UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal

Dissertação

Alterações bioquímicas em espécies do gênero *Alternanthera* quando expostas à radiação UV-B e UV-C

Fátima Rosane Schuquel Klein

Pelotas, 2014

FÁTIMA ROSANE SCHUQUEL KLEIN

Alterações bioquímicas em espécies do gênero *Alternanthera* quando expostas à radiação UV-B e UV-C

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Profª. Drª. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-Orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Co-Orientador: Prof. Dr. Sidnei Deuner

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

K64a Klein, Fátima Rosane Schuquel

Alterações bioquímicas em espécies do gênero *Alternanthera* quando expostas radiação UV-B e UV-C / Fátima Rosane Schuquel Klein. – 86f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Eugenia Jacira Bolacel Braga; co-orientador José Antonio Peters e Sidnei Deuner.

1.Biologia. 2.Fisiologia vegetal. 3.Estresse abiótico. 4.Radiação ultravioleta. 5.Metabólitos secundários. 6. Plantas medicinais. 7. Fotoproteção. I.Braga, Eugenia Jacira Bolacel. II.Peters, José Antonio. III. Deuner, Sidnei. IV. Título

CDD: 581.19154

Banca Examinadora:

Drª. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Orientadora)

Drª. Juliana Magalhães Bandeira

Dr. Márcio Paim Mariot

Drª. Márcia Vaz Ribeiro

"Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender."

(Clarice Lispector)

Ao meu noivo Luis Felipe
Aos meus pais Roque e Regina
Ao meu irmão Ricardo
Com carinho Dedico

Agradecimentos

A Deus, que me deu saúde, coragem e persistência para enfrentar as dificuldades surgidas durante a realização do curso.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de participar do programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal.

A minha orientadora, Prof. Dr[a]. Eugenia Jacira Bolacel Braga, pela orientação, e confiança, por estar sempre me incentivando a buscar o melhor.

Ao Professor Luciano do Amarante por disponibilizar o Laboratório para realização das análises e pelos ensinamentos Bioquímicos.

Ao Professor Sidnei Deuner pela ajuda nas análises de enzimas.

Ao meu noivo, Luis Felipe Scherer, sem palavras para agradecer por estar ao meu lado nesta etapa sendo meu amor, companheiro, amigo, conselheiro e compreensivo em todos os momentos.

Aos meus pais Roque Klein e Regina S. Klein e também meu irmão Ricardo Klein, pelo amor, carinho e por não medirem esforços para que eu pudesse estudar.

À Natalia Engroff, e minha tia Maria Ivone Klein, por terem me acolhido em suas casas, pela amizade e compreensão nos momentos de estudo.

Aos bolsistas de iniciação cientifica Renata Trevizan Telles, Anderson Einhardt e Priscila Auler, em especial a Renata pela amizade e colaboração em todas as etapas de realização deste trabalho e também ao Anderson que colaborou com sua dedicação na última etapa deste trabalho.

Às colegas Andressa Reis e Alitcia Kleinowski pela ajuda e suporte teórico com as *Alternantheras*.

Aos colegas do Laboratório de cultura de tecidos que conheci nesses dois anos em especial: Gabriela Moraes, Daiane Silva, Vânia Trevelin, Camila Junkes, e Isabel Lopes pelas horas de conversa e amizade.

À Leticia Benitez pelos auxílios nas análises estatísticas.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica pelos ensinamentos em bioquímica em especial ao Julio Vinueza e o Junior Borella.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

KLEIN, Fátima Rosane Schuquel, **Alterações bioquímicas em espécies do gênero** *Alternanthera* **quando expostas à radiação UV-B e UV-C.** 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

Ainda é limitado o conhecimento dos efeitos da radiação ultravioleta (UV) em plantas medicinais quando comparados com o que já se conhece sobre outros fatores ambientais. Para investigar essas foram realizados dois experimentos: o primeiro com o objetivo de estudar a produção de betalaínas, flavonoides totais e atividade antioxidante em plantas de *Alternanthera sessilis*, *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera tenella* e *Alternanthera philoxeroides* expostas por diferentes períodos à radiação UV-B (280-315 nm) e, no segundo foram realizadas as mesmas análises, sendo, nesse caso investigada também a resposta de enzimas antioxidantes em *A. sessilis*, *A. brasiliana* e *A. philoxeroides* submetidas a diferentes tempos de exposição à UV-C (100-280 nm). No primeiro experimento, plantas cultivadas há 50 dias em casa de vegetação foram expostas a diferentes tempos de radiação UV-B (0, 2, 4, 6 e 8 horas). As coletas foram realizadas em dois períodos, imediatamente após cada tempo de exposição (0h) e após 24h dos mesmos, para visualizar uma possível recuperação. Até a realização da segunda coleta as plantas permaneceram sob iluminação natural, em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 4 x 5 x 2 com 5 repetições por tratamento, sendo cada uma representada por uma planta. Dentre as espécies em estudo, *A. sessilis* foi a que apresentou maior teor de betacianinas totais, betaxantina, flavonoides e maior poder antioxidante quando comparada com as demais espécies em todos os tempos de exposição à radiação. Nas espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana* foi observado que o tempo de recuperação favoreceu o aumento da produção desses compostos. As espécies *A. tenella* e *A. philoxeroides* não apresentaram incremento nos seus metabólitos após exposição à radiação UV-B. Para analisar os efeitos da radiação UV-C foi delineado um experimento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3 x 5, com três espécies (*A. sessilis*, *A. brasiliana* e *A. philoxeroides*) em cinco tempos de radiação (0, 5, 10, 15 e 20 min), com cinco repetições por tratamento. Os resultados dos metabólitos estudados diante da radiação UV-C demonstraram que houve maior incremento destes compostos em *A. sessilis*, entre 10 e 12 minutos de exposição e em *A. brasiliana* após 16 minutos de exposição. A espécie *A. philoxeroides* não apresentou incremento do seu conteúdo depois de irradiadas mantendo-se iguais ao controle. Para a atividade da enzima SOD (Superóxido dismutase), as espécies não apresentaram diferenças significativas enquanto para CAT (Catalase) e APX (Ascorbato peroxidase), *A. philoxeroides* mostrou maior atividade. Aumento do conteúdo de MDA (malondialdeído) foi verificado em *A. philoxeroides* e *A. sessilis* diante da radiação UV-C. Nas condições deste experimento observou-se que ambas as radiações promovem mudanças no conteúdo de betacianinas totais, betaxantinas, e flavonoides nas espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana* e que a radiação UV-C altera a atividade enzimática somente na espécie *A. philoxeroides*. Estas mudanças dependem do tempo de exposição e dos mecanismos de defesa acionados diante das radiações.

Palavras chave: Estresse abiótico, radiação ultravioleta, metabólitos secundários, plantas medicinais, fotoproteção.

ABSTRACT

KLEIN, Fátima Rosane Schuquel, **Biochemical alterations in species of genus** *Alternanthera* **exposed to UV-B and UV-C radiations.** 2014. 86 p. Dissertation (Master) – Pos-Graduation Program in Plant Physiology, Universidade Federal de Pelotas

The knowledge about ultraviolet (UV) effects in medicinal plants is still limited when compared with what is already known about other environmental factors. To investigate this issue we carried out two experiments: the first aimed to study the production of betalains, total flavonoid, and antioxidant activity in plants of *Alternanthera sessilis*, *Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera tenella, and Alternanthera philoxeroides*, which were exposed to UV-B radiation (280-315 nm) for different periods; the second performed the same analyses, adding the investigation of the antioxidant enzymes in *A. sessilis*, *A. brasiliana*, and *A. philoxeroides,* submitted to UV-C (100-280 nm) for different periods of exposure. In the first experiment, the plants grown for 50 days in greenhouse were exposed to different UV-B irradiation periods (0, 2, 4, 6, and 8 hours). The collections were conducted in two periods, immediately after each exposure time (0h) and after 24 hours, to view a possible recovery. During the period inside the greenhouse, the plants remained under natural light. The experimental design was completely randomized, in 4 x 5 x 2 factorial scheme with five replicates by treatment, each one represented by a plant. Among the species studied, *A. sessilis* showed higher levels of total betacyanins, betaxanthin, flavonoids, and greater antioxidant capacity compared to other species throughout the period of exposure to radiation. We observed that in the species *A. sessilis* and *A. brasiliana* the recovery time favored an increase in the production of these compounds. The species *A. tenella* and *A. philoxeroides* showed no increase in the production of their metabolites, after UV-B radiation exposure. A randomized experiment in factorial design 3 x 5 was conducted to analyze the effects of UV-C radiation with three species *A. sessilis*, *A. brasiliana*, and *A. philoxeroides* for times intervals of 0, 5, 10, 15, and 20 min, with five replicates for treatment. *A. sessilis* showed a higher increase in metabolites under UV-C radiation between 10 and 12 minutes of exposure; in *A. brasiliana* it was observed after 16 minutes of exposure. The species *A. philoxeroides* showed no increase in its content after irradiation, remaining equal to control. For the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD), the species showed no significantly differences, but for catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) showed greater activity. An increase in malondialdehyde (MDA) content under UV-C radiation was viewed in *A. philoxeroides* and *A. sessilis*. In this experiment it was observed that both radiations caused changes in the content of total betacyanins, betaxanthin, and flavonoids in the species *A. sessilis* and *A. brasiliana*, and UV-C radiation changed enzymatic activity only in the species *A. philoxeroides*. These changes depend on the time exposure to radiation and the defense mechanisms triggered.

Keywords: abiotic stress, ultraviolet radiation, secondary metabolites, medicinal plants, photoprotection.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL 12

2. REVISÃO DE LITERATURA 14

2.1 Gênero *Alternanthera* 14

2.2 Elicitores 15

2.3 Radiação Ultravioleta (UV) 16

2.4 Betalaínas 18

2.5 Flavonoides 20

2.6 Espécies Reativas de Oxigênio e Mecanismos de Defesa 20

3. REFERÊNCIAS 22

ARTIGO 1- Russian Jornal of Plant Physiology 29

Resumo 29

Abstract 30

1. INTRODUÇÃO 31

2. MATERIAL E MÉTODOS 33

3. RESULTADOS 35

4. DISCUSSÃO 40

5. CONCLUSÃO 44

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46

7. FIGURAS 51

ARTIGO 2- African Journal of Agricultural Research 54

Resumo 54

Abstract 56

1. INTRODUÇÃO 57

2. MATERIAL E MÉTODOS 59

3. RESULTADOS 64

4. DISCUSSÃO 67

5. CONCLUSÃO.....74

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76

7. FIGURAS.....83

4. COSIDERACÕES FINAIS 85

1. INTRODUÇÃO GERAL

Radiação Ultravioleta (UV) é um componente do espectro solar, e consiste em três partes, com base no comprimento de onda: radiação UV-A (315-400 nm), radiação UV-B (280-315 nm) e radiação UV-C (100-280 nm) (KATEROVA et al., 2009).

