



You are free: to copy; distribute and transmit the work; to adapt the work.
You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor

USO DE FOSFATASE ÁCIDA COMO BIOMARCADOR DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*)¹

Paulo Afonso Granjeiro²; Carmen Ferreira Veríssima³; Hiroshi Aoyama³

RESUMO

Uma das principais oleaginosas de relevante importância econômica e social é a mamoneira (*Ricinus communis* L.); com inúmeras aplicações na indústria e agropecuária. Amplamente distribuída no Brasil; o seu cultivo pode ser uma alternativa de sustentabilidade no nordeste brasileiro. Conhecer os mecanismos bioquímicos e fisiológicos da germinação são importantes para o melhor aproveitamento da planta. O objetivo desse trabalho foi usar fosfatase ácida como biomarcador durante a germinação. No extrato bruto ocorreu a dosagem da atividade fosfatásica para pNPP; Tyr-Pi e PPi; determinação de proteína e fósforo. O pico de atividade fosfatásica para pNPP foi no sétimo dia; para PPi e Tyr-Pi no nono dia e para PEP apareceu no quinto dia. A concentração de proteína aumenta de acordo com os dias de germinação; com pico de atividade no oitavo dia; sendo coincidente com os picos das atividades fosfatásicas para os substratos utilizados. O conteúdo de fósforo inorgânico diminuiu drasticamente com o tempo de germinação e após o terceiro dia ocorreu uma queda acentuada de sua concentração. Conclui-se que a fosfatase ácida é importante para a germinação das sementes e seu papel está relacionado com a mobilização de fosfato inorgânico; um dos principais nutrientes para o desenvolvimento das sementes.

Palavras-chave: *Ricinus communis*; mamona; fosfatase ácida; germinação; biomarcador.

USE OF ACID PHOSPHATASE AS BIOMARKER DURING THE CASTOR BEAN SEEDS GERMINATION (*RICINUS COMMUNIS*)

ABSTRACT

One of the main oil crop of prominent social and economic importance is to mamoneira (*Ricinus communis* L.); with countless application in the industry and agricultural. Broadly it distributed in Brazil; his cultivation can be an alternative of sustainability in the Brazilian northeast. It know the physiological and biochemical mechanisms of the germination they are important for the best utilization of the plant. The objective of this work was use acid phosphatase as biomarker during the germination. In the rough extract occurred the dosage of the activity for pNPP; Tyr-Pi and PPi; determination of protein and inorganic phosphatse. The peak of activity for pNPP was in the seventh day; for PPi and Tyr-Pi in the ninth and for PEP in the fifth. The concentration of protein increased according to the days of germination; with peak of activity in the eighth day; being coincidental with the peaks of the activities for the substrates. The content of inorganic phosphate diminished with the time of germination and after the third day occurred a fall accentuated of its concentration. We concluded that acid phosphatase is important for the germination of the seeds and his paper is related with the mobilization of inorganic phosphate; the main nutrients for the development.

Keywords: *Ricinus communis*; castor bean; acid phosphatase; germination; biomarker.

Trabalho recebido em 30/10/2008 e aceito para publicação em 30/11/2008.

¹ Parte do trabalho de tese de doutorado do primeiro autor defendido junto a UNICAMP para obtenção do título de doutor em Bioquímica;

² Professor de Bioquímica do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL). Av. Hélio Vergueiro Leite s/n. CxP 05 Espírito Santo do Pinhal - SP – Brasil CEP 13990-000. E-mail: pagranjeiro@uol.com.br;

³ Professor do departamento de Bioquímica Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); Cidade Universitária Zeferino Vaz. Rua Monteiro Lobato; 255 - Campinas - SP - Brasil - CEP 13083-862. E-mail: carmenv@unicamp.br; aoyama@unicamp.br.

1. INTRODUÇÃO

As fosfatases ácidas são enzimas que catalisam a hidrólise de monoésteres fosfatos e usualmente exibem pH ótimo abaixo de 6,0. São amplamente distribuídas na natureza; ocorrendo em microorganismos; animais e plantas. Foram detectadas em plantas superiores (BOROUGHES; 1954); folhas de trigo (ROBERTS; 1956); milho (SLACK et al; 1969); tabaco (SHAW; 1966); tubérculos de batata doce (UEHARA et al; 1974); bulbos (GUO & PESACRETA; 1997; SHIMANO; et al; 2001); nódulo de raízes de soja (PENHEITER et al; 1997); raízes (ZHANG & McMANUS; 2000) no látex da *Hevea brasiliensis* (JACOB & SONTAG; 1974); em gérmen de trigo (KAWARASAKI et al; 1996); em sementes de amendoim (BASHA; 1984); de girassol (PARK & VAN ETEN; 1986); de algodão (BHARGAVA & SACHAR; 1987); de soja (FERREIRA et al; 1998); de mamona (GRANJEIRO et al; 1999); em coléptilos da cevada (PASQUALINI et al; 1992) e em cultura de endosperma de milho (MIERNYK; 1992).

A grande importância fisiológica da FAc se deve a sua participação no processo de germinação e maturação. Neste período; provavelmente por ação de hormônios como o ácido giberélico; e em condições

de ausência de fosfato (FERNANDEZ & ASCENCIO; 1994; BOSSE & KOCK; 1998) sua atividade está sempre aumentada e algumas vezes; surgem outras isoformas ativas (GABARD & JONES; 1986; BISWAS & CUNDIFF; 1991). Estas enzimas estão intimamente relacionadas com o metabolismo do fósforo nas plantas (DUFF et al; 1994; TARAFDAR & MARSCHNER; 1994). Relata-se ainda que a excreção da FAc esteja associada aos níveis de fosfato inorgânico; sendo possivelmente regulada pelo nível deste íon no meio de cultura (GOLDSTEIN et al; 1988; MIERNYK; 1992). DEWALD et al. (1992) demonstraram ainda a existência de duas glicoproteínas de estocagem na soja com atividade fosfatásica e que podem liberar fosfato inorgânico (Pi) de vários substratos como β -naftilfosfato; carboxifenil-fosfato; açúcares fosfatados; gliceraldeído-3-fosfato; di-hidroxiacetona fosfato; fosfoenolpiruvato; ATP; ADP; pirofosfato inorgânico e polifosfatos de cadeia curta. Essas glicoproteínas seriam importantes no período de desenvolvimento e em resposta a estímulos externos como deficiência de água e ferimentos.

