

Qualidade de Luz e Produção de Pigmentos Fotossintéticos em Plantas *In Vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb

Cristiane Pimentel Victório¹, Ricardo Machado Kuster² e Celso Luiz Salgueiro Lage³

Introdução

As clorofilas e os carotenóides são pigmentos presentes nos vegetais, capazes de absorver a radiação visível, desencadeando as reações fotoquímicas da fotossíntese, processo essencial para a sobrevivência vegetal e por isso denominado metabolismo primário [1].

A qualidade espectral é fator importantíssimo na fisiologia da fotossíntese. O tipo, quantidade e incorporação de carotenóides dentro do aparato fotossintético dependem da qualidade e quantidade de luz [2].

Conforme o pigmento, diferente é a faixa espectral absorvida para desencadear o processo fotossintético. A clorofila *a* tem absorção máxima na faixa do azul e vermelho, onde está o espectro de ação para a fotossíntese [3]. Os pigmentos acessórios, como os carotenos, absorvem na faixa do azul e ultravioleta [4].

A influência de diferentes faixas do espectro luminoso foi avaliada em relação a produção de pigmentos fotossintéticos, em estudos *in vitro* do cultivo de *Phyllanthus tenellus* Roxb.

Material e Métodos

A. Caracterização fitoquímica

O material vegetal monoclonal da espécie *P. tenellus* utilizado para as análises fitoquímicas foram cultivados *in vitro* por 60 dias, sob lâmpadas fluorescentes (Sylvania F20W T12), intensidade luminosa de 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, nas qualidades: branca, verde, vermelha, amarela, azul e branca acrescida de UV-A (ultravioleta A) e condição de escuro.

B. Espectrofotometria

Cerca de 52 mg de plantas de *P. tenellus* cultivadas *in vitro*, sem raiz, foram acrescentadas em tubos contendo 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para cada tratamento de luz, n=7. As amostras em DMSO ficaram por 24h em banho-maria a 60°C, para extração do pigmento e posterior análise de carotenóides, clorofila *a* e *b*. As análises foram feitas utilizando o aparelho Spectronic Genesys II – Milton Roy. A leitura da absorbância dos extratos foi de 480, 649 e 665 nm para carotenóides, clorofila *a* e *b* respectivamente. Para obtenção dos valores de carotenóides, clorofila *a* e *b* foram utilizadas

as equações de Wellburn [4].

C. Cromatografia líquida do extrato em DMSO

Para separação foi utilizada uma coluna Lichrosorb RP-18 (25 cm x 5 mm), gradiente de eluição nos solventes: A – H₂O; B - KH₂PO₄ 0,1M+ H₃PO₄ 0,1M + CH₃CN – 4:4:2 e C - MeOH. 50% de B (10 min), 50% de B até 100% de B (30 min) e 50% de B + 50% de C (40 min), fluxo de 1mL/min, temperatura ambiente. Os espectros UV foram obtidos por detecção em SPD-M10A Shimadzu. A análise foi monitorada a 270 nm.

D. Avaliação estatística

Os dados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas para dados com distribuição normal e desvios padrões significativamente semelhantes, considerando p <0,05. Foi utilizado o programa Graph Pad InStat 3.0 para Windows®.

Resultados e Discussão

A. Avaliação dos teores de clorofila e carotenóides

A presença dos pigmentos fotossintéticos é fundamental para o processo de fotossíntese vegetal. Após absorção da luz pelos pigmentos, ocorre transferência de energia luminosa que desencadeia os eventos químicos da fotossíntese, como fixação do CO₂ e produção de carboidratos [3,5].

De todos os tratamentos de luz avaliados, a luz amarela apresentou maior taxa de clorofila *a*, seguida da luz vermelha, branca e azul (Tab. 1). Os resultados para luz azul e vermelha são condizentes com as referências encontradas na literatura, uma vez que estes espectros são primordialmente absorvidos pela clorofila *a*, responsável pela eficiência fotossintética [6]. Na literatura a luz azul e vermelha são referidas como as principais indutoras do maior acúmulo de clorofila [7]. Sendo que a luz vermelha é mais eficiente do que a luz azul, porque a luz azul é absorvida também por flavonóides e carotenóides, diminuindo a eficiência quântica desta faixa espectral [5].