As radiações UV-B e UV-C são importantes fatores ambientais, que em muitos casos elevam o nível de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como oxigênio singleto ($^1O_2$), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-), podendo causar danos oxidativos às proteínas, lipídios e ácidos nucléicos e ainda, alterar atividades enzimáticas, o que levaria ao dano celular e morte celular programada (MACKERNESS et al., 2001; JENKINS, 2009).

Para se adaptar à exposição a radiações, as plantas exibem uma variedade de respostas. Elas podem estimular os mecanismos de proteção ou ativar mecanismos de reparo para lidar com estresses causados por radiação UV (SUN et al., 2010). Como um mecanismo de reparo as plantas podem ativar enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), que vão mitigar os danos induzidos por radiação UV (RAI et al., 2011).

O mecanismo de proteção mais comum contra a radiação é a biossíntese de metabólitos secundários que possuem potencial de absorção na região UV como os compostos fenólicos, tais como os flavonoides, antocianinas e betalaínas (IBDAH et al., 2002; KUHLMANN; MÜLLER, 2009; SCHREINER et al., 2012). Além de ser importante na defesa das plantas, a produção de metabólitos secundários induzidos por UV, pode fornecer uma fonte valiosa de produtos farmacológicos direcionados para medicamentos anticancerígeno, anticoagulante, antimicrobiano, ou tratamentos anti-inflamatórios (TSORMPATSIDISA et al., 2008).

As espécies da família Amaranthaceae estão entre as inúmeras plantas medicinais que atraem a atenção de pesquisadores. Esta família pertence à ordem Caryophyllales que é caracterizada por apresentar betalaínas, pigmentos naturais N-heterocíclicos, solúveis em água, que aparentemente substituem as antocianinas nas famílias pertencentes a esta ordem (STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003). O aumento na produção desses compostos é de interesse econômico, pois são quimicamente estáveis em um longo intervalo de pH, mais amplo do que as antocianinas, além de se compararem aos flavonoides, por serem potentes antioxidantes (PAVOKOVIC; KRSNIK-RASOL, 2011).

Trabalhos evidenciam que compostos do metabolismo secundário de plantas da ordem Caryophylales são alterados diante da radiação UV (IBDAH et al., 2002; SHARMA; GURUPRASAD, 2009). Em curto prazo, doses moderadas de radiação, principalmente UV-B, podem contribuir como um potente elicitor abiótico na produção de metabólitos secundários em larga escala (SUN et al., 2010).

Desse modo a presente dissertação é dividida em dois artigos: No primeiro avaliou-se o efeito da radiação UV-B na produção de betalaínas, flavonoides totais e atividade antioxidante na parte aérea de plantas de *Alternanthera sessilis, A. brasiliana, A. tenella* e *A. philoxeroides* e no segundo investigou-se as mudanças ocorridas na produção de betalaínas, flavonoides totais e atividade de enzimas antioxidantes em plantas de *Alternanthera sessilis, Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera philoxeroides quando* expostas à radiação UV-C.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Alternanthera*

O gênero *Alternanthera* pertence à família Amaranthaceae, compreendendo cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, ocorrendo no Brasil 20 gêneros e 100 espécies. Muitas destas espécies são utilizadas como ornamentais ou na medicina popular, sendo comumente encontradas em ambientes abertos, e também no interior de florestas (SOUZA; LORENZI, 2012).

Algumas espécies do gênero são utilizadas na medicina popular devido à atividade terapêutica proporcionada por compostos bioativos. Hundiwale et al. (2012) descreveram as espécies do gênero *Alternanthera* como produtoras e acumuladoras de metabólitos secundários, dentre eles, flavonoides, saponinas, vitaminas e betalaínas. Estudos etnofarmacológicos relataram a atividade antiviral, antimicrobiana, hepatoprotetora, antifúngica, anti-diarréica e analgésica de extratos de plantas desse gênero, como *A. sessilis*, *A. brasiliana*, *A. tenella* e *A. philoxeroides* (FERREIRA et al., 2003).

Alternanthera sessilis (L.) R. Br. ex DC. conhecida popularmente como violácea ou rubra, é uma planta invasiva de áreas agrícolas, nativa do Brasil. Nesta planta tem sido cientificamente comprovado a presença de componentes químicos como β-sitosterol e estigmasterol. As folhas são usadas em doenças dos olhos, em cortes e feridas; antídoto para picada de cobra e picada de escorpião, em doenças de pele (JALALPURE et al., 2008) e também foi identificado poder antioxidante (SHYMALA et al., 2005).

Alternanthera brasiliana (L.) Kuntze é uma planta nativa do Brasil e conhecida popularmente como penicilina, terramicina, doril ou carrapichinho (MACEDO et al., 1999). Amplamente encontrada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PEREIRA, 2007), é cultivada como ornamental pelo colorido arroxeado de suas folhas e empregada na medicina popular (LORENZI; MATOS, 2008). Suas inflorescências são utilizadas para

dores de cabeça, resfriados e gripes, as folhas como antitérmico e as raízes contra diarreia (AGRA et al., 2007).

Alternanthera tenella Colla, conhecida como apaga-fogo (FERREIRA et al., 2003), é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e antibacteriana (SILVEIRA; OLEA, 2009). A infusão de suas folhas é utilizada em casos de infecções, febres, machucados, coceiras e também como diurética (SALVADOR; DIAS, 2004). Estudos fotoquímicos de plantas do gênero *Alternanthera* indicaram a presença de compostos fenólicos, betalaínas e cromoalcaloides (BROCHADO et al., 2003; SALVADOR; DIAS, 2004; SALVADOR et al., 2006).

Alternanthera philoxeroides (Mart.). Griseb é popularmente conhecida como erva-de-jacaré, sendo utilizada como anti-inflamatória e diurética (RATTANATHONGKOM et al., 2009). Em sua constituição química foram encontrados flavonoides glicosilados, saponinas e betalaínas conferindo-lhe ação antitumoral e antiviral contra HSV (1 e 2) (vírus herpes simples 1 e 2), citomegalovírus, vírus do sarampo, vírus MUMPS e HIV (Human-Immunodeficiency-virus) (FANG et al., 2007; FANG et al., 2009; RATTANATHONGKOM et al., 2009).

2.2 Elicitores

O aumento de metabólitos secundários por elicitação é uma das estratégias encontradas recentemente para atender a demanda comercial de compostos de interesse industrial. Estes indutores são de origem abiótica ou biótica, que ao entrar em contato com células das plantas, pode provocar o aumento de pigmentos como flavonoides, fitoalexinas e outros compostos relacionados com a defesa da planta (SINGH, 1999).

Uma série de fatores como luz, temperatura, salinidade, alteram a composição dos metabólitos secundários das plantas. No entanto, apenas alguns fatores ambientais têm um efeito tão pronunciado sobre as plantas como a radiação UV (JAHANGIR et al., 2009).

Dentre os elicitores abióticos as radiações UV (UV-C, UV-B e também UV-A), vêm sendo empregada como indutoras do metabolismo secundário das plantas.

2.3 Radiação Ultravioleta (UV)

A radiação UV é um componente invisível da radiação solar. No espectro eletromagnético situa-se entre a luz visível e os raios-X, na faixa de comprimento de onda de 100 e 400 nanômetros (nm). Está dividida em UV-A (315-390 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-C (100-280 nm) (KATEROVA et al., 2009).

A camada estratosférica de ozônio é o principal agente atenuador da radiação ultravioleta na atmosfera terrestre e a redução desta camada, resultante da ação antrópica, conduziu a um consequente aumento da radiação UV-B (280-315 nm) incidente sobre a superfície terrestre (BLUMTHALER; AMBACK, 1990, ZIEMKE et al., 2000).

O Brasil, por ser um país localizado em baixas latitudes, recebe grande quantidade de radiação solar devido à intensidade da radiação UV ser maior na região entre o equador e os trópicos (LIM; COOPER, 1999). Em 2005, no Observatório Espacial do Sul, localizado em Santa Maria-RS, foi observado que a diminuição na camada de ozônio acarretou aumento de cerca de 10 % na radiação UV-B incidente na região Sul (HUPFER et al., 2005). Apesar das plantas serem mais tolerantes à radiação UV-B que outros organismos, essa promove alterações fisiológicas como, mudanças na composição química e nos níveis de pigmentação (FLINT et al., 2003; CALDWELL et al., 2007).

O aumento da síntese de compostos fenólicos, carotenoides, assim como, a indução de enzimas de sistemas antioxidantes constituem mecanismos que a célula vegetal utiliza para a proteção celular frente à geração de radicais livres formados pela ação da radiação UV-C (LIU et al., 2009).

As lâmpadas que emitem luz ultravioleta são utilizadas com segurança em hospitais, clínicas e laboratórios como alternativas para desinfecção e pesquisas. Elas

vêm sendo utilizadas em estudos com plantas, e têm se mostrado boa ferramenta para simular o efeito da radiação UV em tecidos vegetais. Dentre as espécies que foram estudadas após a exposição à luz UV, podemos citar: *Salix myrsinifolia*, conhecido popularmente como salgueiro nativo da Europa (TEGELBERG; JULKUNEN, 2001), *Chenopodium quinoa* Willd, conhecida popularmente como quinoa (HTLAL et al., 2004), planta medicinal da India: *Acorus calamus* L., conhecido como lírio-dos-charcos ou cana-cheirosa (KUMARI et al., 2009), *Mentha piperita* L., conhecida popularmente como hortelã - pimenta (DOLZHENKO et al., 2010), entre outros.

As plantas produzem uma diversidade de compostos orgânicos, dos quais a grande maioria não parece participar diretamente no crescimento e desenvolvimento. Estas substâncias tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, muitas vezes são diferencialmente distribuídas entre grupos taxonômicos limitados dentro do reino vegetal (HUSSAIN et al., 2012). São compostos orgânicos derivados através de metilação, hidroxilação ou glicosilação de metabólitos primários (hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, lipídios) (KORKINA et al., 2007).

Os compostos responsáveis pela atividade medicinal de diversas plantas são os metabólitos secundários produzidos por elas, os quais têm papel fundamental na proteção da planta contra predadores, produzindo toxinas contra o agente invasor, promovendo resistência a infecções e absorvendo os raios ultravioletas (YUNES; CALIXTO, 2001).