Paralelamente; outro aspecto de grande importância é o controle de processos metabólicos nas plantas superiores através de modificações pós-tradução via fosforilação e desfosforilação

(TREWAVAS; 1976; LIN & KEY; 1980; BUDDE & CHOLLET; 1988; CHUNG & POLYA; 1992; ARIÑO et al; 1993; GUO & ROUX; 1995); da mesma forma como o que ocorre em animais (KREBS & BEAVO; 1979; COHEN; 1989; JIA Z.; 1997). MacKINTOSH & COHEN (1989) relataram que as técnicas para identificação e quantificação de proteínas fosfatases em células animais eram aplicáveis para as plantas superiores. Apesar destes fatos; poucos relatos existem sobre a atividade SER/Thr-proteína fosfatase em plantas (YANG et al; 1987; POLYA & HARITOU; 1988; CHENG & TAO; 1989; MacKINTOSH et al; 1991; YUPSANIS et al; 1993; JIA; 1997).

Em 1996; SMITH & WALKER publicaram uma revisão sobre proteína fosfatase em plantas; mostrando que modificações pós-tradução de proteínas por fosforilação são um mecanismo universal para regulação de diversas funções biológicas; bem como discutiram avanços recentes para o entendimento da estrutura; regulação e função de proteínas fosfatases em plantas.

Em plantas; algumas fosfatases ácidas têm demonstrado atividade proteína fosfatase; GELLATLY et al (1994) purificaram uma FAc de tubérculos de batata com características de uma proteína tirosina fosfatase. As FAc purificadas de

bulbo de cebola (GUO & PESACRETA; 1997) e nódulo de raízes de soja (PENHEITER et al; 1997) reconheceram também como substrato tirosina-fosfato; além de outros compostos fosforilados.

As sementes contêm um embrião dormente e está estrutural e fisiologicamente equipada para seu papel como unidades de dispersão; contendo reservas de alimentos para sustentar o crescimento da planta até seu estabelecimento como auto-suficiente. Ao final do desenvolvimento da semente; o conteúdo de água pode cair de 90% para 5% (BEWLEY & BLACK; 1986). Para o embrião reassumir seu crescimento a semente deve germinar; um processo dependente de fatores externos e internos (dormência) e fatores ambientais incluindo água; temperatura e oxigênio. O sucesso do novo indivíduo é largamente determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas da semente (BEWLEY & BLACK; 1986). Os cotilédones de leguminosas contêm principalmente materiais de reserva que suplementam o embrião durante a germinação (BISWAS et al; 1996).

Inúmeros são os eventos que ocorrem durante a germinação; os quais começam com a absorção de água pela semente quiescente seca e completam quando uma parte do embrião; usualmente

a radícula; estende para penetrar as estruturas que a circundam. Estes eventos; na germinação; incluem; por exemplo; hidratação de proteínas; mudanças estruturais subcelulares; respiração; síntese de macromoléculas e alongação celular. O visível indício de que a germinação está completa é a protusão da radícula ao redor das estruturas do embrião; o resultado é algumas vezes conhecido como germinação visível. Eventos subseqüentes; incluindo a mobilização dos maiores estoques de reservas; estão associados com o crescimento da plântula (BEWLEY & BLACK; 1986; BEWLEY; 1997).

As estruturas e enzimas necessárias para a retomada inicial da atividade metabólica estão presentes na semente. A atividade de enzimas hidrolíticas bem como sua função metabólica nos cotilédones das sementes aumenta com a germinação para liberar o material de reserva para o crescimento do embrião (BISWAS et al; 1996). Estas atividades enzimáticas nos cotilédones são aumentadas por um anexo do embrião; sugerindo que há alguma comunicação entre os cotilédones e o embrião para regular a hidrólise do material de estoque de acordo com seu requerimento.

Durante a germinação; as fosfatases ácidas parecem ter uma grande importância; pois neste período sua

atividade está sempre aumentada e algumas vezes; surge outra isoforma ativa. BISWAS & CUNDIFF (1991) purificaram quatro fosfatases ácidas (PI; APII; APIII E APIV) das sementes de *Vigna sinensis* com 96 horas de germinação. As frações API e APII são proteínas constitutivas; enquanto APIII e APIV são expressas após 4 a 15 horas de germinação. BHARGAVA & SACHAR (1987) observaram um aumento de aproximadamente 16 vezes na atividade da fosfatase ácida durante os estágios de germinação de embriões de algodão. Neste trabalho; eles mostraram que a FAc durante germinação era ativada pela síntese de novo da enzima. ULLAH & GIBSON (1988) purificaram uma FAc a partir de cotilédones das sementes de soja em germinação; através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografias de troca iônica; afinidade e cromatofocalização. Com estas técnicas foi possível obter uma enzima com ampla especificidade pelos substratos; principalmente por pNPP.