A luz azul promove a síntese de proteínas que participam do aparato fotossintéticos e o desenvolvimento dos plastídeos do cloroplasto.

1. Aluna de Doutorado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Fisiologia Vegetal, Bloco G – Sala G2-050, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária - Ilha do Fundão, CEP: 21949-900 – Rio de Janeiro – R.J. E-mail: crispv@biof.ufrj.br

2. Professor Adjunto do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), Laboratório de Fitoquímica de Plantas Mediciniais, Bloco H – Sala H0-29, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária - Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21949-900.

3. Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Fisiologia Vegetal, Bloco G - Sala: G2-050, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária - Ilha do Fundão, CEP: 21949-900 – Rio de Janeiro – R.J.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq

Enquanto a luz vermelha está envolvida no desenvolvimento do aparato fotossintético e provavelmente na inibição da exportação de sacarose para fora das folhas [7]. Porém, folhas de *Chrysanthemum* desenvolvidas sob filtro para luz azul não apresentaram diferenças em relação ao controle quanto à aparência e ao conteúdo de clorofila [2]. Ressaltando que o genótipo é fundamental para obtenção das várias respostas relacionadas à qualidade de luz.

Para clorofila *b*, o maior valor de detecção foi observado após tratamento com luz amarela e azul. Provavelmente o aumento combinado da clorofila *a*, *b* e carotenóides, para as plantas mantidas sob luz amarela, esteja estimulando de forma positiva a fotossíntese sob este espectro, visto que elevados teores destes pigmentos contribuem para a eficiência fotossintética, sendo a clorofila *b* e os carotenóides os pigmentos acessórios na obtenção de energia. Embora estes resultados se refiram as plantas *in vitro* que apresentam menores taxa fotossintética.

Os efeitos da luz verde originaram respostas significativamente inferior para ambas as clorofilas e carotenóides (Tab.1). Macedo [8], para plantas cultivadas *in vitro*, também verificou reduzida quantidade de clorofila sob este espectro de luz. Já Bem-Amots & Avron [9] comparando o efeito da luz verde com a luz branca não evidenciaram mudanças na quantidade de carotenóides. Em florestas que contêm plantas de diferentes alturas, as folhas da copa das árvores absorvem preferencialmente a luz vermelha e azul, que rapidamente são atenuadas ao penetrarem na folha. Porém, a luz verde é transmitida e absorvida pelos tecidos mais internos da lâmina foliar [10]. Foi verificado que em folhas de *Spinacia oleraceae* a luz verde dirige a fixação de CO₂ nas regiões mais internas da folha, diferente da luz vermelha e azul que contribui para a fixação nas partes foliares mais superficiais [5]. Embora uma fonte de luz verde monocromática não seja absorvida significativamente pela clorofila *a*, esta também é considerada efetiva na fisiologia da fotossíntese [3]. A luz verde é efetivamente absorvida pelas folhas e dirige de forma eficiente o transporte de elétrons [5]. Uma das razões para a eficiência desta faixa espectral é explicada pela insistência da onda luminosa que ao não ser absorvida continua a ser refletida de cloroplasto a cloroplasto no complexo fotossintético, até que após várias reflexões a absorção se efetua para então atuar no processo de fotossíntese [11].

A presença dos pigmentos não variou de forma significativa nos tratamentos com luz vermelha em relação à luz branca. Para as plantas de *Chrysanthemum* que absorveram na faixa do vermelho-longo, utilizando filtro específico de CuSO₄, houve aumento no conteúdo de clorofila *a*, *b* e carotenóides por peso seco. Sendo o aumento da clorofila associado ao aumento proporcional na concentração de carotenóides [12]. O aumento dos níveis de clorofila *a* e carotenóides também foi observado em algas tratadas com luz vermelha [13]. Para os tratamentos luz branca acrescida de UV-A e condição de escuro, a diminuição da clorofila total foi observada em função do conteúdo de clorofila *b* (Tab. 1).

