



FLAVONÓIDES EM DUAS CULTIVARES DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) CULTIVADAS SOB AUMENTO DA ULTRAVIOLETA B, EM CONDIÇÕES DE CAMPO

ROSA T. S. FRIGHETTO¹, CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO², MELISSA BACCAN³, JOÃO ALVES FILHO⁴

¹ Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, rosa@cnpma.embrapa.br

² Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina-PR, hoffmann@cnpso.embrapa.br

³ Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, mebacan@cnpma.embrapa.br

⁴ Analista, Embrapa Soja, Londrina-PR, jafilho@cnpso.embrapa.br

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do aumento da radiação ultravioleta B (UV-B) na composição de substâncias constitutivas e induzidas de cultivares de soja, BRS 262 e IAC 100, sob três tratamentos: UV-B aumentado, UV-B solar e UV-B diminuído. As avaliações foram realizadas nas fases V1 e V2 de desenvolvimento da planta. Em geral, as diferenças foram mais marcantes entre as cultivares do que as diferenças entre as radiações em si. O efeito da radiação aumentada (em torno de $4,46 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$) foi observado nos teores de rutina em ambas as cultivares, e nos teores de daidzina, M-daidzina e daidzeína apenas no BRS 262. Nas condições de aumento de UV-B foram observadas diminuições nos teores de genisteína na fase V2, em ambas as cultivares. A genistina foi detectada apenas na cultivar BRS 262, estando ausente na soja IAC 100. O aumento da radiação UV-B induziu à diminuição das concentrações de genistina e M-genistina. As diferenças nas respostas mostraram alta especificidade de resposta molecular ao aumento de UV B.

PALAVRAS-CHAVE: mudanças climáticas, isoflavonóides, rutina

INTRODUÇÃO

O aumento na incidência da radiação UV-B (280 – 320 nm) muda o perfil da composição química das substâncias intrínsecas, em particular os compostos capazes de absorver essa radiação. São em geral compostos fenólicos, sendo mais de 8000 deles conhecidos na literatura, e são caracterizados em diferentes grupos, tais como flavonóides, taninos, ácidos fenólicos e cumarinas. São mais comuns em dois principais grupos: flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos (HCA), ambos são produzidos pela via dos fenilpropanóides (LUTHRIA et al., 2006).

Os flavonóides são substâncias químicas fenólicas que ocorrem amplamente no reino vegetal, desempenhando funções as mais diversas, dentre as quais a proteção contra radiação ultravioleta, ataque de insetos e doenças, estimulantes de produção de nódulos por rizóbios, dentre outras. Têm sua estrutura baseada em 2-fenil-benzopirano (C6-C3-C6), sendo representados por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central. Podem ocorrer na forma de agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonóides, como as flavolignanas, porém ocorrem mais comumente na forma glicosídica. Eles podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos descritos até 1990. As subclasses dos flavonóides são: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandioli, antocianidina, isoflavonóides (genisteína, daidzeína), bioflavonóides (rutina) e proantocianinas (HARBORNE, 1977).

As diferentes espécies de plantas estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade e quantidade de incidência luminosa. Nessas condições, os flavonóides são acumulados principalmente nos tecidos superficiais, como a epiderme, cutícula e material epicuticular (CALDWELL et al., 2005).

O objetivo do estudo foi avaliar os teores de flavonóides em duas cultivares de soja, BRS 262 e IAC 100, cultivadas sob três tratamentos: UV-B aumentado, UV-B solar e UV-B diminuído.

