149–158. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(01\)80067-8](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(01)80067-8)
- Gmerek, J., Politycka, B., 2011. Response of maize, pea and radish roots to allelochemical stress. *Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot.* 53, 32–37. <https://doi.org/10.2478/v10182-011-0005-4>
- Hamada, K., Tsutsumi, Y., Yamauchi, K., Fukushima, K., Nishida, T., 2003. Treatment of poplar callus with ferulic and sinapic acids I: Incorporation and enhancement of lignin biosynthesis. *J. Wood Sci.* 49, 333–338. <https://doi.org/10.1007/s10086-002-0477-7>
- Harris, P.J., 2006. Primary and secondary plant cell walls: A comparative overview. *New Zeal. J. For. Sci.* 36, 36–53.
- Hatfield, R.D., Rancour, D.M., Marita, J.M., 2017. *Grass Cell Walls: A Story of Cross-*

Linking. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02056>

- Herrig, V., Ferrarese, M.D.L.L., Suzuki, L.S., Rodrigues, J.D., Ferrarese-Filho, O., 2002. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. *Biol. Res.* 35, 59–66. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602002000100009>
- Jones, A.M.P., Shukla, M.R., Chattopadhyay, A., Zoń, J., Saxena, P.K., 2013. Investigating the roles of phenylpropanoids in the growth and development of *Zea mays* L. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 49, 765–772. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9566-0>
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., Chirale, L. de, 1985. Thioacidolysis of Lignin: Comparison with Acidolysis. *J. Wood Chem. Technol.* 5, 277–292. <https://doi.org/10.1080/02773818508085193>
- Leonowicz, A., Rogalski, J., Malarczyk, E., Grzywnowicz, K., Ginalska, G., Lobarzewski, J., Ohga, S., Pashenova, N., Lee, S.S., NamSeok, C., 2000. Demethoxylation of milled wood lignin and lignin related compounds by laccase from white-rot fungus, *Cerrena unicolor*. *Mokchae Konghak = J. Korean Wood Sci. Technol.* 28, 29–40.
- Li, L., Cheng, X.F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S. a, Chiang, V.L., 2001. The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* 13, 1567–86. <https://doi.org/10.1105/TPC.010111>
- Li, Z.H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. De, Jiang, D.A., 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* 15, 8933–8952. <https://doi.org/10.3390/molecules15128933>
- Lima, R.B., Salvador, V.H., Dos Santos, W.D., Bubna, G.A., Finger-Teixeira, A., Soares, A.R., Marchiosi, R., Ferrarese, M.D.L.L., Ferrarese-Filho, O., 2013. Enhanced lignin monomer production caused by cinnamic acid and its hydroxylated derivatives inhibits soybean root growth. *PLoS One* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080542>
- Lindermayr, C., Möllers, B., Fliegmann, J., Uhlmann, A., Lottspeich, F., Meimberg, H., Ebel, J., 2002. Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur. J. Biochem.* 269, 1304–1315. <https://doi.org/2775> [pii]
- Lu, F., Ralph, J., 1997. The “DFRC” method: a new method for structural characterization of lignins. *U.S. Dairy Forage Res. Center, Res. Summ.* 62–65.

- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., Boerjan, W., 2004. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem. Rev.* 3, 29–60. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4>
- Rama Devi, S., Prasad, M.N. V., 1996. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: implications in growth. *Biol. Plant.* 38, 387–395. <https://doi.org/10.1007/BF02896668>
- Rolando, C., Daubresse, N., Pollet, B., Jouanin, L., Lapiere, C., 2004. Lignification in poplar plantlets fed with deuterium-labelled lignin precursors. *Comptes Rendus - Biol.* 327, 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.04.006>
- Salvador, V.H., Lima, R.B., dos Santos, W.D., Soares, A.R., Böhm, P.A.F., Marchiosi, R., Ferrarese, M. de L.L., Ferrarese-Filho, O., 2013. Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root Growth. *PLoS One* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069105>
- Sandermann, H., 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* 17, 82–84. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90507-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90507-6)
- Santiago, R., Barros-Rios, J., Malvar, R.A., 2013. Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6960–80. <https://doi.org/10.3390/ijms14046960>
- Šežiene, V., Baležentienė, L., Maruška, A., 2017. Identification and allelochemical activity of phenolic compounds in extracts from the dominant plant species established in clear-cuts of Scots pine stands. *IForest* 10, 309–314. <https://doi.org/10.3832/ifor1791-009>
- Shuab, R., Lone, R., Koul, K.K., 2016. Cinnamate and cinnamate derivatives in plants. *Acta Physiol. Plant.* 38, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2076-z>
- Soltys, D., Krasuska, U., Bogatek, R., Gniazdowski, A., 2013. Allelochemicals as Bioherbicides — Present and Perspectives, in: *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56185>
- Steenackers, W.J., Cesarino, I., Klíma, P., Quareshy, M., Vanholme, R., Corneillie, S., Kumpf, R.P., Van de Wouwer, D., Ljung, K., Goeminne, G., Novak, O., Zažimalová, E., Napier, R.M., Boerjan, W.A., Vanholme, B., 2016. The allelochemical MDCA inhibits lignification and affects auxin homeostasis. *Plant Physiol.* 172, pp.01972.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01972>

