



EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B SOBRE CULTIVAR DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) BRS 262, EM CONDIÇÕES DE CAMPO

ROSA T. S. FRIGHETTO¹, MÍRIAN LOBO SÁBER², EUNICE REIS BATISTA³, LÚCIO BERTOLDO COSTA⁴, MELISSA BACCAN⁵

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

² Doutoranda, ESALQ/USP, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, miriansaber@yahoo.com.br

³ Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, nicereis@cnpma.embrapa.br

⁴ Doutorando, UNESP/Botucatu, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, lucio@cnpma.embrapa.br

⁵ Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, mebaccan@cnpma.embrapa.br

RESUMO: O estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos da radiação ultravioleta B (UV-B) na composição de substâncias constitutivas em soja cultivar BRS 262 sob três tratamentos: UV-B aumentado, UV-B solar e UV-B excluído. As avaliações foram realizadas nos estádios V1, V4, R1 e R4 de desenvolvimento da planta. Observou-se que as fases de desenvolvimento da soja têm maior influência nas concentrações de seus constituintes, como os fenólicos totais que mostraram menores efeitos da radiação aumentada (em torno de $4,46 \text{ kJ.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$). Nos HCA apenas a concentração do ácido caféico mostrou maior diferença em plantas sob UV-B aumentado. Maiores teores de clorofila (principalmente *a* e *b*) e área/biomassa foliar foram observados em plantas sob UV-B aumentado, e o tamanho de nódulos diminuiu nesse tratamento, sem interferir na biomassa radicular. Em geral, as diferenças de respostas das plantas foram relevantes entre os estádios de desenvolvimento, respondendo com alta especificidade, como observado com ácido caféico. Esses resultados poderão contribuir para o melhor entendimento das reações químicas das plantas ao aumento da radiação UV-B em condições de campo, e indiretamente nas relações com as doenças e pragas associadas a elas.

PALAVRAS-CHAVE: mudanças climáticas, fenólicos totais, ácidos hidroxicinâmicos, clorofila

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 de fenilpropanóide, onde os ácidos foram classificados em dois grupos, com base no esqueleto carbônico de origem, e podem ser derivados de ácido cinâmico e de ácido benzóico (LUTHRIA et al., 2006).

Os ácidos HCA mais comuns em folhas de plantas são os ácidos p-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico), caféico (ácido 3,4-dihidroxicinâmico) e ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico), e em menor concentração o ácido sinápico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico) (BURCHARD, P.W. et al., 2000, apud RUHLAND, C.T. et al., 2005). A quantidade e a composição dos compostos fenólicos presentes em alimentos dependem do genótipo, das condições de armazenamento (ASAMI et al., 2003), do procedimento de extração (HINNEBURG; NEUBERT, 2005; MUKHOPADHYAY et al., 2006), e das condições ambientais (ROBINSON; BRITZ, 2000; CALDWELL et al., 2005). As principais formas de interação molecular na parede celular das plantas são principalmente através de ligação éster com os polissacarídeos e pela ligação éter com as ligninas (CAMPBELL; ELLIS, 1992; SUN et al., 2002). A hidrólise alcalina disponibiliza esses ácidos na sua forma livre, facilitando a extração por solvente orgânico.

No processo de fotossíntese vegetal, é essencial a presença de pigmentos fotossintéticos. Nesse processo ocorre a transferência de energia absorvida pelos pigmentos, desencadeando a partir daí série

de reações química e bioquímica, como a produção de proteínas, formação de carboidratos, e fixação de CO₂, etc. Para tanto, ela depende da quantidade e qualidade da luz incidida.

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da radiação ultravioleta B (UV-B) na composição de substâncias constitutivas da soja cultivar BRS 262 sob três tratamentos: UV-B aumentado, UV-B solar e UV-B excluído.

MATERIAIS E MÉTODO

Delineamento experimental

As plantas de soja cultivar BRS 262 foram crescidas 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), envolvido 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 excluído (UV-B⁻), as parcelas foram cobertas com um filme de poliéster (Du Pont) de 0,152 mm, que absorve toda 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 QUAITE et al (1992).