MATERIAIS E MÉTODO

Delineamento experimental

As plantas de soja, cultivares BRS 262 e IAC 100, foram cultivadas sob três diferentes tratamentos. No tratamento UV-B aumentado (UV-B⁺), a radiação foi acrescida 4h por dia, por 8 unidades de lâmpadas fluorescentes (EL UVB-313, Q-Lab, EUA), envolvidas com uma película de acetato de celulose (Crystal) para filtrar parte do espectro de UV-C (280-290 nm), posicionado a aproximadamente 40 cm acima do topo da copa das plantas. O filme de acetato de celulose foi trocado a cada 5 dias. Para o tratamento UV-B diminuído (UV-B⁻), as parcelas foram cobertas com um filme de poliéster (Du Pont) de 0,152 mm, que absorve a radiação UV-B. As radiações incidentes nas parcelas foram monitoradas e as leituras foram integradas ao longo de 4 horas por dia, a média durante todo o experimento foi de 11,28 kJ m⁻² dia⁻¹. Portanto, no tratamento UV-B aumentado houve um acréscimo médio de 4,46 kJ m⁻² dia⁻¹ comparado ao tratamento UV solar (KADIVAR; STAPLETON, 2003; GUNASEKERA; PAUL; AYRES, 1997).

A irradiância foi medida por um espectroradiômetro (USB2000 + RAD, Ocean Optics, EUA). Ao longo do desenvolvimento da soja, a altura da lâmpada e do filtro foi ajustada para aproximadamente 40 cm de distância com a copa das plantas. Os valores lidos foram normalizados segundo o espectro de ação de resposta da planta, estabelecido por Caldwell (1971).

No final do experimento as plantas foram secas e pesadas, parte aérea e a raiz separadamente, e os nódulos contados e pesados.

Extração e quantificação dos metabólitos

As folhas nas fases V1 e V2 foram coletadas e levadas em sacos plásticos para o laboratório, lavadas em água corrente, enxugadas com papel de filtro e processadas imediatamente em nitrogênio líquido.

Uma alíquota pesando entre 0,250-0,500 g de cada amostra foi retirada e extraída em aproximadamente 1,50 mL de metanol em água (90% MeOH) e sonicada por 20 min. em banho de ultrassom. O extrato foi filtrado e colocado sob um fluxo de N₂ até a secura completa. As amostras processadas foram enviadas para Embrapa Soja para análises cromatográficas. Para as análises cromatográficas, o extrato foi re-solubilizado em 1,50 mL de MeOH (80%) sendo 20 µL injetado no HPLC para identificação e quantificação dos compostos constitutivos e induzidos.

A separação dos componentes e sua quantificação foram realizadas por HPLC, em coluna C18, fase reversa, diâmetro de 4.6 mm, partícula de 5µm, comp. 250 mm; com detector PDA em comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. O eluente utilizado foi o gradiente de solvente (Tabela 1) composto por: Solvente A – Metanol:H₂O:HOAc (18:1:1) (v:v:v); Solvente C – Ácido Acético 2% aquoso.

TABELA 1- Gradiente de solvente para eluição no HPLC

Gradiente		
Tempo	Solvente A (%)	Solvente C (%)
0.001	25	75
40.00	75	25
45.00	25	75
50.00	END	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na condução dos experimentos em campo para avaliação do efeito da radiação UV-B sobre plantas e microbiota associada, é importante observar a distância do posicionamento das lâmpadas e do filtro até a copa das plantas, sendo esse um dos fatores essenciais a ser observado, conforme discutido por Flint et al., (2009).

Efeitos sobre os teores de flavonóides e isoflavonóides – No total de 10 substâncias foram monitoradas nos extratos das duas cultivares, extraídos nos períodos de desenvolvimento V1 e V2.

As maiores diferenças na composição de rutina (flavonóides) foram observadas na composição entre as duas cultivares, independente da intensidade da radiação UV. Plantas cultivadas sob diminuição de UV-B com filtro de poliéster mostraram menores concentrações de rutina (Figura 1), e o aumento da UV-B não alterou a concentração em comparação à luz natural. A presença de rutina na cultivar BRS 262 foi detectada apenas a partir da fase V2, em quantidade muito menor que na cultivar IAC 100. É interessante notar a especificidade molecular entre as cultivares.