- Su, G., An, Z., Zhang, W., Liu, Y., 2005. Light promotes the synthesis of lignin through the production of H₂O₂ mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls. *J. Plant Physiol.* 162, 1297–1303. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2005.04.033>
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol.* 153, 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Velasco, P., Lema, M., Francisco, M., Soengas, P., Elena Cartea, M., 2013. In vivo and in vitro effects of secondary metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecules* 18, 11131–11143. <https://doi.org/10.3390/molecules180911131>
- Weir, T.L., Park, S.W., Vivanco, J.M., 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.007>
- Yamauchi, K., Fukushima, K., 2004. The regulation from guaiacyl to syringyl lignin in the differentiating xylem of *Robinia pseudoacacia*. *C. R. Biol.* 327, 791–797. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.07.012>
- Yamauchi, K., Yasuda, S., Fukushima, K., 2002. Evidence for the biosynthetic pathway from sinapic acid to syringyl lignin using labeled sinapic acid with stable isotope at both methoxy groups in *Robinia pseudoacacia* and *Nerium indicum*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3222–3227. <https://doi.org/10.1021/jf011565x>
- Zanardo, D.I.L., Lima, R.B., Ferrarese, M. de L.L., Bubna, G.A., Ferrarese-Filho, O., 2009. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environ. Exp. Bot.* 66, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.014>
- Zhao, Q., 2016. Lignification: Flexibility, Biosynthesis and Regulation. *Trends Plant Sci.* 21, 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.006>
- Zheng, M., Gu, S., Chen, J., Luo, Y., Li, W., Ni, J., Li, Y., Wang, Z., 2017. Development and validation of a sensitive UPLC–MS/MS instrumentation and alkaline nitrobenzene oxidation method for the determination of lignin monomers in wheat straw. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1055–1056, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.034>

Tabela

Tabela 1- Parâmetros biométricos de soja e milho tratados durante 24 horas com 1.0 mM de ácidos ferúlico e sinápico.

Condição	Comprimento (cm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Soja			
Controle	2.580 ± 0.229	2.466 ± 0.193	0.168 ± 0.011
Sinápico	2.729 ± 0.193 ^{ns}	2.403 ± 0.190 ^{ns}	0.173 ± 0.011 ^{ns}
Ferúlico	1.692 ± 0.259*	2.030 ± 0.065 ^{ns}	0.150 ± 0.002 ^{ns}
Milho			
Controle	2.691 ± 0.309	1.470 ± 0.112	0.110 ± 0.007
Sinápico	3.174 ± 0.249 ^{ns}	1.424 ± 0.073 ^{ns}	0.107 ± 0.004 ^{ns}
Ferúlico	1.222 ± 0.310*	1.297 ± 0.037 ^{ns}	0.104 ± 0.004 ^{ns}

Valores médios (n=4 ± SEM) significativamente diferentes do controle são marcados com asterisco (*), ns= não significativo (p≤0.05, teste de Dunnett).

Legenda das Figuras

Fig. 1 - Precursores marcados com isótopos estáveis. (A) ácido ferúlico-[3- OCD_3], (B) ácido sinápico-[3,5- OCD_3] (Adaptado de Yamauchi e Fukushima, 2004).