O aparecimento de novas isoformas durante a germinação ainda não é entendido; há a hipótese que hormônios como ácido giberélico (GA3); ácido abscísico (ABA); auxina (IAA); ácido jasmônico (JÁ) e metil jasmônico (MJ); importantes na germinação; estejam envolvidos neste processo. Dua (1985) et al. e colaboradores observaram que

sementes de mamona tratadas com GA3 em diferentes períodos de embebição; tiveram a atividade fosfatásica aumentada; durante a germinação. Gabard & Jones (1986) mostraram que havia um aumento de cerca de três vezes da FAc da camada aleurônica de cevada; quando as mesmas eram embebidas e incubadas por 18 horas em tampão contendo 50µM de GA3. Em outro trabalho; PFEIFFER (1996) estudou a indução de atividade fosfatásica extracelular em coleóptilos de milho pelo IAA; o qual também observou um aumento (46%) de atividade. SHIH & KAO (1998) estudaram a indução da atividade de FAc em folhas de arroz pelo MJ; e foi observado que MJ e JÁ aumentaram a atividade dessa enzima até cinco vezes. Eles sugeriram que a atividade fosfatásica metil jasmonato induzida é devido à síntese de novo da fosfatase ácida.

A mamona *Ricinus communis* L. faz parte da família Euphorbiaceae. Apresenta grande potencial de exploração econômica; tendo o nordeste brasileiro um importante produtor. Trata-se de uma planta com grande capacidade de produzir biomassa; sendo as folhas utilizadas como alimento pelo bicho-da-seda; as hastes podem ser utilizadas na fabricação do papel e a partir das sementes é possível obter a torta da mamona e o óleo de mamona. (CAVALCANTI et al; 2005).

Segundo Severino e colaboradores (2008); a mamoneira é capaz de crescer em uma grande variedade de solos; com teores de nutrientes bastante variáveis; mas em solos inférteis; a produtividade é baixa e a tolerância da planta a pouca chuva é frequentemente confundida com tolerância à baixa fertilidade.

Com a crescente demanda de combustíveis de fonte renovável a mamona surge como alternativa potencial para a produção de óleos capazes de serem transformados em combustíveis para a substituição parcial e/ou total aos de origem fóssil. Seus produtos e subprodutos são utilizados até na própria agricultura. A temperatura ideal para o crescimento desta oleaginosa varia de 20° C a 30° C; sendo a ótima 28° C; entretanto; seu cultivo é possível em temperaturas de até 33°C. A altitude é um fator limitante para a produção da mamoneira; sendo recomendado o intervalo entre 300 e 1500m; grandes altitudes comprometem o rendimento industrial das sementes (HEMERLY; 1981); o que facilita a sua produção no nordeste brasileiro. É encontrada espontaneamente em varias regiões; sendo o estado da Bahia o responsável por cerca de 90% da produção nacional. Outros estados do nordeste e os estados de Minas Gerais; São Paulo e Paraná; completam a produção nacional.

Apesar dos poucos estudos relacionados à germinação de mamona; Júnior e colaboradores demonstraram; em 2008; a influência do stress hídrico na mamoneira; que apresentou produtividade diminuída sob déficit hídrico. É considerada resistente a condições de baixa precipitação; apresentando-se como alternativa de geração de renda para o semi-árido. Cavalcanti e colaboradores (1995) verificaram que a salinidade da água não interferiu no processo de germinação e nem no índice de velocidade de emergência; mas o número de folhas; diâmetro do caule; a altura de planta e fitomassa da parte aérea; tiveram decréscimo linear com aumento da salinidade.

A importância deste trabalho é contribuir para a elucidação dos processos de germinação utilizando a fosfatase ácida; uma enzima fundamental para o desenvolvimento da planta; como biomarcador em função do meio nutritivo; com micro e macronutrientes. Além do mais; há a importância econômica que essa cultura representa como uma alternativa viável para o desenvolvimento de regiões como o nordeste; de pouco aproveitamento para o plantio; as suas inúmeras aplicações industriais e a rica fonte de energia renovável proveniente de sua biomassa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

As sementes de mamona IAC 80 (*Ricinus communis* L.) foram gentilmente cedidas pelo departamento de oleogênicas do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC.

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho apresentam grau analítico.

2.2. Metodologia

2.2.1 Germinação

Primeiramente as sementes de mamona foram embebidas em água durante um período de 6 h. Em seguida; foram transferidas para bandejas com vermiculita; levadas a uma câmara de germinação de temperatura controlada (28°C); em escuro.

A cada 24 h de germinação num período total de 10 dias; 10 plântulas foram retiradas da câmara e lavadas em água destilada. Então; foram pesadas e medidos os comprimentos da raiz (ou radícula nos 2 primeiros dias de germinação) e da parte aérea das plântulas; com o auxílio de uma régua. As medidas foram tomadas em centímetro.

2.2.2. Obtenção do extrato

Foram utilizadas 10 plântulas de mamona; embebidas em tampão acetato de sódio 0,1 M; pH 5,0 (1/6) gelado. Em seguida; as plântulas foram trituradas em Waring Blendor (com regulador de voltagem em 55); velocidade máxima; durante 30-60 segundos. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min em centrífuga refrigerada Beckam J2-21. O sobrenadante foi filtrado em gaze; desta forma retirando-se partículas grosseiras e materiais insolúveis; resultando no homogenato. Em seguida; foram dosadas as atividades enzimáticas para os seguintes substratos: pNPP; Tyr-Pi e PPi.

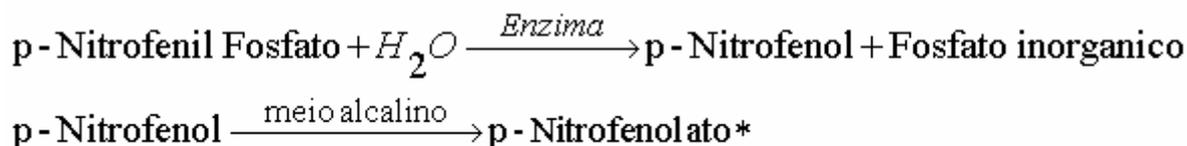
2.2.3 Dosagem da atividade enzimática

Para a determinação da atividade da fosfatase ácida; a amostra foi diluída; imediatamente antes do ensaio; em tampão acetato 100 mM; pH 5,0; de modo a proporcionar uma absorvância em torno de 0,4; no comprimento de onda de acordo

com o método utilizado. A atividade enzimática foi determinada por dois métodos; dependendo do produto formado: p-nitrofenol ou fosfato.