O interesse pelos produtos da via secundária das plantas ocorre desde a década de 1850. Estes novos fitoquímicos (compostos bioativos) não eram estudados somente com interesse acadêmico, mas também na indústria como corantes, polímeros, óleos e agentes aromatizantes. Além disso, eles proporcionaram a descoberta de novos medicamentos como os antibióticos. Nos últimos anos, as plantas ainda constituem uma

importante fonte de compostos químicos utilizados na indústria farmacêutica, agregando alto valor econômico (ZHANG; BJÖRN, 2009).

2.4 Betalaínas

Betalaínas são metabólitos secundários derivados do aminoácido L-tirosina (Fig. 1). Esse grupo de pigmentos é solúvel em água e é encontrado em espécies pertencentes à ordem Caryophyllales. Nesta ordem, as únicas exceções são as famílias Caryophyllaceae e Molluginaceae, em que a coloração é devido a antocianinas. Betalaínas e antocianinas são duas famílias diferentes de pigmentos que até o momento não foram encontradas juntas em uma mesma planta (GANDIA-HERRERO; GARCIA-CARMONA, 2013).

As betalaínas dividem-se em dois grupos estruturais, as betacianinas (compostos vermelhos ao vermelho violeta) com espectro de absorbância em 536 nm e as betaxantinas (compostos de coloração amarela) com absorbância de 480 nm. A sua produção é induzida pela radiação UV em *Mesembryanthemum crystallinum* L. (planta gelo) e *Amaranthus caudatus* L. (amaranto) e por infecção viral em *Beta vulgaris* L. (beterraba) sugerindo que estas moléculas atuem como radioprotetoras e antiviral (VOGT et al., 1999; SHARMA; GURUPRASAD, 2009).

Para a extração de betacianinas totais, estudos demonstram diferentes tampões de extração, nos quais o pH 6,0 (tampão fosfato) favorece a extração de betanina (glicosiladas) e das betaxantinas e o pH 5,0 (tampão acetato) é ideal para a estabilidade da betanidina (agliconas), podendo haver comprometimento com diferentes potenciais de hidrogênio ou de hidroxila (GANDIA-HERRERO et al., 2005, 2010; GANDIA-HERRERO; GARCIA-CARMONA, 2013).

As betalaínas são metabólitos que têm desejáveis características nutricionais e farmacológicas, sendo que o aumento na produção desses compostos é de interesse econômico, pois são potentes antioxidante e com atividade anti-inflamatória e anticancerígena (PAVOKOVIC; KRSNIK-RASOL, 2011).

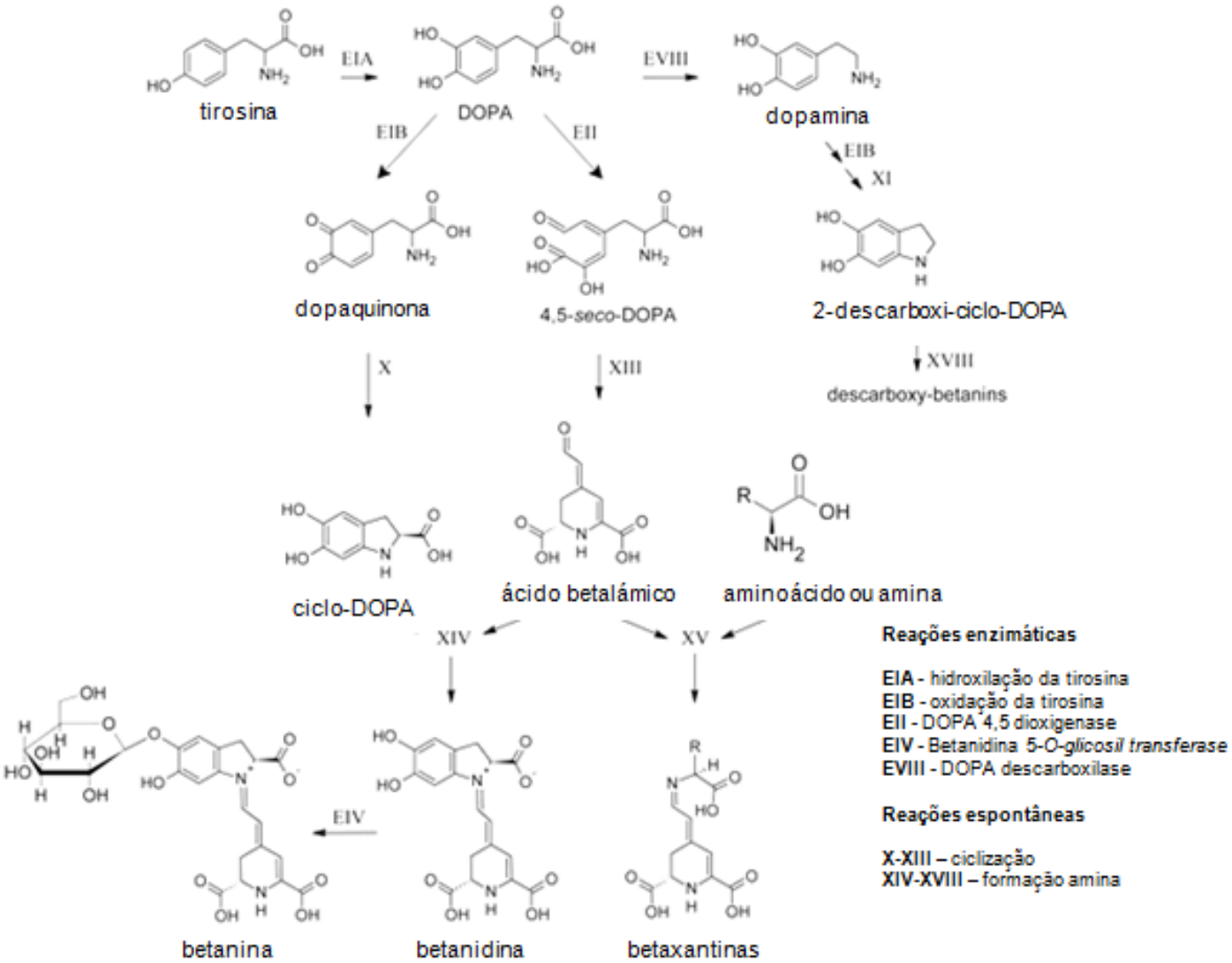

FIGURA 1- Representação esquemática da rota biosintética de algumas betalaínas (PAVOKOVIC; KRSNIK-RASOL, 2011).

2.5 Flavonoides

No grupo dos compostos secundários largamente distribuídos na natureza se encontram os flavonoides, que são substâncias naturais aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico (MANACH et al., 2004).

Os flavonoides formam um grupo com uma vasta gama de funções biológicas, incluindo papeis na proteção. Estas moléculas atuam como detoxificadora de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (SOKMEN et al., 2005), agindo na prevenção de doenças que envolvam a ação de radicais livres e a oxidação de lipoproteínas, como problemas cardiovasculares, arteriosclerose e trombose (WANG; ZHANG, 2005).

A absorção característica na região ultravioleta (UV) de flavonoides tem sido considerada como evidência para o papel dos flavonoides na proteção UV. Os flavonoides estão frequentemente presentes nas camadas de células da epiderme das folhas e em tecidos que são suscetíveis à luz UV (WINKEL-SHIRLEY, 2002). Segundo os autores, a primeira evidência do papel dos flavonoides na proteção UV foi observada em mutantes da rota de biossíntese deste composto, que resultou em fenótipos hipersensíveis à radiação UV.

2.6 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Mecanismos de Defesa

As plantas, dada sua característica de seres sésseis, estão expostas a uma grande variedade de estresses ambientais que alteram seu metabolismo e desenvolvimento, exibindo uma grande variedade de respostas nos níveis molecular e celular (FLOWERS et al., 2000; ZHU, 2001). Uma alteração metabólica importante para as plantas em condições de estresse é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FOYER; NOCTOR, 2005).

Dentre as principais ERO que causam danos celulares, destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singleto ($^1O_2$) e o radical hidroxila (OH^-) (NEILL et al., 2002; APEL; HIRT, 2004;). Estes são eletronicamente instáveis e, consequentemente, altamente reativos, com isso, são capazes de retirar elétrons de outros compostos a fim de alcançar a estabilidade, os quais, com a perda deste elétron, tornam-se um novo radical livre, desencadeando uma reação em cadeia, o que caracteriza estresse oxidativo (SMIRNOFF, 2000).

Para evitar o acúmulo de ERO as plantas possuem um sistema natural de defesa antioxidante constituído por componentes de natureza enzimática e não-enzimáticas muito eficientes que permitem a eliminação de ERO e a consequente proteção contra danos oxidativos (BLOKHINA et al., 2003).

Os antioxidantes não enzimáticos são representados pelas formas hidrossolúveis, como ascorbato e glutationa, e lipossolúveis, como α-tocoferol e carotenoides. Compostos fenólicos também eliminam radicais superóxido e hidroxila, além de oxigênio singleto (APEL; HIRT, 2004).

O sistema de defesa antioxidante enzimático das plantas inclui diversas enzimas localizadas nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas pode-se destacar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e ascorbato peroxidase (APX) que vão mitigar os danos induzidos pelo estresse (CORNIANI, 2009).

3. REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J.; COELHO, V. P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibanoll", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.383–395, 2007.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.

BLUMTHALER, M.; AMBACK, W. Indication of increasing solar UV-B radiation flux in alpine regions. **Plant Science**, v.248, p.206-208, 1990.

BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. da C.; GONÇALVES-KOATZ, V. L.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.14, p.449-451, 2003.

CALDWELL, M. M.; BORNMAN, J. F.; BALLARÉ, C. L.; FLINT, S. D.; KULANDAIVELU, G. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. **Journal Photochemistry and Photobiology Science**, v.6, p.252–266, 2007.

CORNIANI, N. **Relação entre estresse de radiação ultravioleta-b e óxido nítrico em plantas de eucalipto**. 2009, p.89. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho." Faculdade de Agronomia.

DOLZHENKO, Y.; CINZIA, M.; BARTEA, A.; OCCHIPINTI, A.BOSSI, S. MAFFEI, M.E. UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha piperita* L.). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.100, p.67–75, 2010.

FANG, J. B.; JIA, W.; GAO, W. Y.; YAO, Z.; TENG, J.; ZHAO, A. H.; DUAN, H. Q. Antitumor constituents from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian Natural Productos Resecar**, v.9, n.6, p.511-515, 2007.

FANG, J. B.; YAO, Z.; CHEN, J. C.; LIU, Y. W.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H. Q. Cytotoxic triterpene saponins from *Alternanthera philoxeroides*. **Journal of Asian natural products research**, v.11, p.261-266, 2009.