Fig. 2 – Teor de lignina em raízes de soja (A) e milho (B) tratadas com 1.0 mM de ácido sinápico (SA) e ácido ferúlico (FA). Valores médios ($n=4 \pm \text{SEM}$) significativamente diferentes do controle são marcados com asterisco (*), ns= não significativo ($p \leq 0.05$, teste de Dunnett).

Fig. 3 – Composição monomérica da lignina em raízes de soja (A) e milho (B) tratadas com 1.0 mM de ácido ferúlico (FA) e sinápico (SA). Valores médios ($n=4 \pm \text{SEM}$) significativamente diferentes do controle são marcados com asterisco (*), ns= não significativo ($p \leq 0.05$, teste de Dunnett). H= *p*-hidroxifenil, G= guaiacil, S=siringil.

Fig. 4 - Espectro de fragmentação ESI(-)-MS/MS dos íons m/z 121.0282, 151.0389, 181.0495 da amostra contendo padrões de *p*-hidroxibenzaldeído (A), vanilina (B) e siringaldeído (C), respectivamente. Energia de colisão: 25 eV.

Fig. 5 - Espectro de fragmentação ESI(-)-MS/MS dos íons m/z 154.0137 e 154.0610 das amostras de soja (A) e milho (B), respectivamente, tratadas com ácido ferúlico deuterado. Energia de colisão: 25 eV.

Fig. 6 - Espectro de fragmentação ESI(-)-MS/MS dos íons m/z 154.0564 da amostra de soja tratada com ácido sinápico deuterado. Energia de colisão: 25 eV.

Fig. 7 - Espectro de fragmentação ESI(-)-MS/MS do íon m/z 184.0683 da amostra de milho tratada com ácido ferúlico deuterado. Energia de colisão: 25 eV.

Fig. 8 - Espectro de fragmentação ESI(-)-MS/MS do íon m/z 187.0871 das amostras de milho (A) e soja (B), respectivamente, tratadas com ácido sinápico deuterado. Energia de colisão: 25 eV.

Fig. 9 – Conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos em raízes de soja e milho tratadas com 1.0 mM de ácido ferúlico e sinápico. Ácido ferúlico esterificado em soja (A) e milho (B), ácido *p*-cumárico esterificado em soja (C) e milho (D), ácido sinápico esterificado em soja (E) e milho (F). Valores médios ($n=4 \pm \text{SEM}$) significativamente diferentes do controle são marcados com asterisco (*), ns= não significativo ($p \leq 0.05$, teste de Dunnett), nd= não detectado.

Fig. 10 – Modo de ação dos ácidos ferúlico e sinápico na lignificação em raízes de soja e milho. FA: ácido ferúlico; SA: ácido sinápico; *p*-CA: ácido *p*-cumárico; DFA: ponte diferulica; LIG: lignina; PAL: fenilalanina amônia liase; TAL: tirosina amônia liase;

C4H: cinamato 4-hidroxilase; 4Cl: 4-hidroxicinamoil-CoA ligase; CCR: hidroxicinamoil-CoA redutase; CAD: hidroxicinamil álcool desidrogenase; HCT: *p*-hidroxicinamoil-CoA transferase; CCoAOMT: cafeoil CoA *O*-metiltransferase ; C3H: cinamato 3-hidroxilase; COMT: cafeato *O*-metiltransferase; F5H: ferulato 5-hidroxilase; POD: peroxidase.

