

Perspectivas de uso de métodos diagnósticos alternativos: testes bioquímicos

APRESENTAÇÃO

Prof. Dr. JAIRO O. CAZETTA

Departamento de Tecnologia

Unesp – Campus de Jaboticabal

Capítulo 6

Perspectivas de Uso de Métodos Diagnósticos Alternativos: Testes Bioquímicos

Jairo Osvaldo Cazetta

Ivana Machado Fonseca

Renato de Mello Prado

A DIAGNOSTICO DO ESTADO NUTRICIONAL DAS PLANTAS

- **DEFICIÊNCIAS OU EXCESSOS SEVEROS:**
 - Geralmente muito aparentes (Diagnose visual)
 - Graves problemas de produção e qualidade
- **ALTERAÇÕES POUCO PRONUNCIADAS:**
 - Sem sintomas aparentes!
 - Mas podem reduzir significativamente a produção e/ou a qualidade
- **DEVEM SER PREVENIDAS ou DETECTADAS A TEMPO DE REMEDIAR**

- PREVENÇÃO DAS DEFICIÊNCIAS:
 - Análise do solo !? Problemas:
 - Teores detectados correspondem aos disponíveis? (especialmente micronutrientes)
 - Qual a garantia que serão absorvidos pelas plantas?
 - Análise foliar !? Problemas:
 - Indica o teor total.
 - **Não distingue os teores metabolicamente ativos e inativos.**

Efeito de concentrações crescentes de Ca^{2+} ($\text{Ca1} = 1,25$; $\text{Ca2} = 2,50$ e $\text{Ca3} = 5,00$ mmol dm^{-3}) na solução nutritiva sobre as concentrações ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de K, Ca e Mg totais e livres na matéria seca de plantas de tabaco.

(RUIZ et al., 2000).

*

Tratamentos	K total	Mg total	Ca total	K^+ livre	Mg^{2+} Livre	Ca^{2+} livre
Ca 1	772	720	556	265	307	308
Ca 2	970	584	863	453	433	244
Ca 3	444	288	1241	148	130	669

Distintas formas de extração podem ter diferentes significados

MÉTODOS PROPOSTOS PARA EXTRAÇÃO DE NUTRIENTES NA ANÁLISE FOLIAR

Manual da EMBRAPA - 2009

- EXTRAÇÃO VIA SECA (550-600°C, 3-4h)

- Mufla (550-600°C) + solubilização com ácido nítrico
- Mais sujeito a contaminação e perdas

- EXTRAÇÃO VIA ÚMIDA (180-200°C, 3-4h)

- Nítrico-perclórica (considera padrão)
- Sulfúrica + água oxigenada
- Nítrica em Microondas (sistema fechado)

- EXTRAÇÃO HCl 1mol/L (80°C, 15 min)

- "...é aplicável para a determinação **total** de B, Ca, Cd, Co, Cu, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, e Zn"?!

PREOCUPAÇÃO: Várias alternativas propostas ?!

São Comparáveis?

Extração de manganês das folhas, caule e raízes de mudas de caramboleira, cultivadas em hidroponia (HERNANDES, 2009).

Extrator	Mn em Folhas		Mn em Caule		Mn em Raízes	
			mg kg ⁻¹			
Água	43d	6,95%	5d	2,53%	16d	2,35%
DTPA	65c	10,50%	25c	12,63%	45c	6,63%
HCl 1N	139b	22,45%	38b	19,19%	142b	20,92%
Residual	372a	60,10%	130a	65,65%	476a	70,10%

- **QUESTIONAMENTOS:**

- A caramboleira é uma boa amostra para testar métodos?
- Com as hortaliças seria diferente ou semelhante?
- A extração com HCl 1molar sempre garante a extração do teor total, como preconizado?
- Os resultados com pesquisas usando distintos métodos seriam comparáveis em valores absolutos?
- A extração com HCl 1 molar estaria detectando com mais propriedade o teor metabolicamente ativo?
- Quais seriam os métodos que podem detectar os teores ativos?