Extração e quantificação dos metabólitos

As folhas foram coletadas nas fases V1, V4, R1 e R4 de desenvolvimento e levadas em sacos plásticos para o laboratório, lavados em água corrente, enxugadas com papel de filtro e processadas imediatamente em nitrogênio líquido.

1. *Extração das amostras para análise de fenólicos totais (TP)* - Para cada extração, aproximadamente 200±1 mg da amostra moída é colocada em um tubo de centrifuga de 15 mL de capacidade, com 5 mL de uma mistura de solvente MeOH:H₂O (80:20, % v/v). Os tubos são colocados em banho de ultrassom (Model 2510, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT) a temperatura ambiente por 30 min. A mistura é centrifugada e o sobrenadante transferido para um frasco volumétrico de 10 mL e o volume completado com a mistura usada na extração. Uma alíquota apropriada do extrato é filtrada e o ensaio de FC realizado para determinar o conteúdo de TP. Para cada amostra, são realizadas extrações e análises em triplicata.

2. *Determinação de fenólicos totais pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (FC)* - O conteúdo de TP é determinado através do ensaio com ácido gálico como padrão de calibração usando o espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 20. O ensaio é conduzido pipetando-se 100 µL do extrato, anteriormente extraído, para um tubo de 10 mL, seguido da adição de 7,9 mL de água. A mistura é levada ao vortex por 10-20s e então 500 µL do reagente FC é adicionado. A mistura é levada ao vortex por mais 20-30s e, após 1 min, adiciona-se 1,5 mL da solução 20% de carbonato de sódio (200 g/L Na₂CO₃) e antes de 8 min da adição do reagente FC. Este foi registrado como tempo zero; a mistura é então levada ao vortex por mais 20-30s após adição do carbonato de sódio. Após 2 h±3 min a temperatura ambiente, faz-se a leitura da absorbância a 765 nm. A concentração de fenólicos totais deve ser estimada em equivalência de ácido gálico (GAE; mg ácido gálico/g extrato). A curva de calibração é construída usando-se diferentes concentrações da solução de ácido gálico padrão, a cada nova análise. O teor de TP no extrato é calculado através da curva de calibração. Os resultados foram expressos na base de mg equivalente de ácido gálico por grama (mg GAE/g) de massa foliar fresco (SINGLETON et al., 1974).

3. *Obtenção de ácidos livres em amostras de folhas* - As amostras (folhas) foram coletadas no campo, lavadas em água corrente, secas em estufa (72h, a 50°C), maceradas e transferidas para frascos âmbar. Pesou-se 200 mg (0,2 g) de amostra, adicionou-se a mistura de 5 mL da solução NaOH 2M contendo 1% de ácido ascórbico e 10 mM de EDTA e procedeu-se à hidrólise básica por uma hora a

60°C. A solução foi acidificada com 1,5 mL de HCl 7M e deixou-se resfriando até a temperatura ambiente. Após, submeteu-se a vortex por 5-10 s e centrifugou-se por 10 min, a 2700 rpm. O sobrenadante foi submetido à extração com acetato de etila, 2 x 6,5 mL, primeiramente no vortex por 30 s, seguida de 5 min no ultrassom. Quando necessário, devido à formação de emulsão, adicionaram-se gotas de solução saturada de NaCl. As fases orgânicas foram combinadas e evaporadas até a secura sob nitrogênio. O resíduo foi retomado em 2 mL da mistura metanol:água (75:25), levado ao ultrassom por 5 minutos e filtrado através de filtro 0,45 µm acoplado a uma seringa.

4- *Separação e quantificação dos componentes* – As análises foram realizadas por HPLC, Agilent modelo 1100 Series, equipado com detector UV-Vis, coluna C-18 Partisil 5 ODS-2, fase reversa, 4,6 x 250 mm, volume de injeção de 10 µL. Foi utilizado o comprimento de onda de 320 nm no detector, para quantificação dos ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico. A fase móvel foi constituída de ácido fórmico 1% em água ultrapura (A) e metanol (B), segundo Evaristo e Leitão (2001), em fluxo de 0,8 mL.min⁻¹.