FERREIRA, E. A.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, E. A. M.; SILVA, A. A.; RUFINO, R. J. N. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV- *Amaranthus deflexus, Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphobia heterophylla*. Viçosa-MG. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.263-271, 2003.

FLINT, S. D.; RYEL, R. J.; CALDWELL, M. M. “Ecosystem UV-B experiments in terrestrial communities: A review of recent findings and methodologies”, **Agricultural and Forest Meteorology**, v.120, p.177-189, 2003.

FLOWERS, T. J.; KOYAMA, M. L.; FLOWERS, S. A.; CHINTA, S.; SINGH, K.P.; YEO, A. R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.99-106, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell, Environment**, v. 28, p.1056, 2005.

GANDIA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCIA-CARMONA, F. Betaxanthins as substrates for tyrosinase. an approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. **Plant Physiology**, v.138, p. 421-432, 2005.

GANDIA-HERRERO, F.; ESCRIBANO, J.; GARCIA-CARMONA, F. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. **Planta**, v.232, p.449-460, 2010.

GANDIA-HERRERO, F.; GARCIA-CARMONA, F. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. **Trends in Plant Science**, v.18, p.334-343, 2013.

HTLAL, M.; PARRADO, M. F.; ROSA, M.; GAIIARDO, M.; ORCE, L.; MASSA, E. M.; GONZALEZ, J. A.; PRADO, F. E. Epidermal Lignin Deposition in Quinoa Cotyledons in response to UV-B Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v.79, n.2, p.205-2010, 2004.

HUNDIWALE, J. C.; PATIL, A. V.; KULKARNI, M. V.; PATIL, D. A.; MALI, R. G. A current update on phyto pharmacology of the genus *Alternanthera*. **Journal of Pharmacy Research**, v.5, p.1924-1929, 2012.

HUPFER, N.; PERES, L. V.; DAMARIS, K.; SCHUCH, N. J.; LEMES, N. M. P. Comportamento da Radiação Ultravioleta em Decorrência do Efeito Secundário do Buraco de Ozônio Antártico sobre o Sul do Brasil no dia 29/09/2005. **Centro Regional Sul de Pesquisas Espaciais** – CRS/CCR/INPE-MCTI, Santa Maria, RS, Brasil, p. 1-5, 2005.

HUSSAIN, S.; FAREED, S.; ANSARI, S.; RAHMAN, A.; IFFAT-ZAREEN A.; SAEED M., Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal Pharmacy and Bioallied Science**, v.4, p.10-20, 2012.

IBDAH, M.; KRINS, A.; SEIDLITZ, H. K.; HELLER, W.; STRACK, D.; VOGT, T. Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. **Plant**, **Cell and Environment**, v.25, p.1145–1154, 2002.

JAHANGIR, M.; ABDEL-FARID, IB.; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE R. Healthy and unhealthy plants: the effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p. 23-33, 2009.

JALALPURE, S. S.; AGRAWAL, N.; PATIL, M. B.; CHIMKODE, R.; TRIPATHI, A. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternanthera sessilis* L. **International Journal of Green Pharmacy**, v.2, p.141-144, 2008.

JENKINS, G. I. Signal transduction in responses to UV-B radiation. **Annual Review of Plant Biology**, v.60, p.407−431, 2009.

KATEROVA, Z. ; IVANOV, S.; MAPELLI, S.; ALEXIEVA, V. Phenols, proline and low-molecular thiol levels in pea (*Pisum sativum*) plants respond differently toward prolonged

exposure to ultraviolet-B and ultraviolet-C radiations. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.31, n.1, p.111-117, 2009.

KORKINA, L. G.; MIKHAL'CHIK, E.; SUPRUN, M. V.; PASTORE, S.; DALTOSO, R. Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides. **Cellular and Molecular Biology**, v.53, n.5, p. 84-91, 2007.

KUHLMANN, F.; MÜLLER, C. Independent responses to ultraviolet radiation and herbivore attack in broccoli. **Journal Experimental Botany**, v. 60, p.3467–3475, 2009.

KUMARI, R.; SINGH, S.; AGRAWAL, S. B. Effects of supplemental ultraviolet-B radiation on growth and physiology of *Acorus calamus* L. (Sweet Flag). **Acta Biologica Cracoviensia,** v.51, n.2, p.19-27, 2009.

LIM, H. W.; COOPER, K. The health impact of solar radiation and prevention strategies. Report of the Environment Council. **Journal of the Americam Academy of Dermatology**, v.41, n.1, p.81-99, 1999.

LIU, L. H.; ZABARAS, D.; BENNETT, L. E.; AGUAS, P.; WOONTON, B. W. Effects of UV-C, red light and sun light on the carotenoid content and physical qualities of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v. 115, p. 495-500, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Ed. Nova Odessa, São Paulo: **Instituto Plantarum**, ed.2, p.544, 2008.

MACEDO, A. F.; BARBOSA, N. C.; ESQUIBEL, M. A. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Pharmazie**, v. 54, n.10, p. 776-777, 1999.

MACKERNESS, S. A. H.; JOHN, C. F.; JORDAN, B.; THOMAS, B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: Distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. **FEBS Lett**, v.489, p. 237-242, 2001.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability**. American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

NEILL, S. J.; RADHIKA, D.; CLARKE, A.; HURST, R. D.; HONCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1237-1247, 2002.

PAVOKOVIC, D.; KRSNIK-RASOL, M. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. **Food Technology and Biotechnology**, v.49, n.2, p.145–155, 2011.

PEREIRA, D. F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik; estudo fitoquímico e biológico de *Alternanthera brasiliana*.** 2007, p.111. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria.

RAI R.; MEENA R. P.; SMITA, S. S.; SHUKLA, A.; RAI, S. K.; PANDEY-RAI S. UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L.-An antimalarial plant. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.105, p.216–225, 2011.

RATTANATHONGKOM, A.; LEE, J. B.; HAYASHI, K.; SRIPANIDKULCHAI, B. O.; KANCHANAPOOM, T.; HAYASHI, T. Evaluation of saponin IV isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. **Planta Medica** v.75, p.829-835, 2009.

SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera marítima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.107-110, 2004.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; DE CASTRO, W. V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D. A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift fur Naturforsch**, v.61c, p.19-25, 2006.

SCHREINER, M.; MEWIS, I.; HUYSKENS-KEIL, S.; JANSEN MAK.; ZRENNER, R.; WINKLER, J. B.; O'BRIEN, N.; KRUMBEIN, A. UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites Potential Benefits for Plant and Human Health. **Critical Reviews in Plant Sciences,** v.31, p.229-240, 2012.

SHARMA, A.; GURUPRASAD K. N. Similarities in the biochemical changes between solar UV exclusion and GA application in *Amaranthus caudatus* **Physiology and Molecular Biology Plants**, v.15, n.4, p.367-370, 2009.

SHYMALA, B. N.; GUPTA, S.; LAKSMI, A. J.; PRAKASH, J. Leafy vegetables extracts antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p.239-245, 2005.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G. Isolamento de compostos com atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.90, n.2, p.148-153, 2009.

SINGH, G. Elicitation-manipulating and enhancing secondary metabolite production. **Plan Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients**, p.101-111, 1999.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.229-235, 2000.

SOKMEN, M.; ANGELOVAB, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SERKEDJIEVA, J. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. **Life Sciences**, v.76, p.2981–2993, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3. ed. Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum, 2012. 768p.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v.62, p.247-269, 2003.

SUN, M.; XIDA, G. U.; HONGWEI, F. U.; ZHANG, L.; RUNZE, C.; CUI, L.; ZHENG, L.; ZHANG, D.; TIAN, J. Change of secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* L. in response to UV-B induction. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p.672–676, 2010.

TEGELBERG, R.; JULKUNEN-TIITTO, R. Quantitative changes in secundary metabolites of dark-leaved willow (*Salix myrsinifolia*) exposed to enhaced ultraviolet-B radiatiom. **Physiologia Plantarum**, v.113, p.541-547, 2001.

TSORMPATSIDISA, E.; HENBESTB, R. G. C.; DAVIS, F. R.; BATTEYA, N. H.; HADLEYA, P.; WAGSTAFFEA, A. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce 'Revolution' grown under polyethylene films. **Environmental and Experimental Botany**, v.63, p.232-239, 2008.

VOGT, T.; IBDAH, M.; SCHMIDT, J.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; STRACK, D. Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Phytochemistry**, v.52, p.583–592, 1999.

WANG, L.; ZHANG, H. A theoretical study of the different radical-scavengingactivities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. **Bioorganic Chemistry**, v.33, p.108-115, 2005.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.218-223, 2002.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1. ed. Chapecó- SC: ed. Argos, UNOESC, 2001. 500p

ZHANG, W. J.; BJÖRN, L. M. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. **Fitoterapia**, v.80, n.4, p.207-218, 2009.

ZHU, J-K. Plant Salt Tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, p.66-71, 2001.

ZIEMKE, J. R.; CHANDRA, S.; HERMAN, J. Erythemally weighted UV trends over northern latitudes derived from Nimbus 7 TOMS measurements. **Journal of Geophysical Research**, v.105, p.7373-7382, 2000.

ARTIGO 1: Russian Jornal of Plant Physiology (ISSN: 1021-4437)

Radiação UV-B: Um elicitor para produção de metabólitos secundários em plantas do gênero *Alternanthera*

Resumo. A radiação UV-B tem sido descrita como um potente elicitor na síntese de metabólitos secundários em plantas. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de betalaínas, flavonoides totais e atividade antioxidante em plantas de *Alternanthera sessilis* (violaceae), *Alternanthera brasiliana* (penicilina), *Alternanthera tenella* (apaga fogo) e *Alternanthera philoxeroides* (erva de jacaré) expostas à radiação UV-B (280-315 nm), por diferentes períodos. Plantas destas espécies, provenientes do cultivo *in vitro,* foram aclimatizadas em casa de vegetação durante 50 dias. Após esse período foram expostas durante 0, 2, 4, 6 e 8 horas à radiação UV-B, caracterizando radiações de 0, 10, 20, 30, 40 J/cm^2, respectivamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualisado com esquema fatorial 4x5x2, sendo quatro espécies, cinco tempos de exposição à radiação UV-B, e dois períodos de coleta: imediatamente após a exposição às radiações (0 h) e 24 h após cada tempo de exposição. Nas condições deste experimento, *A. sessilis* apresentou maior teor de todos os compostos estudados. Os teores de betacianinas totais e betaxantinas mostraram que a exposição à radiação UV-B resultou em aumento significativos desses compostos no decorrer do tempo de exposição à radiação para *A. sessilis* e *A. brasiliana*. Os maiores teores de flavonoides foi estimado na exposição de 8 h com período de 24 h de recuperação para *A. sessilis*. A atividade antioxidante também foi superior em *A. sessilis*. Conclui-se que a ação elicitora da radiação UV-B é influenciada pelo tempo de exposição e os maiores tempos de exposição seguidos por período de recuperação incrementam o teor de betacianinas totais, betaxantinas, e flavonoides nas espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana*.