MÉTODOS ALTERNATIVOS DE DIAGNOSE

- ROACH (1939) – Injeção foliar
 - ALVIN (1940) – Aprimoramento da técnica
 - LAL (1945) – Aprimoramento (vários elementos)
- COSTA & MENDES (1951) – Ferro
- BAR-AKIVA (1961) – Testes Enzimáticos
 - **Pioneiro em linha de pesquisa consistente com testes bioquímicos**

MÉTODOS BIOQUÍMICOS

ASPECTOS GERAIS

- Não determina a concentração do elemento no tecido
- Determina a deficiência ou o nível do nutriente pela:
 - Alteração na atividade de uma enzima
 - Acúmulo ou diminuição de metabólitos específicos
 - Resposta imunológica
 - Perfil protéico
 - Expressão de genes específicos

MÉTODOS ENZIMÁTICOS - Macronutrientes

Nutriente deficiente	Respostas enzimáticas relacionadas
N	<p>Redução da atividade da sintetase da glutamina, Redutase do nitrato, Glutamato desidrogenase, Fosfoenol-piruvato carboxilase e Ribulose-bifosfato carboxilase.</p>
P	<p>Redução da atividade da Fosfatase, Ribonuclease, Glutamato-Oxaloacetato transaminase, Citrato sintetase, Aconitase, enzima málica, Fosfoenol-piruvato carboxilase e Succinato desidrogenase;</p> <p>Aumento da atividade da Arginase e Arginina descarboxilase.</p>
K	<p>Aumento da atividade das enzimas: Cadaverina, invertase ácida e β-amilase.</p> <p>Redução da atividade da N-carbamil putrescina amino hidrolase e da piruvato kinase</p>
Ca	<p>Redução da atividade da Succinato desidrogenase, Redutase do nitrato e Ribulose-bifosfato carboxilase.</p> <p>Aumento da atividade da piruvato kinase.</p>
Mg	<p>Redução da atividade da Invetase ácida;</p> <p>Aumento da atividade da Invertase alcalina.</p>

MÉTODOS ENZIMÁTICOS - Micronutrientes

B Redução da atividade da ATPase e da Fenilalanina amônia liase.

Cu Redução da atividade da Oxidase do ácido ascórbico.

Fe Redução da atividade da Peroxidase, Aldolase e Aconitase;

Aumento da atividade da Peroxidase.

Mn Redução da atividade da Catalase, Fenilalanina amônia liase,
Tirosina amônia liase e Polifenoloxidase.

Mo Redução da atividade da Redutase do nitrato e da Peroxidase.

Ni Atividade da urease.

Zn Redução da atividade da Anidrase carbônica, Redutase do nitrato e
Aldolase.

VARIAÇÃO DO NÍVEL DE METABÓLITOS

Nutriente deficiente	Resposta metabólica da planta
N	Acúmulo de Asparagina, Prolina, Amônio e Açúcares totais; Redução do teor de Clorofila.
P	Acúmulo de Arginina, Prolina, Lisina, Histidina, Citrulina, Ornitina e Aminoácidos livres.
K	Aumento dos teores de Ácido piperídico, Putrescina e Maltose.
Fe	Acúmulo de Ácido cítrico.
Mn	Acúmulo de Xilose.
Zn	Acúmulo de Açúcares não redutores, Arginina, Prolina, Aminoácidos livres; Redução dos níveis de Auxina.
B	Redução do teor de complexos Açúcar-borato.

MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS

- Perfil protéico
 - Def. Cu = acúmulo de proteínas de elevada massa molecular
- Teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
 - Def. Zn = Alteração significativa no teor de fenolase
- Padrão isoenzimático
 - Superóxido dismutase = def. Fe, Mn e Cu
- Identificação de genes relacionados a transportadores de nutrientes específicos
 - (com grande perspectiva de sucesso, por ser bastante específica, mas ainda pouco estudada)