2.2.3.1 Dosagem do p-nitrofenol

A atividade enzimática foi determinada a 37 °C; em presença de pNPP 5 mM; tampão acetato 0,1 M (pH 5,0) e enzima; em um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada após 10 minutos a adição da enzima; com 1 ml de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. A absorvância foi medida a 405 nm como esquematizado abaixo. Uma unidade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 micromol de p-nitrofenol por minuto. O coeficiente de extinção molar do p-nitrofenolato é 1,83x10⁴ M⁻¹cm⁻¹ em meio alcalino. A atividade específica (A.E.) é definida como UE por mg de proteína. As reações estão descritas a seguir:



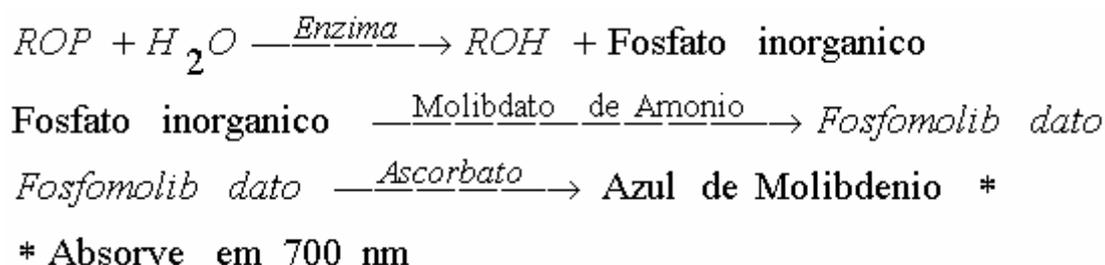
* Absorve em 405 nm

2.2.3.2 Dosagem do fosfato

Este método foi utilizado no caso de substratos diferentes do pNPP; como Tyr-

Pi e PPi; os quais foram utilizados numa concentração final de 5 mM.

O procedimento foi como descrito em (a); exceto que a paralisação da reação ocorreu pela adição de 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 M; pH 4,0). A coloração do complexo fosfomolibdico foi desenvolvida pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 M; pH 4,0); como redutor; de acordo



2.2.4 Determinação de proteína

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry; como descrito por HARTREE (1972); utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 2,0 mL do Reagente C a 0,2 mL da amostra. Após 10 min; adicionou-se 0,2 mL do Reagente de Folin-Ciocalteau (1:1). A leitura da absorbância foi realizada a 660 nm 30 min após a adição do reagente de Folin-Ciocalteau à temperatura ambiente. Reagente A - Carbonato sódio 2% em NaOH 0,1 M; Reagente B - CuSO₄.5.H₂O 0,5% em Citrato de Sódio 1%; Reagente C - 1 mL Reagente B + 50 mL Reagente A e Reagente de Folin-Ciocalteau (diluído 1:1 em H₂O).

com o método descrito por LOWRY & LOPEZ (1945). A absorbância foi medida a 700 nm; 30 minutos após a adição do ácido ascórbico. O coeficiente de extinção molar para o complexo reduzido é 4.000 M⁻¹cm⁻¹. As reações são mostradas a seguir:

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O passo inicial do estudo de germinação de sementes de mamona foi padronizar as condições do experimento. Assim como demonstrado por LAGOA (1983); as sementes de mamona foram previamente embebidas em água Milli Q por um período de 6 horas; a fim de se quebrar o período de dormência das sementes.

A Figura 1 A mostra o crescimento das plântulas em relação ao tempo de germinação de 10 dias em câmara de germinação com temperatura controlada de 28°C; no escuro. Assim pode-se observar que o crescimento foi bastante acentuado e sem desaceleração a partir do terceiro e quarto dias; para raiz e caule; respectivamente.

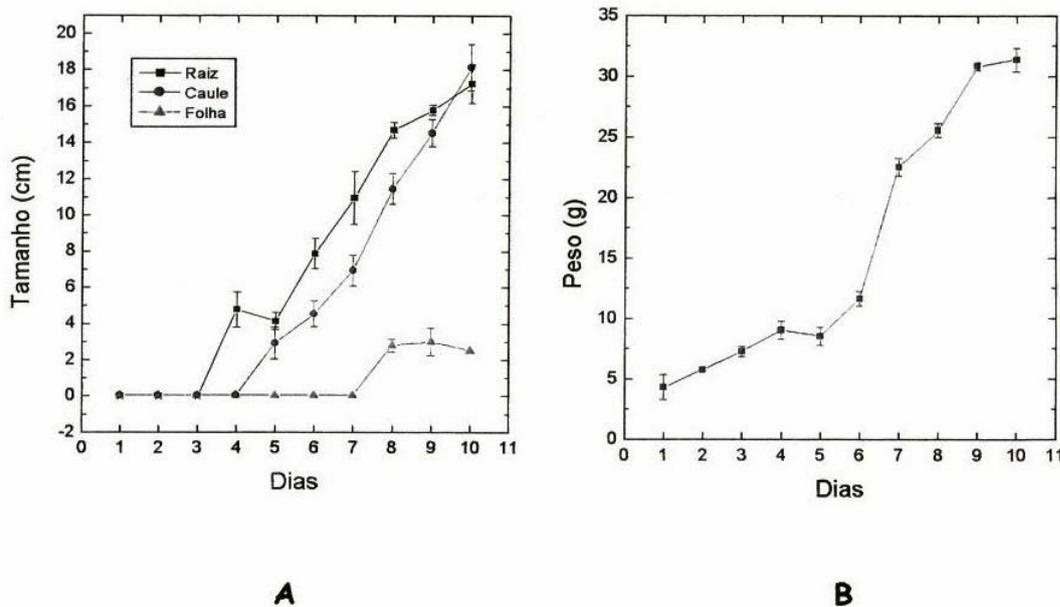


Figura 1. Crescimento e peso das plântulas. As sementes de mamona foram germinadas de acordo com métodos 3.2.1. Para uma quantidade de 10 plântulas foram mensuradas; durante a germinação; os comprimentos do caule; raiz e folha (A) e o peso total fresco (B).