Em experimentos conduzidos por Marks & Simpson [14] plantas de *Rhododendron* cv. Dopey cultivadas sob luz vermelha tiveram a razão entre a clorofila *a*:*b* evidentemente aumentada, implicando em visível diferença na coloração. Da mesma forma, foi verificado para alguns tratamentos de luz, a variação na coloração dos extratos em DMSO. Para a luz verde, esta variação provavelmente está relacionada ao aumento significativo na relação clorofila *a/b* e na baixa produção de carotenóides. O aumento na relação clorofila *a/b* (Tab. 1), indica uma significativa mudança na estequiometria do fotossistema que pode refletir na eficiência do processo fotossintético.

As radiações UV-A e UV-B (290-400 nm) em conjunto representam 9% da incidência luminosa visível que chega a superfície da Terra, sendo que destes, 95% são de radiação UV-A (320-400) [15]. Já se sabe que a radiação UV-B inibe a fotossíntese das plantas [16], quanto para a UV-A, neste trabalho houve diminuição significativa no teor de clorofila total, podendo indicar que o processo fotossintético não manteve a mesma eficiência. Em estudos com a espécie *Dunaliella bardawil*, elevada e rápida produção de carotenóides foi obtida após irradiação com UV-A, sendo necessário baixas intensidade de UV-A para duplicar o nível de carotenóides [15]. Entretanto, a luz azul que corresponde ao mesmo receptor de UV-A em plantas não foi ativa na produção de carotenóides. Neste trabalho, também não houve respostas similares para luz azul e UV-A em relação ao conteúdo de clorofila *b*, clorofila total e carotenóides, reafirmando a existência de diferentes vias para as respostas a estes espectros (Tab. 1). Mas conforme Jahnke [15], luz branca acrescida de UV-A foi indutora da produção de carotenóides em relação à luz branca isolada, correspondendo aos resultados encontrados neste trabalho, no qual houve aumento na produção de carotenóides quando utilizado luz branca e UV-A em conjunto.

B. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos em DMSO

Os cromatogramas obtidos a partir dos extratos de plantas mantidas sob luz verde e ausência de luz não apresentaram os sinais com tempos de retenção para substâncias fenólicas. Já nos outros tratamentos de luz foi verificada a presença do tanino geraniina, em maior proporção na luz amarela e luz branca acrescida de UV-A. Uma das substâncias fenólicas observadas nos tratamentos luz branca, amarela, vermelha e azul apresenta espectro UV correspondente aos comprimentos 219, 225, 229 e 313, 315, 319 nm.

Os espectros em UV de 219, 281 e 279 nm foram verificados apenas nas luzes vermelha e branca acrescida de UV-A. Este espectro é semelhante à classe dos taninos hidrolisáveis, como o tanino strictina isolado de *Pelargonium reniforme* [17].

Os extratos em DMSO apresentaram coloração amarela à vermelha. Esta variação poderia ser um indicativo de algum composto fenólico produzido em resposta a qualidade de luz. Após avaliação dos cromatogramas e a verificação de sinais para compostos tânicos, pode-se sugerir que os taninos sejam responsáveis pela variação na coloração, uma vez que

não foi confirmada a presença de flavonóides. A variação no teor de clorofila *a*, *b* e carotenóide também pode ser um indicativo na mudança da coloração. Por exemplo, para condição de escuro, os extratos apresentaram coloração vermelha escura, sendo verificado baixa produção de clorofila, como esperado, visto que a protoclorofila se transforma em clorofila pela incidência luminosa [3]. Luz vermelha induziu coloração verde

escuro referente à concentração de clorofila *a* que por sua vez está relacionada a maior eficiência deste espectro na fotossíntese. Talvez, ainda, algumas das faixas espectrais tenham acelerado o processo de senescência que caracterizado pela destruição da clorofila evidencia a presença dos carotenóides [18].