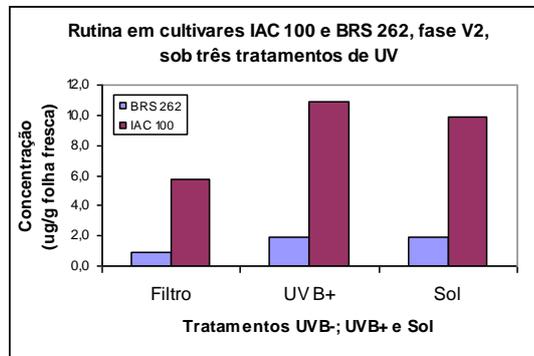


FIGURA 1: Teor de Rutina em folhas de soja cultivares IAC 100 e BRS 262, fase V2 de desenvolvimento, cultivadas sob diferentes espectros de radiação UV

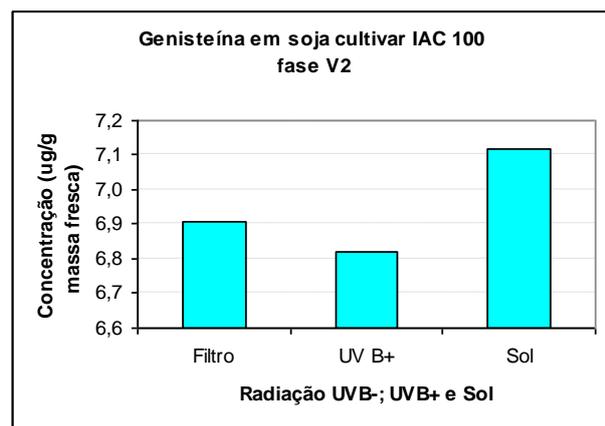
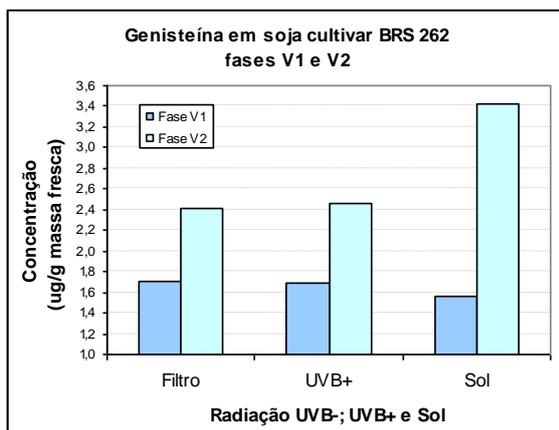


FIGURA 2: Genisteína em folhas de soja expostas à radiação UV-Bsolar, UV-B⁺, e UV-B⁻.

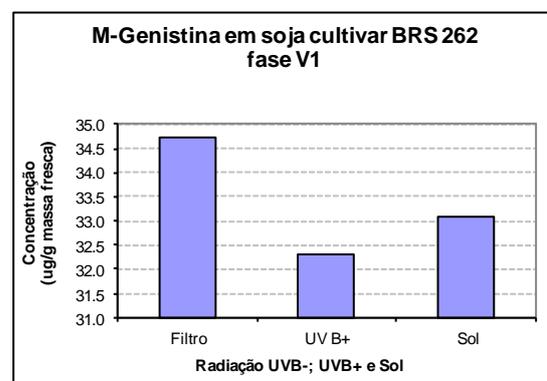
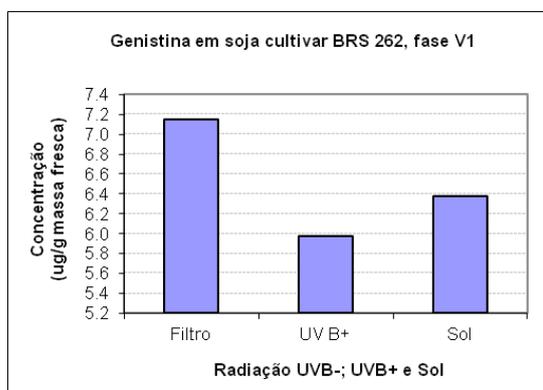


FIGURA 3: Genistina e M-Genistina em folhas de soja cultivar BRS 262 expostas à radiação UV-Bsolar, UV-B⁺, e UV-B⁻ (com filtro)

O efeito sobre o teor de genisteína (aglicona) é marcante quando UV-B foi aumentada (UV-B⁺), observando-se decréscimo na concentração quando comparado ao controle (radiação solar),

principalmente na fase V2, em ambas as cultivares (Figura 2). A concentração de genisteína foi maior na cultivar IAC 100.