O aumento da raiz proporcional ao aumento do caule era esperado; pois as raízes são importantes para a mobilização de fósforo proveniente do solo (SCHACHATMAN et al; 1998). Por outro lado; o crescimento da folha ocorreu somente a partir do sétimo dia e tornou-se constante a partir do oitavo dia.

O peso da plântula apresentou um crescimento acentuado de acordo com o aumento dos dias de germinação; como demonstrado na Figura 1 B. Um fato curioso é que a partir do sexto dia o peso seco das plântulas duplicou; em uma proporção que não ocorreu com os tamanhos de raiz e caule das plântulas. Isto

pode ser devido a expressão de novas proteínas ou a biossíntese de reservas energéticas para a planta; como o amido.

Após a determinação das condições ideais de germinação das sementes de mamona; procuramos determinar o perfil de atividade fosfatásica utilizando diferentes substratos; tais como pNPP; Tyr-Pi; PPi; PEP e ac. fítico.

De acordo com a Figura 2 podemos observar que o pico de atividade fosfatásica na presença do substrato pNPP foi no sétimo dia; enquanto que para PPi e Tyr-Pi o pico apareceu no nono dia e para PEP apareceu no quinto dia de germinação.

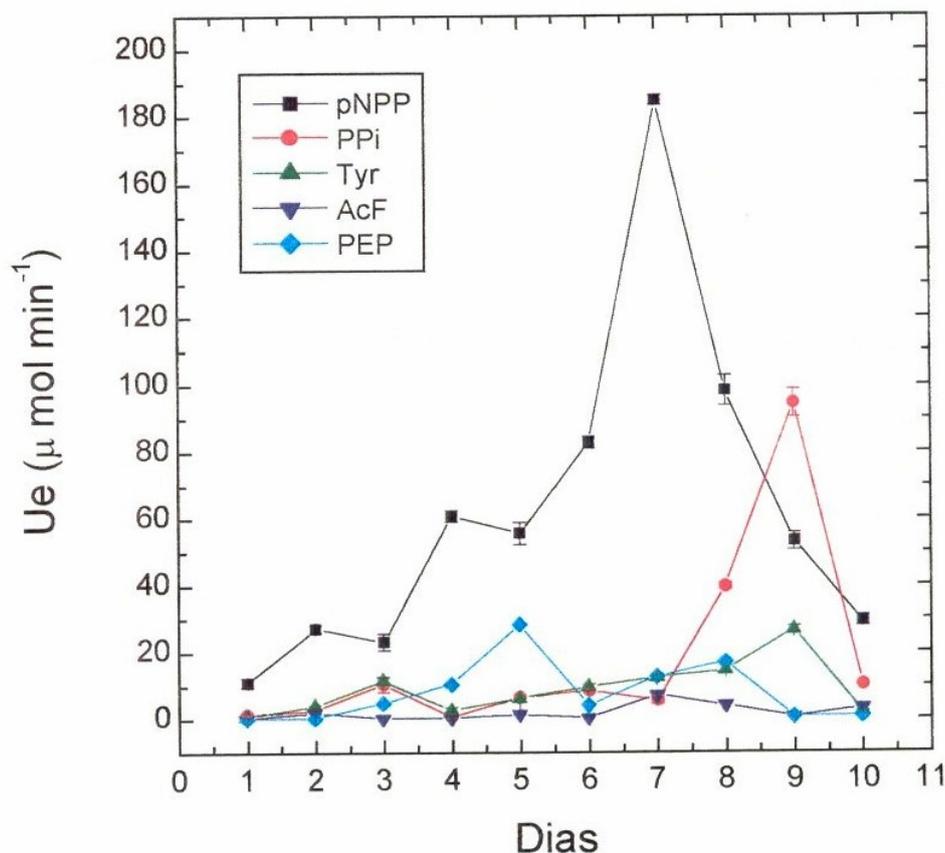


Figura 2. Características da fosfatase ácida de sementes de mamona durante a germinação; utilizando diferentes substratos. As sementes foram germinadas a 28oC; e o extrato bruto abtido; foram determinados as atividades usando como substrato pNPP; PPI; Tyr-Pi; ÁcF e PEP.

Também podemos notar que a atividade fosfatásica para o pNPP foi bastante superior quando comparado com os outros substratos.

Diferentemente; a atividade da fosfatase ácida na presença do ácido fítico; uma importante fonte de fosfato por se tratar de um composto hexafosfato; praticamente não ocorreu nesta variedade de mamona; fato este também observado para a germinação de soja (PRAZERES; 2004). Por outro lado; Ullah & Gibson

(1998) demonstraram que uma outra variedade de soja apresentou pico de atividade fosfatásica para o ácido fítico em torno do décimo dia. Vale ressaltar que também não foi observado atividade fitásica nas 4 isoformas de FAc. de sementes quiescentes de soja (FERREIRA et al; 1998a) e para a fração AP1 purificada das sementes de mamona (GRANJEIRO et al; 1997).