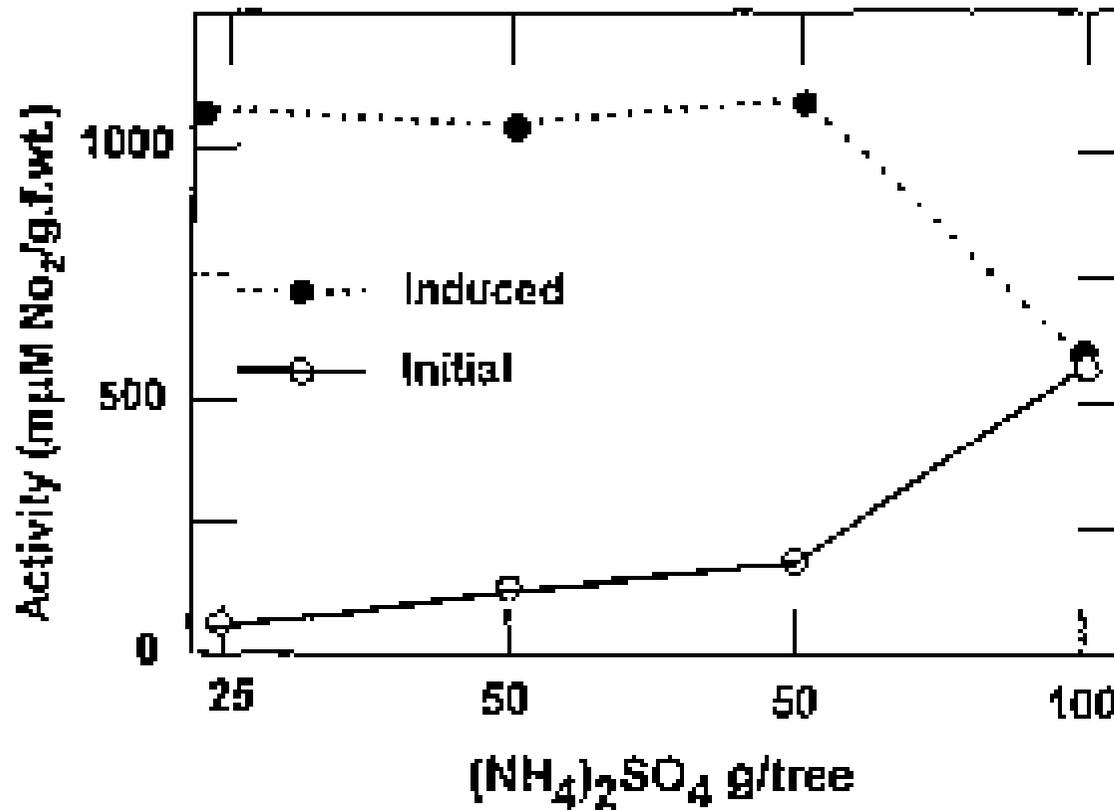
Dificuldades de interpretação dos resultados de métodos bioquímicos:

- Referência de valores.
 - De forma geral, **O VALOR ABSOLUTO** da atividade das enzimas **varia com**:
 - O teor ativo do nutriente em questão
 - ... Mas também com:
 - A condição nutricional relacionada a outros nutrientes
 - O genótipo
 - A idade da planta
 - A idade da folha
 - As variáveis ambientais daquele momento

Qual seria a solução?

- Comparar com a atividade de uma planta considerada (?) bem nutrida!(?)
- ... cultivada nas mesmas condições?!!!
- ... Hummmm!! ?? !!

Conceito de **REATIVAÇÃO ENZIMÁTICA** criado por BAR-AKIVA



DIFERENÇAS ENTRE

ANÁLISE QUÍMICA

E

TESTES BIOQUÍMICOS

- Matéria seca
- Digestão única
- Muitos laboratórios aptos
- Muitos técnicos aptos

- Tecido fresco
- Um extrato p/ cada substância
- Poucos Laboratórios aptos
- Poucos técnicos aptos

Outras dificuldades atuais

- a) Necessidade do esclarecimento das interações e coordenações das vias metabólicas relacionadas a distintos nutrientes;
- b) A maioria dos resultados são obtidos em condições de hidroponia ou completamente distintas das reais situações no campo;
- c) Compreensão das interação das deficiências múltiplas: A maioria das pesquisas trabalha apenas com a omissão do nutriente de interesse para verificar respostas bioquímicas;
- d) Falta ainda conhecer os mecanismos de sinalização e transdução pelos quais a deficiência no sistema radicular consegue coordenar mudanças na fisiologia da parte aérea
- e) A necessidade de **infraestrutura e pessoal especializado***

PERSPECTIVAS

- Biologia molecular
 - Rápido desenvolvimento de Técnicas e Treinamento de pessoal
- Grande avanço no desenvolvimento de Biosensores para nutrientes e metabólitos
- Desenvolvimento de “Kits” práticos para detectar marcadores moleculares relacionados com nutrição

CONCLUSÕES

- 1 - Análise do solo / Análise foliar / Bioquímicos;
- 2 - Grande interesse por métodos bioquímicos;
- 3 - Testes bioquímicos para Fe, Cu, Mn, Zn e Mo estão bastante avançados
- 4 - Há maior dificuldade em se estabelecerem testes bioquímicos específicos para macronutrientes
- 5 - Dificuldade de padronização, infraestrutura e pessoal
- 6 - Expectativa do uso comercial de biosensores e e "kits" práticos



Prof. Dr.
JAIRO OSVALDO CAZETTA
*Departamento
de Tecnologia*

*Unesp
Jaboticabal-SP*

cazetta@fcav.unesp.br