Figuras

Figura 1

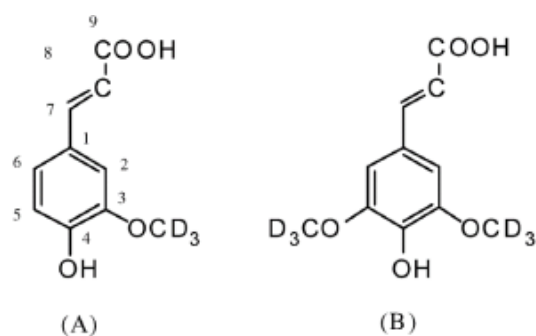


Figura 2

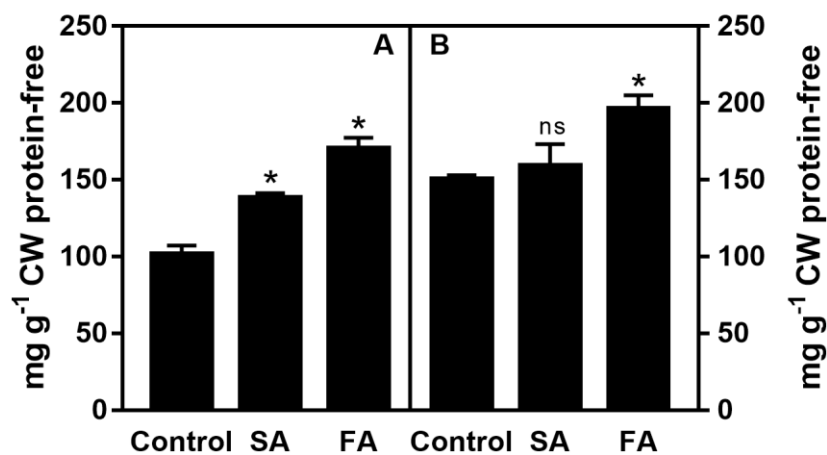


Figura 3

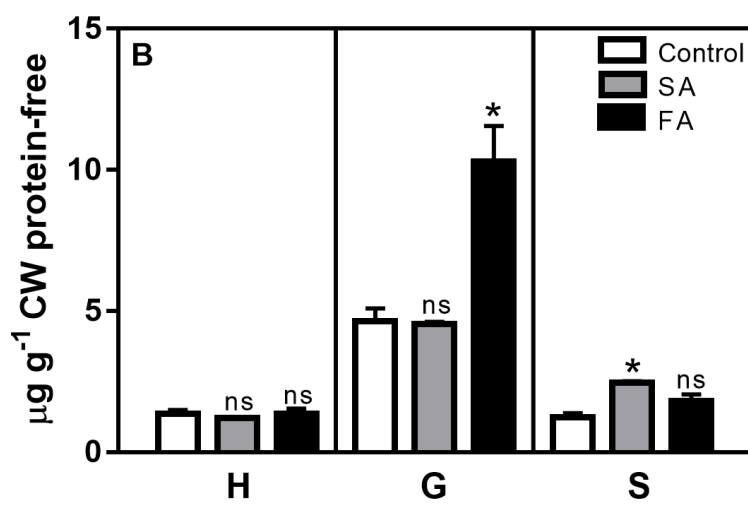
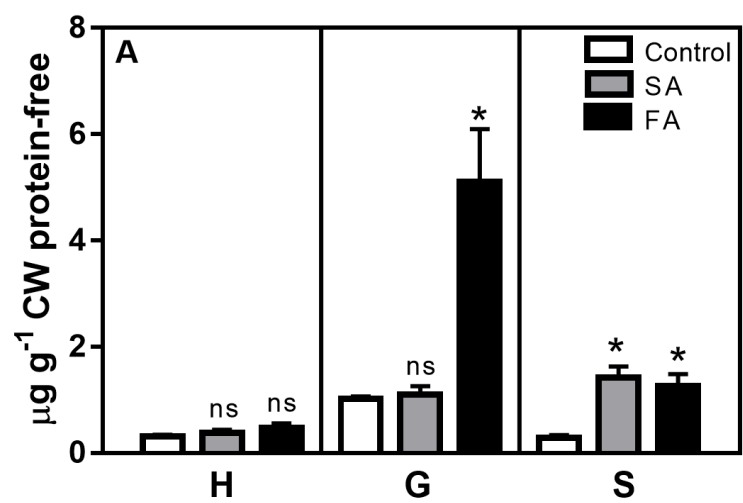