No extrato das plântulas determinou-se o teor de proteínas totais e de fosfato

inorgânico (Figura 3). De acordo com o gráfico de dosagem de proteína pode-se observar que a sua concentração aumenta de acordo com o aumento dos dias de germinação; com o seu pico de atividade em torno do oitavo dia de germinação. Este pico de concentração de proteínas é coincidente com o aparecimento de maiores atividades fosfatásicas para os diferentes substratos utilizados. Portanto; pode-se sugerir que nesta fase ocorre maior expressão de proteínas nas plantas. Bewley (1997) relatou que durante a germinação é comum a síntese de proteínas; uma vez que todos os componentes necessários para a retomada da síntese protéica estarem presentes no embrião maduro das sementes. Além do mais; RNAm pré-formados estão presentes no embrião seco; sendo responsáveis pela mensagem residual associada com os processos de desenvolvimento prévio (COMAI & HARADA; 1990; LANE; 1991) e que podem ser usados transitoriamente durante o período da germinação. Todavia; algumas mudanças em RNAm de embriões e proteínas sintetizadas; essenciais para o suporte do metabolismo celular normal; ocorrem durante a germinação de algumas espécies de monocotiledôneas como o milho (SÁNCHEZ- MARTINEZ & PAGÉ; 1986); dicotiledôneas como a ervilha (LALONDE e BEWLWY; 1986) e

coníferas como os pinheiros (MULLEN et al; 1996).

Já o conteúdo de fósforo inorgânico diminui drasticamente com o tempo de germinação. Esta diminuição está relacionada com a sua utilização como um importante micronutriente para as plantas; sendo também um dos constituintes dos ácidos nucléicos; fosfolipídios e ATP (SCHACHATMAN et al; 1998). Além do mais; o fosfato está envolvido no controle de reações de enzimas chaves na regulação das vias metabólicas (THEODORU & PLAXTON; 1993). É interessante observar que é justamente a partir da queda da quantidade de fosfato que a atividade enzimática da fosfatase ácida tende a aumentar. O aumento da atividade fosfatásica para o PPI a partir do sétimo dia de germinação poderia ser uma forma de suprir; suficientemente e com menos custo energético; as necessidades de fosfato para o crescimento e desenvolvimento da mamona; e assim não sendo necessário a biossíntese de uma fitase.

A partir do terceiro dia do pico de fosfato; ocorre uma queda acentuada de sua concentração; isso porque justamente nesta fase ocorre maior utilização; por parte da planta; de fósforo para o seu desenvolvimento.

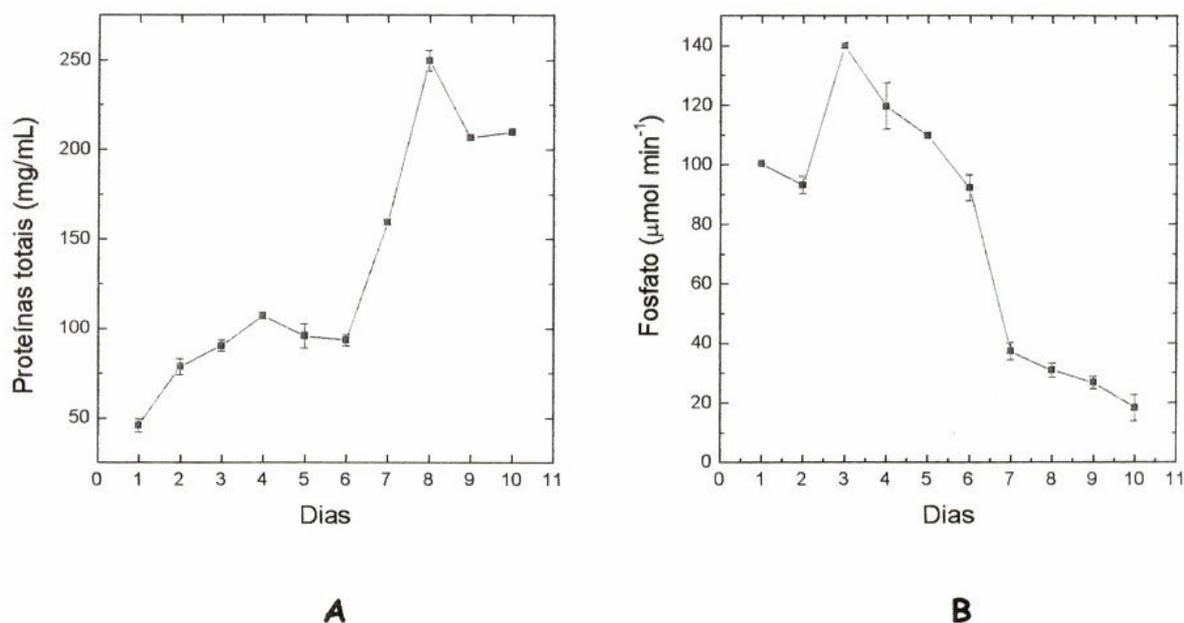


Figura 3. Dosagem de proteína total e fosfato inorgânico (Pi) durante a germinação. Para uma quantidade de 10 plântulas foi obtido o extrato; do qual nos vários dias de germinação foram obtidos os conteúdos de proteínas totais (A) e de fosfato inorgânico (B).

Paralelamente; podemos observar um aumento acentuado de proteínas; e esse aumento pode estar relacionado com aumento da expressão de fosfatase ácidas; uma vez que estas enzimas são os componentes intra e extracelulares responsáveis; em plantas; da deficiência de fósforo (GOLDSTEIN et al; 1988). Além do mais; a regulação destas enzimas é crítica para que a planta sobreviva em solos que tenham quantidade limitante de fósforo (DUFF et al; 1991). Em 1990; Kummerová & Buresova demonstraram um aumento da atividade fosfatásica em dois genótipos de raízes de milho quando as mesmas foram submetidas a uma deficiência de fósforo exógeno. A

deficiência de fósforo com o aumento da atividade fosfatásica em milho também evidenciada por Fries et al. (1992); demonstrando o papel chave desta enzima na mobilização de fósforo em plantas. Sabendo da importância na enzima na germinação da semente; fica evidente que qualquer alteração nas condições de germinação pode afeta-la e consequentemente afetar a sua germinação. As alterações podem estar relacionadas com a presença de herbicidas; inseticidas e fatores ambientais. Desta forma; pode-se utilizar a enzima como um biomarcador e alterações no seu comportamento estarão associados com mudanças na germinação e

que pode ocasionar perda ou diminuição da produtividade da planta.