Palavras chave. *plantas medicinais, elicitor abiótico, gênero Alternanthera, radiação ultravioleta, antioxidantes.*

UV-B radiation: elicitor for secondary metabolites production in plants of genus *Alternanthera*

Abstract. UV-B radiation has been described as a potent elicitor for inducing the synthesis of plant secondary metabolites. This work aimed to study the production of betalains, total flavonoids, and antioxidant activity in plants of *Alternanthera sessilis* (sessile joyweed), *Alternanthera brasiliana* (Brazilian joyweed), *Alternanthera tenella* (parrot leaf), and *Alternanthera philoxeroides* (alligator weed) exposed to UV-B radiation (280 - 315 nm) over different periods. Plants from *in vitro* culture were acclimatized over 50 days in greenhouse. After this period, they were exposed to 0, 10, 20, 30, 40 J/cm^2 UV-B radiation for 0, 2, 4, 6, and 8 hours, respectively. We carried out a randomized experiment in factorial design 4x5x2, with four species, five periods of UV-B radiation exposure, and two period of collection: immediately after radiations exposure (0h) and 24h after each period of exposure. Under the conditions of the experiment, *A. sessilis* showed the highest content among all compounds studied. The total betacyanins and betaxanthins content showed that the exposure to UV-B radiation resulted in a significantly increase in these compounds during the period of exposure to radiation for *A. sessilis* and *A. brasiliana*. The higher flavonoids content was estimated at the 8-hour exposure, with a period of 24 hours for recovering in *A. sessilis.* Antioxidant activity was also higher in *A. sessilis.* We concluded that the elicitor effect of UV-B radiation is influenced by the exposure time, and the longer exposure times followed by recovery period increment the total betacyanins, betaxanthins, and flavonoids content in the species *A. sessilis* and *A. brasiliana*.

Keywords: medicinal plants, abiotic elicitor, genus *Alternanthera*, ultraviolet radiation, antioxidants.

INTRODUÇÃO

Embora muitas substâncias químicas sejam atualmente produzidas sinteticamente, as plantas ainda constituem importante fonte de compostos químicos utilizados na indústria farmacêutica, agregando alto valor econômico [1]. Estima-se que 25 % dos medicamentos receitados são derivados direta ou indiretamente de plantas [2]. No entanto, a produção destes metabólitos secundários nos vegetais é geralmente baixa (menos de 1 % da massa seca) e depende muito do estádio fisiológico e do desenvolvimento da planta [3, 4].

O uso de elicitores tanto bióticos quanto abióticos é uma das estratégias utilizada para o aumento de metabólitos secundários com aplicação comercial. Dentro dos elicitores abióticos, os elicitores físicos, tais como raios ultravioleta-B, podem induzir distintas alterações no metabolismo das plantas [5]. A radiação UV-B (290-320 nm) é um importante fator que, em muitos casos, induz a produção de metabólitos secundários, principalmente os envolvidos no sistema de defesa da planta, como alcaloides e flavonoides [1, 6, 7].

Apesar das plantas serem mais tolerantes à radiação UV-B que outros organismos, essa provoca mudanças fisiológicas como, alterações na composição química e mudanças nos níveis de pigmentação [8, 9]. Estudos relatam que juntamente com a atividade antioxidante, flavonoides são compostos ideais para proteção das radiações UV [10]. A primeira evidência do papel dos flavonoides na proteção UV surgiu com mutantes da rota de biossíntese deste composto, que resultou em fenótipos hipersensíveis as radiações UV [11].

Além de flavonoides, a radiação UV-B também influencia no teor de betalaínas, conforme observado em plantas da ordem Caryophyllales [12, 13]. As betalaínas são metabólitos que têm desejáveis características nutricionais e farmacológicas, sendo que o aumento na produção desses compostos é de interesse econômico, pois são quimicamente estáveis em um longo intervalo de pH, maior do que o das antocianinas, além de serem, como os flavonoides, potentes antioxidantes [14].

Dentro da ordem Caryophyllales se destaca a familia Amaranthaceae. Nesta família encontra-se o gênero *Alternanthera* Forsk. 1775, que possui aproximadamente 80 espécies, sendo que 30 delas podem ser encontradas em território brasileiro. Neste gênero, quatro espécies merecem atenção especial pela sua importância medicinal e econômica: *Alternanthera sessilis, Alternanthera brasiliana*, *Alternanthera tenella,* e *Alternanthera philoxeroides*. Estas espécies possuem capacidade de armazenar metabólitos secundários de grande interesse medicinal e diversidade química [15].

Trabalhos evidenciam que compostos do metabolismo secundário de plantas da ordem Caryophyllales são alterados diante da radiação UV-B. Em estudo com *Mesembryanthemum crystallinum*, foi constatado que a radiação UV-B aumentou o conteúdo de flavonoides e betacianinas [12], enquanto em *Amaranthus caudatus* a exclusão de UV-B resultou na inibição da síntese de betacianinas [13]. No entanto, não foram encontrados estudos sob a radiação UV-B em *A. sessilis*, *A. brasiliana*, *A. tenella* e *A. philoxeroides*.

Levando em consideração os estudos já realizados, este trabalho teve por objetivo investigar a capacidade elicitora da radiação UV-B na produção de betalaínas, flavonoides totais e quantificação da atividade antioxidante em espécies de *A. sessilis*, *A. brasiliana*, *A. tenella* e *A. philoxeroides.*

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo. Plantas de *A. sessilis*, *A. brasiliana*, *A. tenella* e *A. philoxeroides*, previamente estabelecidas por 30 dias *in vitro*, em meio MS [16], sem regulador de crescimento, no Banco de Plantas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas foram aclimatizadas durante 50 dias em casa de vegetação. Para isso, as plantas tiveram suas raízes lavadas em água corrente para retirar qualquer vestígio de meio e foram transferidas individualmente para copos plásticos, contendo vermiculita como substrato. A irrigação das plantas em casa de vegetação foi realizada a cada dois dias com solução nutritiva de Hogland [17] (50 %) até completarem 50 dias. Após esse período plantas com 10 a 15 pares de folhas foram submetidas à radiação UV-B por 0, 2, 4, 6 e 8 horas em câmara UV-B com duas lâmpadas Philips UVB Broadband TL 40W/12 RS SLV, pico em 302 nm, a uma distância de 30 cm das plantas correspondendo à radiação de 10, 20, 30, 40 J cm^2. As quais foram medidas com radiômetro ultravioleta digital marca Instrutherm, modelo MRU-201 (a radiação foi medida na parte superior da copa das plantas). Plantas controle permaneceram na casa de vegetação durante esse período sob iluminação natural.

Delineamento experimental. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 4x5x2, sendo quatro espécies, cinco tempos de exposição à radiação UV-B, e dois períodos de coleta: imediatanemte após a exposição ás radiações (tempo 0 horas) e 24 horas após a exposição ás radiações UV-B, sendo que durante este período as plantas permaneceram sob luz natural em casa de vegetação, caracterizando um período de recuperação metabólica. Cada repetição foi composta por cinco plantas de cada espécie, sendo que após receberem a radiação, foi coletada a parte aérea de cinco plantas enquanto as outras cinco permaneceram por 24 horas em casa de vegetação para caracterizar o período de recuperação. Logo após todas as coletas as plantas foram armazenadas em ultrafreezer a -80 ºC para posterior análises bioquímica. Os resultados foram

submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat [18].

Quantificação de betacianinas totais. A extração das betacianinas, betanidina e betanina, foi realizada com dois tipos diferentes de tampão extrator. Para betanidina optou-se por utilizar tampão acetato de sódio 10 mM e metanol (70/30 %), e acrescido a essa solução, ascorbato de sódio numa concentração de 10 mM (pH 5,0) e para betanina a extração foi efetuada utilizando tampão fosfato de potássio 10 mM, acrescido de ascorbato de sódio 10 mM (pH 6,0), sem adição de solvente orgânico. Para as duas análises utilizou-se 125 mg de massa fresca da parte aérea, que foram maceradas em almofariz e o extrato filtrado em gaze e centrifugado a 10000 g, por 20 min, a 4 ºC como descrito por Gandia-Herrero [19]. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo de betanidina foi de ϵ= 54000 $M^{-1}cm^{-1}$ e para betanina foi de ϵ= 65000 $M^{-1}cm^{-1}$, em um comprimento de onda de 536 nm [20], os resultados foram expressos em miligrama de betanidina em 100 grama de massa fresca e miligrama de betanina em 100 grama de massa fresca. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS modelo Ultrospec 7000 marca Ge Healthcare.

Quantificação de betaxantinas. Para a extração de betaxantinas foram utilizados 125 mg de massa fresca da parte aérea as quais foram maceradas em almofariz com tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido 10 mM de ascorbato de sódio. O homegeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 10000 g, por 20 min, a 4 ºC [19]. A concentração de betaxantina foi determinada levando em consideração o coeficiente de extinção molar para miraxantina ϵ=48000M^{-1} cm^{-1}, em um comprimento de onda de 480 nm e o resultado foi expresso em mg de miraxantina por 100 grama de massa fresca [21].

Quantificação de flavonoides totais. O teor de flavonoides também foi realizado utilizando tampão acetato/metanol como solvente extrator. As determinações de flavonoides foram expressas em µmol de quercetina por grama de massa fresca. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, em 330 nm [19, 22]

Quantificação da atividade antioxidante. A atividade antioxidante foi analisada a partir do método DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil) conforme descrito por Brand-Williams [23], que é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Para este ensaio, 300 mg de amostra fresca da parte aérea foram maceradas em almofariz com tampão acetato/metanol (50/50 %, v/v) e centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm. Foi preparada solução metanólica de DPPH 60 μM, de forma a apresentar absorbância em 515 nm entre 0,6 e 0,7. As determinações foram realizadas adicionando-se 3,7 mL da solução de DPPH e 0,3 mL do sobrenadante dos extratos em tubos de ensaio, que permaneceram no escuro durante 1 horas para posteriores leituras em 515 nm. Para avaliação da atividade captadora de radical livre foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH, calculados em relação à amostra controle (acetato/metanol + DPPH 60 μM), pela seguinte equação: % inibição do DPPH = [(A0 – A1) / A0 x 100], onde: A0 = absorbância do controle; A1 = absorbância da amostra [24].