Figura 4

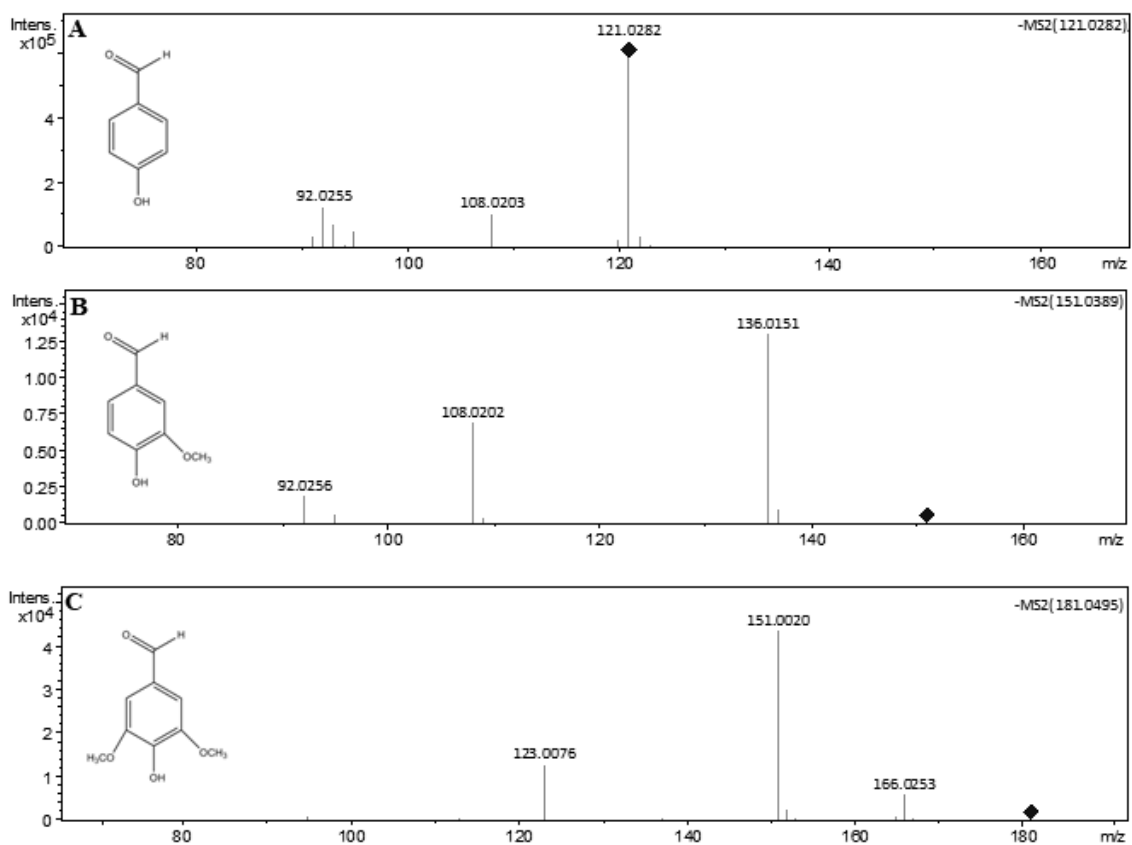


Figura 5

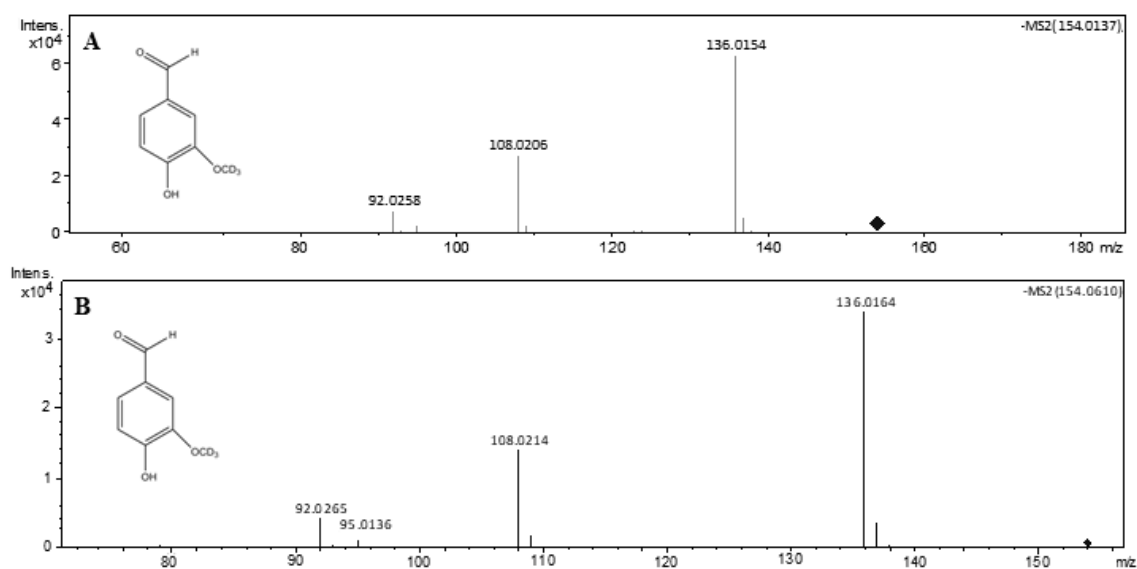