REFERÊNCIAS

- ARIÑO J.; PÉREZ-CALLEJÓN; E.; CUNIREIRA; N.; CAMPOS; M.; POSAS; F.; FERRER; A. Protein phosphatases in higher plants: multidisciplinary of type 2^a phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol. Biol.**; v. 21; p. 475-485; 1993.
- BASHA; S. M. Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed; **Can. J. Bot.**; v. 62; p. 385-391; 1984.
- BEWLEY; J. D.; BLACK; M. **Seeds physiology of development and germination**. 1986
- BEWLEY; J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**; v.9; p.1055-1066; 1997
- BHARGAVA; R.; SACHAR; R. C. Introduction of acid phosphatase in cotton seedling enzyme purification; subunit structure and kinetic properties. **Phytochemistry**; v.26; p.1293-1297; 1987.
- BISWAS; T. K.; CUNDIFF; C. Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*. **Phytochemistry**; v.30; p.2119-2125; 1991.
- BISWAS; T. K.; PROMO; M.; BISWAS; B. Purification of acid phosphatase I from germinating seeds of *Vigna sinensis*. **Phytochemistry**; v.41; p.1457-1458; 1996.
- BOROUGHES; H. Studies on the acid phosphatases of Green leaves; **Aech. Biochem. Biophys.**; v. 49; p.30-42; 1954.
- BOSSE; D.; KOCK; M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. **Plant; Cell and Environment**; v.21; p.325-332; 1998.
- BUDDE; R. J. A.; CHOLLET; R. Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. **Physiol. Plant.**; v.72; p.435-439; 1988.
- CAVALCANTI; M. L. F.; FERNANDES; P. D.; GHEYI; H. R.; JÚNIOR; G. B.; SOARES; F. A. L.; SIQUEIRA; E. C. Tolerância da mamoneira BRS 149 à salinidade: germinação e características de crescimento. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**; v.9; p.57-61; 2005.
- CHENG; H. F.; TAO; M. Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings. **Biochim. Biophys. Acta**; v. 998; p.271-276; 1989.
- CHUNG; R. P-T.; POLYA; G. M. Copurification and characterization of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities; **Plant Sci.**; v.84; p.153-162; 1992.
- COMAI; L.; HARADA; J. J. Transcriptional activities in dry seed nuclei indicates the timing of the transition from embryogeny to germination. **Proc. Natl Acad. Sci.** v.87; p.2671-2674; 1990.
- DEWALD D. B.; MASON H. S.; MULLET J. E. The soybean vegetative storage proteins vsp α and vsp β are acid phosphatases active on polyphosphates; **J. Biol. Chem.**; v.267; p.15958-15964; 1992.

- DUA; S.; SAREEN; K. N.; AMMA; M. K. P. Effect of intact embryo and gibberellic acid on the breakdown of water-soluble proteins in germinated castor (*Ricinus communis*). **Seed; Ind. J. Plant Physiol.**, v.28; p.96-98; 1985.
- DUFF; S. M. G.; SARATH; G.; PLAXTON; W. C. Purification; characterization and subcellular localization of acid phosphatase from *Brassica nigra* Suspension cell. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. **Physiol. Plant.**, v.90; p.791-800; 1994.
- FERNANDEZ; D. S.; ASCENZIO; J. Acid phosphatase activity in bean and cowpea plants grown under phosphorus stress. **J. Plant Nutr.**, v.17, p.229-241, 1994.
- FERREIRA; C. V.; GRANJEIRO; J. M.; TAGA; E. M.; AOYAMA; H. Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatase; *Plant Physiol. Biochem.*; v.36; p.487-494; 1998.
- FRIES; L. L. M.; McKNIGHT; T. D.; GRIFFING; L. R. Phosphorus effect on phosphate activity in endomycorrhizal maize. **Physiologia Plantarum**, v.103, p.162-171, 1992.
- GABARD; K. A.; JONES; R. L. Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. **Physiol. Plant.**, v.67; p.198-192, 1986.
- GELLATLY; K.; MOORHEAD; G. B. G.; DUFF; S. M. G.; LEFEBVRE; D. D.; PLAXTON; W. C. Purification of a potato tuber acid phosphatase having characteristics of a protein tyrosine phosphatase. **Plant Physiol.**, v.106, p.223-232, 1994.
- GOLDSTEIN, A. H.; BAERTLEIN, D. A.; MacDANIEL, R. G. Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. **Plant Physiol.**, v.87, p.711-715, 1988.
- GRANJEIRO, P. A.; FERREIRA, C. V.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. Purification and Kinetic properties of castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. **Physiol. Plant.**, v.107, p.151-158, 1999.
- GUO, J.; PESACRETA, T.C. Purification and characterization of an acid phosphatase from the bulb of *Allium cepa* L. var. Sweet Spanish. **Plant physiology and biochemistry**. v.151, n.5, p. 520-527, 1997.
- GUO, Y. L.; ROUX, S. J. Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity. **Plant Physiol.**, v.107, p.167-175, 1995.
- JACOB, J. L.; SAONTAG, N. Purification et étude de la phosphatase acide lutéolique du latex d'*Hevea brasiliensis*. **Biochimie**, v.56, p.1315-1322, 1974.
- HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, p.422-427, 1972.
- HEMERLY, F. X. **Mamona: comportamento e tendências no Brasil**. Brasília, Embrapa-DID, 69p. (EMBRAPA-DTC. Documentos, 2). 1981
- JIA, Z. Protein phosphatases: structures and implications. **Biochem. Cell Biol.**, v.75, p.17-26, 1997.