RESULTADOS

Betacianinas totais (*betanidina e betanina*)

Os níveis de betanidina em função da exposição à radiação UV-B mostraram interação significativa entre os fatores tempo x espécie, e também entre espécie x período de recuperação. Os fatores tempo x período de recuperação e tempo x espécie x período de recuperação, não apresentaram resultados significativos diante da radiação.

Os teores médios de betanidina diferiram significativamente à medida que aumentou o tempo de exposição à radiação UV-B, para as espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana*. Observou-se que *A. sessilis* é a espécie que possui maior teor desse pigmento no tratamento controle e que após receber radiação por 8 h houve um incremento de 39 % nesse teor, alcançando 37,27 mg de betanidina por 100 grama de massa fresca. Para *A. brasiliana* os teores no tratamento controle são inferiores à *A. sessilis*, porém observou-se que a partir de 2 horas de exposição à radiação o conteúdo aumentou em 45 % a mais do que o do controle, atingindo após 8 horas, um incremento

de 52 %, o que equivale a 21,7 mg de betanidina por 100 grama de massa fresca. As espécies *A. tenella* e *A. philoxeroides* apresentaram valores médios de 3,5 e 2,3 mg de betanidina por 100 grama de massa fresca, respectivamente, em plantas controle, sendo que estes não apresentaram diferenças significativas diante da exposição à radiação UV-B (Fig. 1a).

Na interação entre os fatores espécie e período de recuperação, a espécie *A. sessilis* foi a que apresentou maior teor de betanidina, correspondendo a 27,1, logo após receber a radiação, e 31,7 mg de betanidina por 100 grama de massa fresca após 24 horas de recuperação, totalizando um incremento de 16 %. *A. brasiliana* também apresentou diferença nos teores de betanidina havendo incremento no conteúdo após o período de recuperação com um aumento de 11 %, as quais diferem de *A. tenella* e *A. philoxeroides* cujos teores de betanidina não diferiram em função do período de recuperação (Fig. 1b).

Os resultados da análise de variância para a variável betanina mostraram haver interação significativa para os fatores tempo x espécie e espécie x período recuperação. O mesmo não foi observado para as demais interações possíveis.

Em relação aos fatores tempo x espécie, *A. sessilis* foi a espécie que apresentou maiores teores de betanina tanto em plantas controle como em plantas irradiadas, chegando a atingir 42,58 mg de betanina por 100 g de massa fresca em 8 horas de exposição a radiação. Este valor corresponde a 51 % a mais que o estimado no controle. A espécie *A. brasiliana* mostrou valores inferiores aos encontrados em *A. sessilis*, porém apresentou um incremento a partir de 2 horas de exposição à radiação atingindo após 6 horas de radiação 24 % a mais do encontrado em plantas controle. Em plantas de *A. tenella* e *A. philoxeroides* foi estimado valores máximos de 3,9 e 2,8 mg de betanina por 100 g de massa fresca os quais não diferem significativamente com os tempos de exposição à radiação UV-B (Fig. 1c).

Quanto à interação dos fatores espécie x período de recuperação para o teor de betanina, as espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana* foram as que apresentaram resultados mais expressivos em

relação a essa variável, independente de haver recuperação ou não. O aumento nos teores de betanina no período de recuperação em *A. sessilis* foi de 14 % e em *A. brasiliana* foi de 33 % quando comparadas com as plantas analisadas imediatamente após à radiação. As espécies *A. tenella* e *A. philoxeroides* apresentaram valores constantes em relação ao controle independente de haver período de recuperação (Fig. 1d).

Fig. 1. (aqui)

Betaxantinas

Os efeitos da radiação UV-B, foram expressivos para os teores de betaxantinas,em que houve efeito significativo para as interações dos fatores tempo x espécie, espécie x período de recuperação e tempo x período de recuperação.

A espécie *A. sessilis* foi a que apresentou maior teor deste pigmento, mesmo não tendo recebido radiação (9,6 mg de miraxantina V por 100 g de MF^{-1}) e, diante da radiação UV-B os teores aumentaram consideravelmente já em 2 horas de exposição, atingindo, em 8 horas, 55 % a mais que o controle (14,9 mg de miraxantina V por 100 g de MF^{-1}). Para *A. brasiliana*, os tempos de exposição à radiação de 2, 4, 6 e 8 horas também apresentaram resultados significativos em relação ao controle. Os valores estimados a partir de 4 horas (10 mg de miraxantina V por 100 g de MF^{-1}) é aproximadamente 40 % maior que o encontrado em plantas não irradiadas. Já as espécies *A. tenella* e *A. philoxeroide* não apresentaram diferenças entre os tratamentos quando comparadas com o controle (Fig. 2a).

Os valores obtidos, ao analisar a interação espécie e período de recuperação, foram mais expressivos para *A. sessilis* a qual diferiu significativamente das demais espécies tanto nas análises imediatamente após a radiação (0 horas) quanto nas realizadas após 24 horas de recuperação. As plantas de *A. sessilis* e de *A. brasiliana* apresentaram aumento na produção de betaxantina de 28 e 31 %, respectivamente após 24 horas de recuperação quando comparado com as que foram analisadas logo após a exposição à radiação (0 horas). Já para as espécies *A. tenella* e *A.*

philoxeroides, não houve aumento significativo em relação às plantas que tiveram o período de 24 horas de recuperação ou não (0 horas) (Fig. 2b).

Na análise da interação tempo x período de recuperação foi observado no tempo de 8 horas de exposição um incremento no teor de betaxantinas totais que diferiu significativamente de plantas controles as quais não receberam radiação.

Os tempos de 2, 4, 6 e 8 horas com período de recuperação (24 horas) diferiram de plantas controles submetidas também à recuperação. Nos tempos com período de recuperação o aumento foi mais expressivo, quando comparado com os tempos sem recuperação sendo que em 6 horas o aumento foi de 26 % em relação ao controle com recuperação. Em todos os tempos de exposição, inclusive no controle, houve maior acúmulo de betaxantina nas plantas que passaram pelo período de recuperação, atingindo valores máximos de 36 % no tempo de 4 horas e 47 % após 6 horas. A diferença significativa entre plantas controles, não recuperada e plantas controles recuperadas é explicado pelo aumento deste pigmento em plantas das diferentes espécies no período com recuperação.

Fig. 2. (aqui)

Determinação de Flavonoides e atividade antioxidante

Para flavonoides as interações tempo x espécie, espécie x período de recuperação e tempo x período de recuperação apresentaram resultados significativos diante do elicitor abiótico radiação UV-B.

Entre as espécies estudadas, a que apresentou maior teor de flavonoides totais em plantas controle foi *A. sessilis* (2,23 μmol de flavonoides totais por g de massa fresca). Esta espécie apresentou incremento na síntese de flavonoides com a exposição a radiação UV-B, iniciando em 6 horas e atingindo, em 8 horas, 51 % a mais que o controle. A espécie *A. philoxeroides* foi a segunda espécie que apresentou maior teor de flavonoides nas plantas controle (1,7 μmol de flavonoides totais por g de massa fresca) e manteve constante os teores durante todos os tempos de radiação. *A.*

brasiliana apresentou incremento em 8 horas de 62 %, no entanto, esse aumento difere estatisticamente somente do controle. Em *A. tenella* foi estimado valores médios de 0,78 μmol de flavonoides totais por g de massa fresca em todos os tempos, os quais também não diferem do controle (Fig. 3a).

Foi estimado em *A. sessilis* a maior quantidade de flavonoides totais após o período de recuperação. O mesmo foi observado em *A. tenella* e *A. philoxeroides*, em que o período de recuperação incrementou o teor de flavonoides em 100 % e 40 %, respectivamente, em relação às plantas que não passaram pelo período de recuperação. *A. sessilis* incrementou 20 % do conteúdo de flavonoides totais após o período de recuperação, enquanto *A. brasiliana* não apresentou aumento significativo nesse teor quando comparado com o tratamento sem recuperação (Fig. 3b).

Para tempo x período de recuperação, os tratamentos com 24 horas de recuperação obtiveram incremento significativo, sendo que a exposição à radiação em 8 horas apresentou maior teor de flavonoides (2,25 μmol de flavonoides totais por g de massa fresca), correspondendo a 63 % de incremento em relação ao seu controle. Dentro dos diferentes tempos de exposição houve diferenças significativas entre os tratamentos com e sem período de recuperação a partir de 2 horas, sendo que a maior diferença foi observada em 6 horas com 57 % a mais das plantas que tiveram o período de recuperação em relação às plantas que não tiveram sob o mesmo tempo de exposição à radiação UV-B (Fig. 3c).

Quanto à atividade antioxidante, observou-se que *A. sessilis* é a espécie que apresenta maiores valores nas plantas controle (68,78 % de inibição de DPPH). Sendo que para essa espécie, para *A. brasiliana* e *A. philoxeroides* não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de exposição. Para *A. tenella* observou-se em 4 horas de exposição diferença significativa em relação aos demais tempos, sendo que nesse tempo de exposição à radiação a atividade aumentou em 30 % a mais do que o do controle.

Fig. 3. (aqui)

DISCUSSÃO

A radiação UV-B é um elicitor natural na produção de metabólitos secundários em plantas superiores [25]. Estudos têm dado destaque às propriedades reguladoras do metabolismo secundário pela radiação UV-B, resultando em acúmulo de principalmente pigmentos foto protetores, como compostos fenólicos, betalaínas e carotenoides [26].

Embora os papéis de alguns metabólitos secundários ainda estejam em questão [27], a maioria dos autores afirmam que a produção destes compostos (principalmente os flavonoides e outros metabólitos de absorção de UV-B, como betacianinas) nas plantas submetidas a doses de radiação UV-B apresenta um fator importante do complexo sistema de defesa da planta [28, 29, 10].

Análise da acumulação de antocianinas induzida por UV-B revelou que o foto-receptor tem a sua atividade máxima a 290 nm, e funciona por si só ou em associação com o fitocromo [30]. Como as betalaínas (betacianinas totais e betaxantinas) apresentam espectro de absorção próximo das antocianinas, é sugerido que essas cumpram a função de foto proteção em espécies da ordem Caryophyllales que não possuem o pigmento antocianina [26]. Apesar de ainda não estar comprovado, é relatado em estudos que as betacianinas são funcionalmente semelhantes às antocianinas como fotoprotetoras [13].

No presente estudo observou-se que o conteúdo de betacianinas totais aumentou significativamente nas espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana* com o aumento do tempo de exposição à radiação UV-B. Em trabalho com *Amaranthus caudatus* L. também foi observado que as betacianinas são induzidas por UV-B, e que a exclusão dessa radiação resultou na inibição da síntese desse pigmento. Foi observado também que a inibição foi mais elevada pela exclusão de UV-B quando comparada com UV-A [13]. A radiação UV-B também induziu maior síntese de betacianinas em *Mesembryanthemum crystallinum* L.[12].