Figura 6

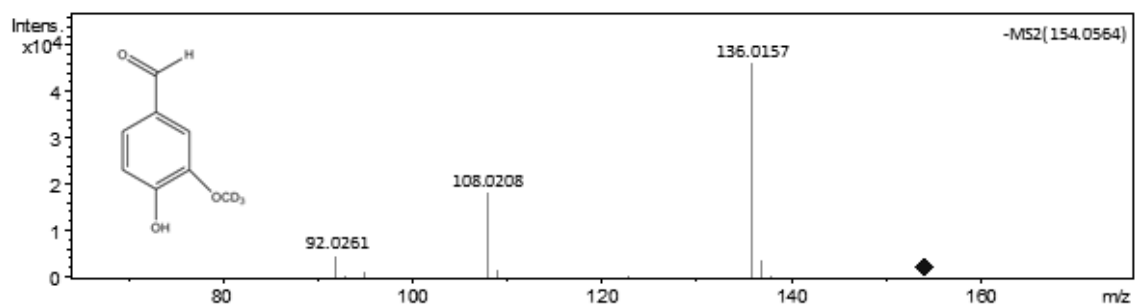


Figura 7

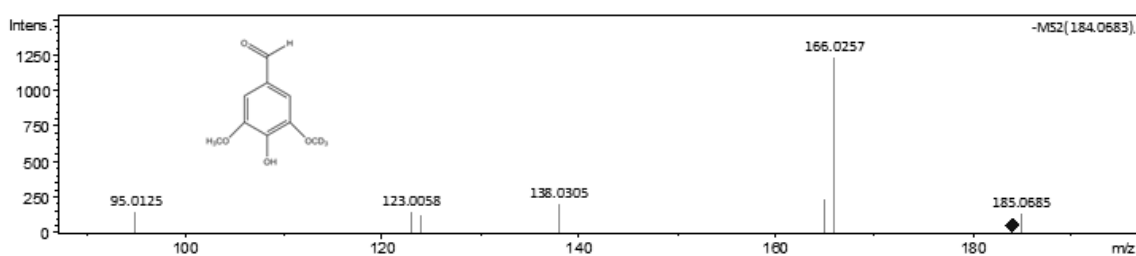


Figura 8