5- *Determinação do teor de clorofila em folhas de soja expostas à radiação UV* - Para avaliar o teor de clorofila, foram coletadas 3 folhas por tratamento, acondicionadas em papel alumínio e transportadas em caixa de isopor até o laboratório, onde foram pesadas em balança semi-analítica e imediatamente submetidas ao processo de extração de clorofila. A extração de clorofila foi realizada pela maceração de discos de folhas separados por tratamento, em acetona 80% (v/v); o extrato foi centrifugado (2.500 rpm) e o sobrenadante recolhido e transferido para tubos de vidro onde o volume foi ajustado para 10 mL. Todos os procedimentos foram realizados com tubos de vidro envolvidos em papel alumínio, para evitar a fotodegradação da clorofila. As leituras foram realizadas por espectrofotômetro (*Perkin Elmer* modelo Lambda 20), em triplicata, a 663nm, 645nm e 652nm. Os resultados são expressos em g/kg de massa fresca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos em condições de campo, é importante observar a distância das lâmpadas e do filtro até a copa das plantas em estudo, conforme observado por Flint et al., (2009).

Os teores das substâncias fenólicas variaram conforme as fases de desenvolvimento da soja, apresentando respostas diferenciadas em fenólicos totais na fase R4. A maior diferença observada entre os tratamentos foi na concentração de ácido caféico quando recebeu UV-B aumentada, enquanto que a concentração do ácido p-cumárico aumentou na ausência de UV-B. Esses resultados mostram a especificidade das respostas encontradas nessa cultivar de soja, que podem ser diferentes em outras cultivares.

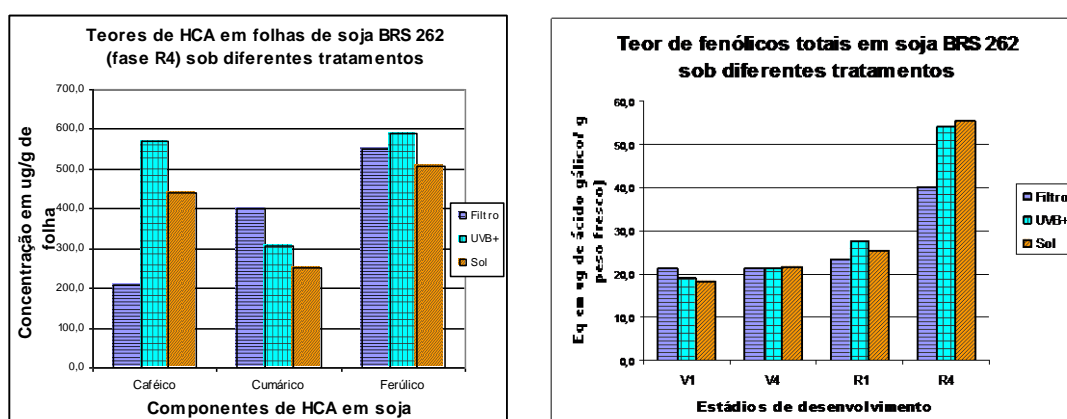


FIGURA 1: Teores de HCA e de fenólicos totais em soja cultivar BRS 262 crescidas sob diferentes espectros de radiação

As plantas submetidas à radiação adicional de UV-B com lâmpadas fluorescentes (UV-B+) apresentaram maiores valores de área foliar, biomassa fresca e biomassa seca. A leitura feita no comprimento de onda 663nm correspondeu ao pico de maior absorção da *clorofila a*, no comprimento de onda 645nm correspondeu ao pico de maior absorção da *clorofila b* e a leitura feita no

comprimento de onda 652nm correspondeu ao conteúdo total de clorofila. Maiores teores de clorofila, principalmente *a* e *b*, foram observados em plantas crescidas sob radiação aumentada (UV-B⁺), seguida de UV-B solar e UV-B excluído (UV-B⁻) (Figura 2).

A exclusão da radiação UV-B por filtro de poliéster afetou no tamanho de nódulos (Figura 2) sendo maior no UV-B excluído enquanto que no tratamento UV-B⁺ a resposta foi contrária. Em termos de número de nódulos, com o aumento da UV-B houve a formação de maior número de nódulos. Verificar o significado desse resultado segundo o enfoque da interação planta-microrganismo será um próximo desafio.