- JUNIOR, G. B.; GUERRA, H. O. C.; CAVALCANTI, M. L. F.; LACERDA, R. D. Consumo de água e eficiência do uso para duas cultivares de mamona submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.4, p.350-355. 2008
- KAWARASAKI, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Purification and some properties of wheat germ acid phosphatases. **Plant. Cci.**, v.119, p.67-77, 1996.
- KREBS, E. G.; BEAVO, J. A. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. **Ann. Ver. Biochem.**, v.48, p.923-959, 1979.
- LALONDE, L.; BEWLWY, J. D. Desiccation during germination and its effects on the messenger RNA population. **FASEB J.**, v.5, p.2893-2901, 1986.
- LIN, P. P. C.; KEY, J. L. Phosphoprotein phosphatase of soybean hypocotyls. Purification, properties and substrate specificities. **Plant Physiol.**, v.66, p.360-367, 1980.
- LOWRY O. H.; LOPEZ J. A. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. **J. Biol. Chem.**, v.162, p.421-424, 1946.
- MACKINTOSH, C.; COHEN, P. Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. **Biochem. J.**, v.262, p.335-339, 1989
- MACKINTOSH, C.; COGGINS, J.; COHEN, P. Plant protein phosphatases: Subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of protein phosphatase 2^a as the major quinate dehydrogenase phosphatase. **Biochem. J.**, v.273, p.733-738, 1991.
- MIERNYK, J. A. Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures. **Phytochemistry**, v.31, p.2613-2616, 1992.
- MULLEN, R. T.; KING, J. E.; GIFFORD, D. J. Changes in RNAm populations during loblolly pine (*Pinus taeda*) seed stratification, germination and postgerminative growth. **Physiol. Plant.**, v.97, p.545-553, 1996.
- PARK, H. S. C.; VAN ETTEN, R. L. Purification and characterization of homoneous sunflower seed acid phosphatase. **Phytochemistry**, v.25, p.351-357. 1986
- PASQUALINI, S.; PANARA, F.; BRACARDI, P.; ANTONIELLI, M. High molecular weight acid phosphatase from barley coleoptiles. **Phytochemistry**, v.31, p.3703-3706. 1992
- PENHEITER, A. R.; DUFF, S. M. G.; SARATH, G. Soybean root nodule acid phosphatase. **Plant Physiol.**, v.114, p.597-604. 1997
- PFEIFFER, W. Auxin induces exocytosis of acid phosphatase in coleoptiles from *Zea mays*. **Physiol. Plant.**, v.98, p.773-779. 1996
- POLYA, G. M.; HARITOU, M. Purification and characterization of two wheat-embryo protein phosphatases. **Biochem. J.**, v.251, p.357-363. 1988
- PRAZERES, J. N.; FERREIRA, C. V.; AOYAMA, H. Acid phosphatase activities during the germination of Glycine Max seeds. **Plant Physiology and biochemistry**, v.42, p.15-20. 2004
- ROBERTS, D. W. A. The wheat leaf phosphatases. Iii. Pathways of hydrolysis of some nucleotides at pH 5.5. **J. Biol. Chem.**, v.222, p.259-270. 1956

- SÁNCHEZ-MARTINEZ, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiol**, v.116, p.447-453. 1998
- SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, D.; PUIGDOMÈNECH, P.; PAGÈS, M. Protein Synthesis during Embryogenesis and Early Germination of Maize. **Plant Physiology**, v.82, p.543-549 1986
- SCHACHATMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **PLANT Ohysiol**, v.116, p.447-453. 1998
- SEVERINO, L. S.; FERREIRA, G. B.; MORAES, C. R. A.; GONDIM, T. M. S.; CARDOSO, G. D.; VIRIATO, J. R.; BELTRÃO, N. E. M. Produtividade e crescimento da mamoneira em resposta à adubação orgânica e mineral. **Pesq. agropec. bras.**, v.41, n.5. 2008
- SHAW, J. G. Acid phosphatase from tobacco leaves. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.117, p.1-9. 1996
- SHIH, C. Y.; KAO, C. H. Methyl jasmonate induces acid phosphatase activity in Rice leaves. **J. Plant Phys.**, v.152, p.358-362. 1998
- SHIMANO, T.; YONETANI, N.; USHIHARA, N.; ADACHI, U.; WASAKI, H.; MATSUI, H.; OSAKI, M. Characteristics of phosphoenolpyruvate phosphatase purified from *Allium cepa*. **Plant Sci.**, v.161, p.861-869. 2001
- SLACK, C. R.; HATCH, M. D.; GOODCHILD, D. J. Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. **Biochem. J.**, v.114, p.489-498. 1969
- SMITH, R. D.; WALKER, J. C. Plant protein phosphatases. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.47, p.101-125. 1996
- TARAFDAR, J. C.; MARSCHNER, H. **Soil Biol. Biochem.**, v.26, p.387-395. 1994
- THEODORU, M. E.; PLAXTON, W. C. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. **Plant Physiol.**, v.101, p.339-344. 1993
- TREWAVAS, A. Post-translational modification of proteins by phosphorylation. **Ann. Ver. Plant. Physiol.**, v.27, p.349-374. 1976
- UEHARA, K.; FUJIMOTO, S.; TANIGUCHI, T. Studies on Violet-colored acid phosphatase PF sweet potato: Purification and physical properties. **J. Biochem.**, v.75, p.627-638. 1974
- ULLAH, A. H. J.; GIBSON D. M. Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germination soybean seeds. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.206: p.514-520, 1988
- YANG, C. M.; DANKO, S. J.; MARKWELL, J. P. Thylakoid acid phosphatase and protein phosphatase activities in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant. Sci.**, v.48, p.17-22, 1987
- YUPSANIS, T.; ELEFThERIOU, P.; PANTAZAKI, A.; GERORGATSOS, J. G. Multiplicity of metal-independent protein phosphatases of germinated alfalfa seeds. **J. Plant Physiol.**, v.141, p.257-262. 1993
- ZHANG C, McMANUS M. Identification and characterization of two distinct acid phosphatases in cell walls of white clover. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.259-270. 2000.