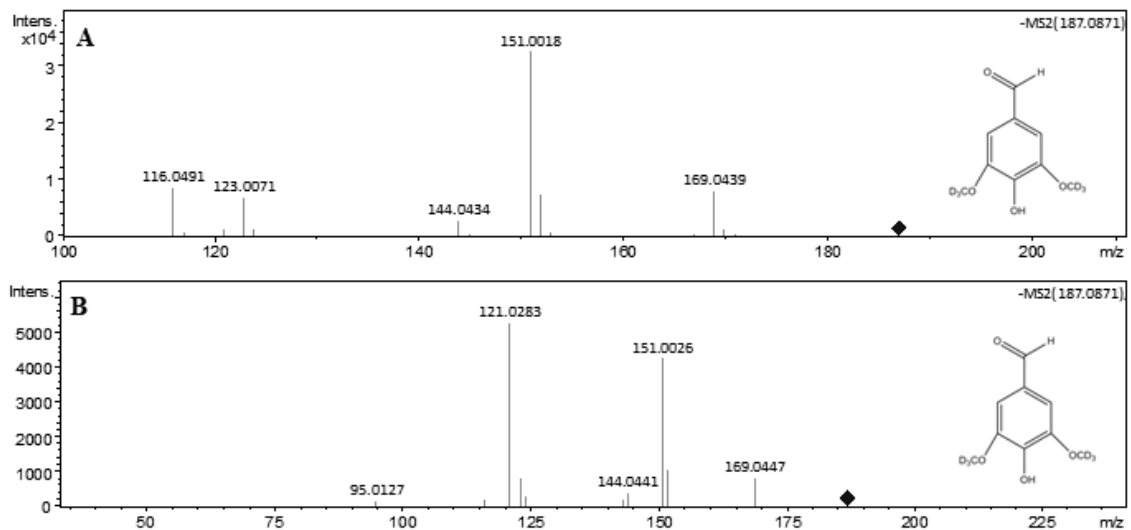


Figura 9

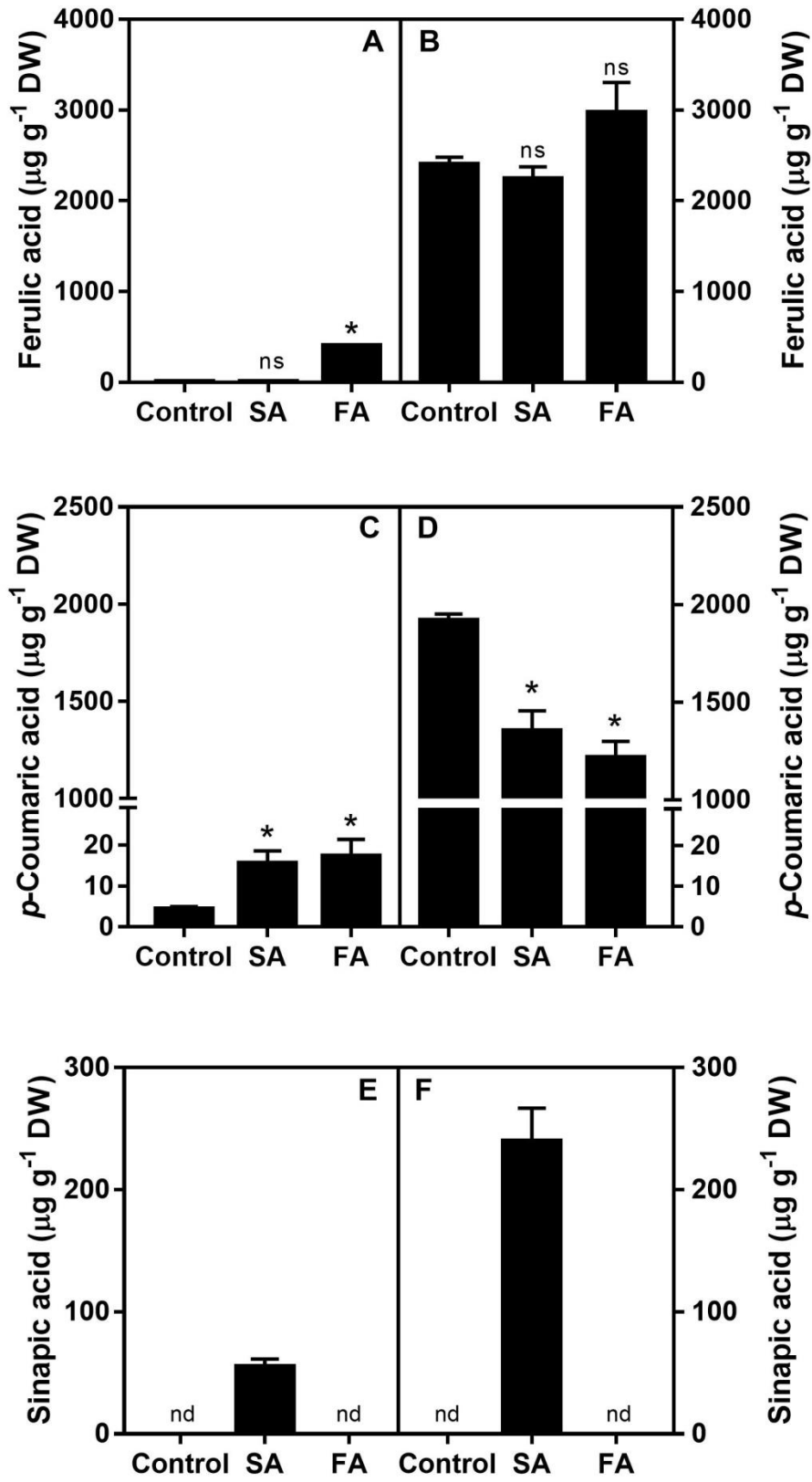


Figura 10