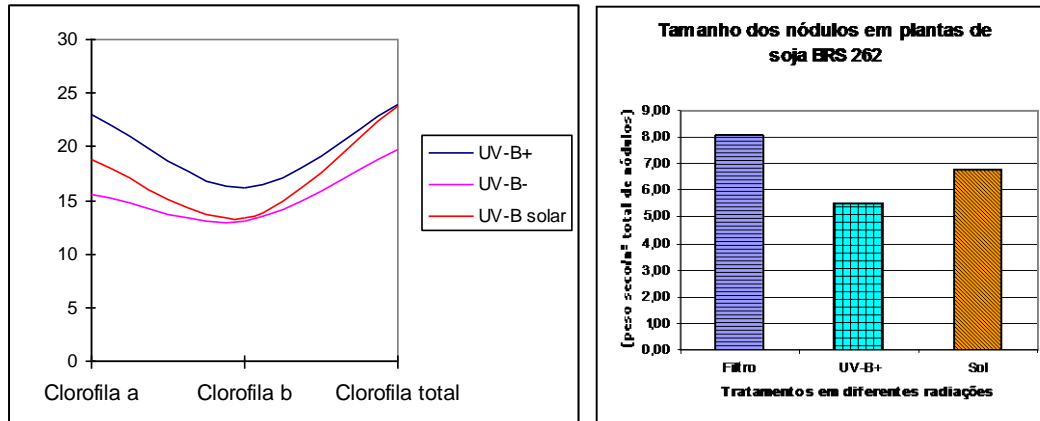


FIGURA 2: Teor de clorofila em folhas e tamanho de nódulos em plantas de soja crescidas sob radiação Solar, UV-B⁺, e UV-B⁻.

CONCLUSÃO

As diferenças nos parâmetros avaliados foram relevantes entre os estádios de desenvolvimento, respondendo com alta especificidade, como observados em clorofilas *a* e *b*, e ácido caféico, mostrando a importância do espectro da radiação UV-B (280 a 320 nm) na eficiência fotossintética dessas substâncias. Uma mudança na intensidade de irradiação e tempo de exposição à UV-B poderá induzir a formação de outros tipos de compostos. Esses resultados contribuem para o melhor entendimento da forma como as plantas respondem ao aumento de UV-B em condições de campo, e indiretamente nas relações com doenças e pragas associadas a elas.

AGRADECIMENTOS

À Dagmar N.S. Oliveira e Lídia C. Sávi pelo apoio na análise química; à Embrapa (MP1 Climapest) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA

ASAMI, D.K.; HONG, Y.J.; BARRET, D.M.; MITCHELL, A.E. Processing-induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 83, p. 56-63, 2003

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.

CAMPBELL, M. M.; ELLIS, B. E. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: cell wall-bound phenolics. *Phytochemistry*, v. 31, 737-742, 1992.

EVARISTO, I.M.; LEITÃO, M. C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana*, v. 9 (2), p.135-141, 2001.

FLINT, S.D.Ç RYEL, R.J.Ç HUDELSON, T.J.Ç 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 sensivity. *Mycology Research*, Lancaster, v. 101, n. 7, v. 779-785, 1997.

HINNEBURG, I.; NEUBERT, R.H. Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53 (1), p. 3-7, 2005.

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.

MUKHOPADHYAY, S.; LUTHRIA, D.L.; ROBBINS, R.J. Optimization of extraction process for phenolic acid from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 86, p. 156-162, 2006

QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfafa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature*, v.358, n.6387, p.576-578. 1992.

ROBINSON, M.J.; BRITZ, S.J. Tolerance of a field grown soybean cultivar to elevated ozone level is concurrent with higher leaflet ascorbic acid level, higher ascorbate-dehydroascorbate redox status, and long term photos. *Photosynthesis Research*, v. 64, p. 77-87, 2000.

RUHLAND, C. T.; XIONG, F.S.; CLARK, W.D.; DAY, T.A. The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochemistry and Photobiology*, v. 81, p.1066-1093, 2005

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology* 299, 152-178, 1974

SUN, R.; SUN, X.F.; WANG, S.Q.; ZHU, W.; WANG, X.Y. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crop Production* v. 15, p. 179-188, 2002.