O incremento de betacianinas totais pode estar relacionada com possível atividade foto protetora que esses pigmentos podem desempenhar diante da exposição à radiação UV-B. Estudos

relatam que antocianinas, através de movimentos de prótons convertem a radiação ultravioleta em calor. No entanto, o movimento de prótons não explica isoladamente a capacidade de "filtro solar" destes pigmentos. Nos vacúolos existem copigmentos que absorvem fortemente a radiação ultravioleta, porém diferente das antocianinas, estes não possuem mecanismos para dissipar a energia da luz sem causar reações químicas danosas a células [31], por isso acredita-se que a interação entre antocianinas e copigmentos desempenhe importante papel na proteção da radiação UV nos vegetais. Como na ordem Caryophyllales este pigmento é ausente, e através da constatação do aumento nos teores de betalaínas, de acordo com o aumento do tempo de exposição à radiação UV-B pode-se inferir que esses pigmentos podem estar desempenhando mecanismo semelhante aos das antocianinas, resultando em capacidade de "filtro solar" para os vegetais.

Em relação aos diferentes resultados encontrados para betanidina e betanina, observou-se que a radiação UV-B favoreceu mais a presença de betanina para *A. sessilis* e de betanidina para *A. brasiliana*. Estudos relatam que a radiação UV-B pode modificar a composição do pigmento, buscando redução dos níveis de radiação sobre os tecidos da planta [32], o que parece ser específico da espécie, sendo que a associação do pigmento com outros compostos, como os copigmentos, podem atenuar os danos oxidativos causados pela radiação UV-B.

A quantificação de betacianinas em plantas de *A. sessilis* cultivadas *in vitro* durante 45 dias sob a influência de diferentes luzes (azul, branca e vermelha) resultaram em valores acima de 40 mg de betanidina e betanina por 100 grama de massa fresca, não apresentando incremento significativo entre as diferentes luzes [22]. Em plantas controles de *A. sessilis,* no presente estudo, o valor estimado foi semelhante para betanina e inferior para betanidina quando comparado com o encontrado no trabalho com diferentes luzes. O incremento observado neste estudo durante a exposição à radiação UV-B, principalmente em plantas recuperadas, demonstrou que esta radiação tem uma influência positiva em relação à produção de betacianinas totais, para as espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana*.

Não foram encontrados relatos na literatura sob a produção de betaxantinas em plantas quando submetidas à exposição de radiação UV-B, porém, no presente estudo, observou-se que ocorreram variações nos teores desse pigmento sob a ação dessa radiação. Tendo em vista que a radiação ultravioleta ou absorção de luz visível excita os elétrons do cromóforo p do pigmento para um estado mais energético (p*), aumentando a atividade ou diminuindo a energia de ativação da molécula [33] e que as betacianinas e betaxantinas possuem uma unidade de dihidropiridina idêntica biogeneticamente entre si, derivada de DOPA (dihidroxi fenilalanina) sugere-se que o controle da sua síntese ocorra em nível de formação de um intermediário comum entre os pigmentos [20].

A. tenella e *A. philoxeroides* não apresentaram mudanças no teor de betacianinas totais e betaxantinas, possivelmente por terem desencadeado outros mecanismos de defesa que não foram estudados neste trabalho, ou até mesmo possuírem um mecanismo de tolerância. Foi documentado que a defesa ou tolerância à radiação UV-B pode ser relacionada com a indução de diversas vias de transdução de sinal, a produção de metabólitos secundários e também mecanismos de reparo do DNA [34, 35]. Além disso, as características químicas, quantidade de compostos e disponibilidade dos mesmos, variam nos diferentes tecidos vegetais, no mesmo tecido durante as fases de desenvolvimento e entre as espécies [36].

As vias biossintéticas das betalaínas (betacianinas totais e betaxantinas) consistem de várias etapas de reações químicas e enzimáticas, nas quais o ponto inicial é a formação de DOPA, catalisado pela enzima cúprica tirosinase [37]. Estudos sob o tempo de ativação de enzimas da rota biossintética das betalaínas como a tirosinase poderia trazer evidências mais concretas sob a ação da radiação UV-B nestes compostos.

O efeito da radiação UV-B na rota de biossíntese de flavonoides, ao contrário das betalaínas, é bastante documentada. A radiação UV-B tem sido fortemente relacionada com a regulação e biossíntese de enzimas chaves da rota de biossíntese dos flavonoides como fenilalanina amônia

liase (PAL) e chalcona sintase (CHS). Estudos demonstram que quando expostas à radiação UV-B, na maioria das plantas aumenta os níveis de transcrição destas enzimas [38]. Possivelmente, essa resposta está relacionada ao importante papel dos flavonoides como fotoprotetores. Pode-se inferir que o aumento na produção de flavonoides totais na espécie *A. sessilis* pode ter ocorrido devido à ativação pela radiação UV-B de enzimas chaves da rota.

Os resultados apresentados em diferentes tempos de exposição, tanto para betacianinas totais, betaxantinas e flavonoides, remetem a discussão sobre a interferência do tempo de exposição a radiação UV-B no acúmulo desses compostos. Em estudo com *M. crystallinum*, constataram que a acumulação de betacianinas totais em condições elevadas de radiação UV-B começou por volta do segundo dia de tratamento e atingiu a saturação após cinco dias de tratamento [12]. Em geral, o efeito da radiação UV-B sobre o metabolismo secundário de plantas é dependente da dose. No entanto, a dose real que é percebida pelos tecidos das plantas depende de uma série de fatores, entre eles a estrutura morfológica do órgão da planta [7].

No presente trabalho, os tempos de exposição ao UV-B com período de recuperação de 24 horas, induziu uma resposta maior na acumulação dos compostos estudados. Acredita-se que a percepção do sinal do elicitor inicia uma rede de transdução de sinal que leva à ativação de fatores de transcrição como um início da resposta e posterior expressão de genes envolvidos na produção de metabólito secundários [39]. Os compostos aqui estudados estão presentes nos compartimentos celulares das plantas. No entanto, na presença do elicitor, as plantas podem ter ativado genes envolvidos na rota de biossíntese das betacianinas e este mecanismo poderia induzir seu aumento com o passar do tempo o que justificaria os teores terem sido maiores nas plantas após o período de recuperação.

Estudos comprovam que os níveis de alguns metabólitos, incluindo antioxidantes, tais como ácido ascórbico, bem como os glicosinolatos, possuem uma regulação positiva em virtude da exposição à radiação UV-B [5]. Em contraste, para outros metabólitos, incluindo flavonoides, este

aumento é relativamente lento. É possível também que outros metabólitos apresentem uma resposta mais tardia [10, 26]. Evidências permitem sugerir que a dinâmica da resposta ao UV-B na acumulação de metabólitos secundários é um fator importante. A resposta a um determinado agente elicitor pode variar de espécie para espécie, e é crucial determinar as concentrações adequadas para otimizar a produção dos metabólitos de interesse [40].

A radiação UV-B tem o potencial para danificar macromoléculas, incluindo o DNA, para gerar espécies reativas de oxigênio (ERO), e prejudicam os processos celulares [41]. Pode-se supor que betalaínas e flavonoides, além da sua capacidade de absorção de UV, podem ter aumentado suas concentrações, atuando como potentes antioxidantes que rapidamente neutralizam os radicais. No entanto, a função antioxidante dos flavonoides é complexa e depende de uma variedade de fatores, incluindo o potencial redox, glicosilação e hidroxilação [42].

A atividade antioxidante foi maior nas espécies que apresentaram um incremento na produção dos metabolitos secundários estudados no presente trabalho, levando a inferir que o aumento da atividade antioxidante pode estar relacionado com o aumento da síntese de betalaínas e flavonoides, visto que estes compostos demonstram altos níveis de atividade antioxidante [19]. Da mesma forma a atividade antioxidante foi altamente correlacionada com o aumento de UV-B e conteúdo de flavonoides em frutos de maçã [43, 44]. No entanto, o aumento desta atividade antioxidante não é apenas determinado pelas concentrações de flavonoides e betalaínas, mas também relacionada com a indução da radiação UV-B de enzimas com propriedades eliminadoras de radicais livres, tais como as peroxidases [45].

CONCLUSÃO

Conclui-se que a ação elicitora da radiação UV-B é influenciada pelo tempo de exposição a ela e que quanto maior for esse tempo, seguido de um período de recuperação há incremento nos teores de betacianinas totais, betaxantinas, e flavonoides. No entanto, esta resposta difere entre as

quatro espécies do gênero *Alternanthera* sendo observado valores significativo nas espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana*.

REFERÊNCIAS

1. Zhang, W. J., Björn, L. O., The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants, Review, *Fitoterapia*, 2009, vol.80, pp.207–218.
2. Fowler, M. W., Plants, medicines and man, *Sci. Food. Agric*. 2006, vol.86, pp.1797-1804.
3. Dixon, R. A., Natural products and plant disease resistance, *Nature*, 2001, vol.411, pp.843−847.
4. Oksman-Caldentey, K. M., e Inze, D., Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites, *Trends Plant Sci.*, 2004, vol.9, pp.433−440.
5. Schreiner, M., Krumbein, A., Mewis, I., Ulrichsc, Huyskens-Keil, S., Short-term and moderate UV-B radiation effects on secondary plant metabolism in different organs of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.), *Innov. Food Sci. and Emerging Techno.*, 2009, vol.10, pp.93-96.
6. Kuhlmann, F., e Müller, C., Independent responses to ultraviolet radiation and herbivore attack in broccoli, *J. Exp. Bot.*, 2009, vol.60, pp.3467–3475.
7. Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M. A. K., Zrenner, R., Winkler, J. B., O'Brien, N., Krumbein, A., UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites – Potential Benefits for Plant and Human Health, Critical Reviews, *Plant Sci.*, 2012, vol.31, pp.229-240.
8. Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballaré, C. L., Flint, S. D., Kulandaivelu, G., Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, vol.6, pp.252–266.
9. Flint, S. D., Ryel, R. J., Caldwell, M. M., "Ecosystem UV-B experiments in terrestrial communities: A review of recent findings and methodologies", *Agricult Forest Meteorol.*, 2003, vol.120, pp.177-189.

10. Jansen, M. A. K., Hectors, K., O'brien, N. M., Guisez, Y., Potters, G., Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops? *Plant Sci.*, 2008 vol.175 pp.449-458.

11. Winkel-Shirley, B., Biosynthesis of flavonoids and effects of stress, *Curr. Opin in Plant Biol.*, 2002, vol.5, pp.218-223.