Os constituintes genistina e M-genistina (glicosídeos constitutivos da soja) apresentaram o mesmo padrão de resposta anterior, na fase V1 da cultivar BRS 262, onde a concentração de M-genistina é muito maior (Figura 3). Na mesma cultivar, porém na fase V2, essas substâncias estavam ausentes ou não foram detectadas por serem menores que limites de detecção. Apenas pequenas concentrações de genistina foram detectadas na fase V2 da IAC 100. É interessante observar, novamente, a especificidade diferencial no teor desses constituintes, onde a M-genistina está presente apenas na fase V1 da cultivar BRS 262.

Observou-se indução da formação de gliceolinas tanto nas condições de redução de UV-B quanto do aumento de UV-B, principalmente, na fase inicial de desenvolvimento em ambas as cultivares. Esse mesmo padrão de ambigüidade na resposta, isto é, formação de gliceolinas tanto no aumento quanto na redução da UV-B, foi observado em outros estudos (MUSIL et al., 2002).

Segundo RASMUSSEN et al., (1991), o ácido salicílico e oxigênio reativo (ROS) são produzidos por plantas expostas a doenças e outros tipos de estresse biótico e abiótico. No presente estudo, o ácido salicílico foi detectado na cultivar IAC 100, crescidas sob UV-Bsolar e UV-B⁺.

CONCLUSÃO

As diferenças sugerem respostas relevantes quando se compara as cultivares e entre as fases de desenvolvimento. Também, indicam que o aumento da radiação induz, no geral, decréscimo nos teores de substâncias constitutivas e/ou induzidas, com exceção de isoflavonas daidzeína, daidzina e M-daidzina presentes apenas na cultivar BRS 262. Os resultados mostram alta especificidade de resposta molecular ao aumento de UV B. Esses resultados são importantes indicativos para serem observados no estudo das interações com doenças e pragas associadas, em condições de campo.

AGRADECIMENTOS

Dagmar N.S. Oliveira (Embrapa Meio Ambiente) e Giovani Veronezzi (Embrapa Soja) pelo apoio nos procedimentos laboratoriais e à Embrapa (MP1 Climapest) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA

CALDWELL, A.; BRITZ, S.J.; MIRECKI, R.M. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1125-1129, 2005.

CALDWELL, M.M. Solar ultraviolet radiation and growth and development of higher plants. In: Giese, A.C. ed. *Photophysiology*, vol. 6, New York; Academic Press, p. 131-177 (1971).

FLINT, S.D.; RYEL, R.J.; HUDELSON, T.J.; CALDWELL, M.M. Serious complications in experiments in which UV doses are effected by using different lamp heights. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 97, 48-53 (2009).

GUNASEKERA, T.S.; PAUL, N.D.; AYRES, P.G. Responses of phylloplane yeasts to UV-B (290-320 nm) radiation: interspecific differences in sensitivity. *Mycology Research*, Lancaster, v. 101, n. 7, p. 779-785, 1997.

HARBORNE, J.B. Flavonoids and evolution of the angiosperms. *Biochemistry and Systematic Ecology*, v. 5, p. 7-22, 1977.

KADIVAR, H.; STAPLETON, A.E. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. *Microbial Ecology*, Chattanooga, v. 45, p. 353-361, 2003.

LUTHRIA, D.L.; MUKHOPADHYAY, S.; KRIZEK, D.T. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p.771-777, 2006.

MUSIL, C.F.; CHIMPHANGO, S.B.M.; DAKORA, F.D. Effects of elevated ultraviolet-B radiation on native and cultivated plants of Southern Africa. *Annals of Botany* v. 90, p. 127-137 (2002).

RASMUSSEN, J.B.; HAMMERSCHMIDT, R.; ZOOK, M.N. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology* v. 97, p. 1342-1347, 1991.