Referências

- [1] SEIFERMAN-HARMS, D. 1987. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiology Plantarum*, 69: 561-568.
- [2] MACMAHON, M. J.; KELLY, J. W.; DECOTEAU, D. R.; YOUNG, R.E. & POLLOCK, R.K. 1991. Growth of *Dendranthema x Grandiflorum* (Ramat.) Kitamura under various spectral filters. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 116: 950-954.
- [3] HALL, D.O. & RAO, K.K. 1980. *Coleção Temas de Biologia: Fotossíntese*. Editora Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo. 89p.
- [4] WELBURN, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307-313.
- [5] SUN, J.; NISHIO, J. N. & VOGELMANN, T. C. 1998. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. *Plant Cell Physiology*, 39(10): 1020-1026.
- [6] SOAVE, R.C.F. & SILVA, O. A. 1993. Aspectos fenológicos e variação dos conteúdos das clorofilas *a* e *b* em *Caryocar brasiliense* CAMB. *Arq. Biologia e Tecnologia*, 36(1): 57-69.
- [7] SAEBØ, A.; KREKLING, T. & APPELGREN, M. 1995. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41: 177-185.
- [8] MACEDO, A.F. 2003. *Estudo dos efeitos dos meios de cultura e diversas condições de iluminação nas características morfológicas, fitoquímicas e farmacológicas de Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze*. Tese de Doutorado, Programa de Biotecnologia Vegetal, UFRJ, Rio de Janeiro.
- [9] BEN-AMOTZ, A. & AVRON, M. 1989. The wavelength dependence of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25: 175-178.
- [10] LARCHER, W. 1995. *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3^o ed., Germany. 506p.
- [11] KLEIN, R.M. 1992. Effects of green light on biological systems. *Biological Review*, 67: 199-284.
- [12] MCMAHON, M.J.; KELLY, J.W. 1995. Anatomy and pigments of *Chrysanthemum* leaves developed under spectrally selective filters. *Scientia Horticulturae*, 64: 203-209.
- [13] AIDAR, E. GIANESELLA-GALVÃO, S.M.F.; SIGAUD, T. C.S.; ASANO, C.S.; LIANG, T.H.; REZENDE, K.R.V.; OISHI, M. K.; ARANHA, F. J.; MILANI, G. M. & SANDES, M. A. L. 1994. Effects of light quality on growth, biochemical composition and photosynthetic production in *Cyclotella caspia* Grunow and *Tetraselmis gracilis* (Kyllin) Butcher. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 180: 175-187.
- [14] MARKS, T.R. E SIMPSON, S.E. 1999. Effects of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 28: 133 – 142.
- [15] JAHNKE, L.S. 1999. Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 48: 68-74.
- [16] BORNMAN, J.F. 1989. Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 4: 145-158.
- [17] LATTE, K.P. & KOLODZIEJ, H. 2000. Pelargoninins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*. *Phytochemistry*, 54: 701-708.
- [18] NOODÉN, L.D.; GUIAMÉT, J.J. & JOHN, I. 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 101:746-753.

Tabela 1. Teores de clorofilas e carotenóides dos ramos de *Phyllanthus tenellus* desenvolvidas sob diferentes faixas espectrais e no escuro, após 60 dias de cultivo *in vitro*. (Teste de Tukey-Krumer $p < 0,05$).

Tratamento Luz	Clorofila a (mg.gPF ⁻¹)	Clorofila b (mg.gPF ⁻¹)	Clorofila total	Clorofila a/b	Carotenóides (mg.gPF ⁻¹)
Branca	1,63±0,13 ^{ab}	1,00±0,14 ^{ab}	2,62±0,20 ^{ac}	1,66±0,30 ^a	0,36±0,05 ^a
Vermelha	1,69±0,19 ^{ab}	1,00±0,22 ^{ab}	2,40±0,55 ^{ac}	1,75±0,34 ^a	0,33±0,05 ^a
Verde	0,43±0,23 ^c	0,13±0,09 ^c	0,63±0,28 ^b	4,16±2,87 ^b	0,14±0,03 ^c
Amarela	1,90±0,17 ^a	1,23±0,36 ^a	3,14±0,46 ^a	1,70±0,38 ^a	0,48±0,06 ^b
Azul	1,54±0,14 ^{ab}	1,24±0,51 ^a	2,80±0,61 ^{ad}	1,42±0,52 ^a	0,30±0,06 ^a
Branca + UV-A	1,31±0,40 ^b	0,63±0,22 ^b	1,90±0,59 ^c	2,14±0,30 ^a	0,47±0,13 ^b
Escuro	1,43±0,36 ^b	0,67±0,25 ^b	2,10±0,60 ^{cd}	2,21±0,36 ^a	0,48±0,06 ^b