12. Ibdah, M., Krins, A., Seidlitz, H. K., Heller, W., Strack, D., Vogt, T., Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation, *Plant, Cell and Environ.*, 2002, vol.25, pp.1145-1154.

13. Sharma, A.; Guruprasad K. N. Similarities in the biochemical changes between solar UV exclusion and GA application in *Amaranthus caudatus*, *Physiol. Mol. Biol. Plants*., 2009, vol.15, n.4, pp.367-370.

14. Pavokovic, D., Krsnik-Rasol, M., Complex biochemistry and biotechnological production of betalains, *Food Technol. and Biotechnol.*, 2011, vol.49, pp.145-155.

15. Salvador, M. J., Dias, D. A., Flavone C-glycosides from *Alternanthera marítima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae), *Biochem Sys Ecol.*, 2004, vol.32, pp.107-110.

16. Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*., 1962, vol.15, pp.473-497.

17. Hoagland, D. R., Arnon, D. I., The water-culture method for growing plants without soil, *California Agricult. Experimen. Station Circ.*1938 n.347.

18. Machado, A, e Conceição, A. R., Programa estatístico Winstat-Sistema de Análise Estatístico para Windows, versão 2.0. *Pelotas, RS*, 2002.

19. Gandia-Herrero, F., Escribano, J., Garcia-Carmona, F., Betaxanthins as substrates for tyrosinase. An approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains, *Plant Physiol.*, 2005, vol.138, pp.421-432

20. Schliemann, W., Kobayashi, N., Strack, D., The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction, *Plant Phys.*, 1999, vol.119, pp.1217-1232.

21. Schwartz, S. J., Von Elbe, J. H., Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*1980, vol.28, pp.540-543.

22. Reis, A., Síntese de betalaínas induzida pela luz em espécies do gênero *Alternanthera*, 2013, *Dissertação, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal*. pp.102.

23. Brand-Wiliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *J. Food Sci Technol.* 1995, vol.28 pp. 25-30.

24. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, 2004, *J. Sci Technol*. vol.26, pp. 211-219.

25. Garcia, S. N. J., Cruz, M. V., Gonzalez, R. G. G., Pacheco, I. T., Hernandez, A. C., Perez A. F., Current Approaches for Enhanced Expression of Secondary Metabolites as Bioactive Compounds in Plants for Agronomic and Human Health Purposes a Review. Pol. *J. Food Nutr. Sci*., 2013, vol.63, pp.67-78.

26. Solovchenko, A. E., Merzlyak, M. N., Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants, *Russ J. Plant Physiol.*, 2008, vol.55, pp.719–737.

27. Hada, H., Hidema, J., Maekawa, M., Kumagai, T., Higher amounts of anthocyanins and UV-absorbing compounds effectively lowered CPD photorepair in purple rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell Environ.* 2003, vol.26, pp.1691-1701.

28. Frohnmeyer, H., Staiger, D., Ultraviolet-B radiation-mediated responses in pmplants, balancing damage and protection, *Plant Physiol.*, 2003, vol.133, pp.1420-1428.

29. Schmitz-Hoerner, R., Weissenböck, G., Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels, *Phytochemistry*, 2003,vol.64, pp.243-255.

30. Hashimoto, T., Chizuko S., Ultraviolet action spectra for the induction and inhibition of anthocyanin synthesis in broom sorghum seedlings, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1991, vol.2, pp.353-363.

31. Silva, P. F., Barfina, A., Eisei, F., Quina, F. H., Maçanita, A. L., Photoprotection and the photophysics of acylated anthocyanins, *Chem European J.*, 2012, vol.18, pp.3736-3744.

32. Vargas, D. F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O., Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalins-Characterstics, Biosynthesis, Processing and Stability, *Crit Rev in Food Sci and Nut.*, 2012, vol.40, pp.173-289.

33. Jackman, R. L., Smith, J. L., Anthocyanins and betalains. In: Natural food colourants (edited by G.F. Hendry & J.D. Houghton), *London: Blackie Academic Professional*., 1996, vol.1 pp. 244–309.

34. Brown, B. A., Cloix, C., Jiang, G. H., Kaiserli, E., Herzyk, P.,Kliebenstein, D. J., Jenkins, G. I., A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection, *PNAS*, 2005, vol.102, pp.18225–18230.

35. Ishibashi, T., Kimura, S., Furukawa, T., Sakaguchi, K., DNA repair mechanisms in UV-B tolerant plants, *Jpn Agricult. Research Quarterly*, 2006, vol.40, pp.107-113.

36. Mattson, W. J., Herbivory in relation to plant nitrogen content, *Annu. Rev. Ecol. Syst*. 1980, vol.11, pp.119-162.

37. Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A., Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant J., Malden*, 2008, vol.54, pp.733–749.

38. Greenberg, B. M., Wang, W., Gorsuch, J., Hughes, J. S., The effects of ultraviolet–B radiation on higher plants, *Plants for Environ. Stud.*, 1997, vol.1, pp.1–35.

39. Zhao, J., Davis, L. C., and Verpoorte, R., Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, *Biotechnol. Adv*. 2005, vol.23, pp.283–333.

40. Namedo, A. G., Plant cell elicitation for production of secondary metabolites, *Reviews Pharmacognosy*, 2007, vol.1, pp.69–79.

41. Jenkins, G. I., Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biol.*, 2009, vol.60, pp.407-431.

42. Mahdavian, K., Ghorbanli, M., Kalantari, M., The Effects of Ultraviolet Radiation on the Contents of Chlorophyll, Flavonoid, Anthocyanin and Proline in *Capsicum annuum* L. *Turk J. Bot*, 2008, vol.32, pp.25-33.

43. Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Bilger, W., Berge, A., Haffner, K., Solhaug, K. A., Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biol. Technol.* 2007, vol.45, pp.1-10.

44. Huyskens-Keil, S., Eichholz, I., Kroh, L. W., and Rohn, S., UV-B induced changes of phenol composition and antioxidant activity in black currant fruit (*Ribes nigrum* L.), *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2007, vol.81 pp.140-144**.**

45. Eichholz, I., Rohn, S., Gamm, A., Beesk, N., Herppich, W. B., Kroh, L. W., Ulrichs, C., Huyskens-Keil., UV-B-mediated flavonoid synthesis in white asparagus (*Asparagus officinalis* L.), *Int J. Food Technol.*, 2012, vol.48, pp.196-201.

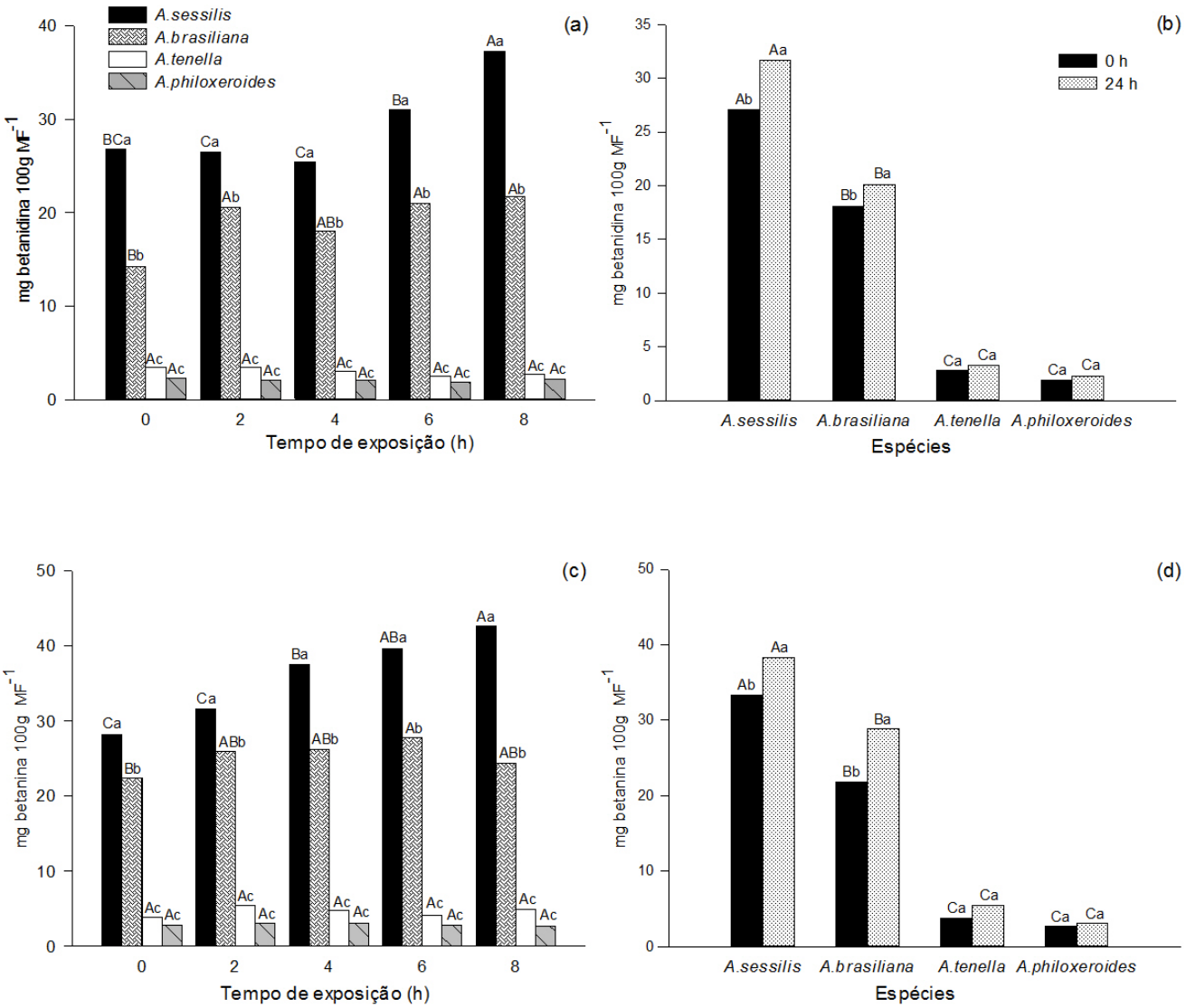

Fig. 1. Teor de betanidina (a) e de betanina (c) na parte aérea de quatro espécies do gênero *Alternanthera*, expostas à radiação UV-B durante 0, 2, 4, 6 e 8 horas e teor de betanidina (b) e de betanina (d) nas quatro espécies logo após a radiação (0 h) e após 24 h de recuperação. Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para tempo de exposição à radiação de cada espécie e minúsculas para espécie em cada tempo (a, c). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para espécie nos diferentes períodos de recuperação e minúscula para recuperação dentro de cada espécie (b, d), de acordo com o teste de Tukey ($p<0.05$). MF= massa fresca.

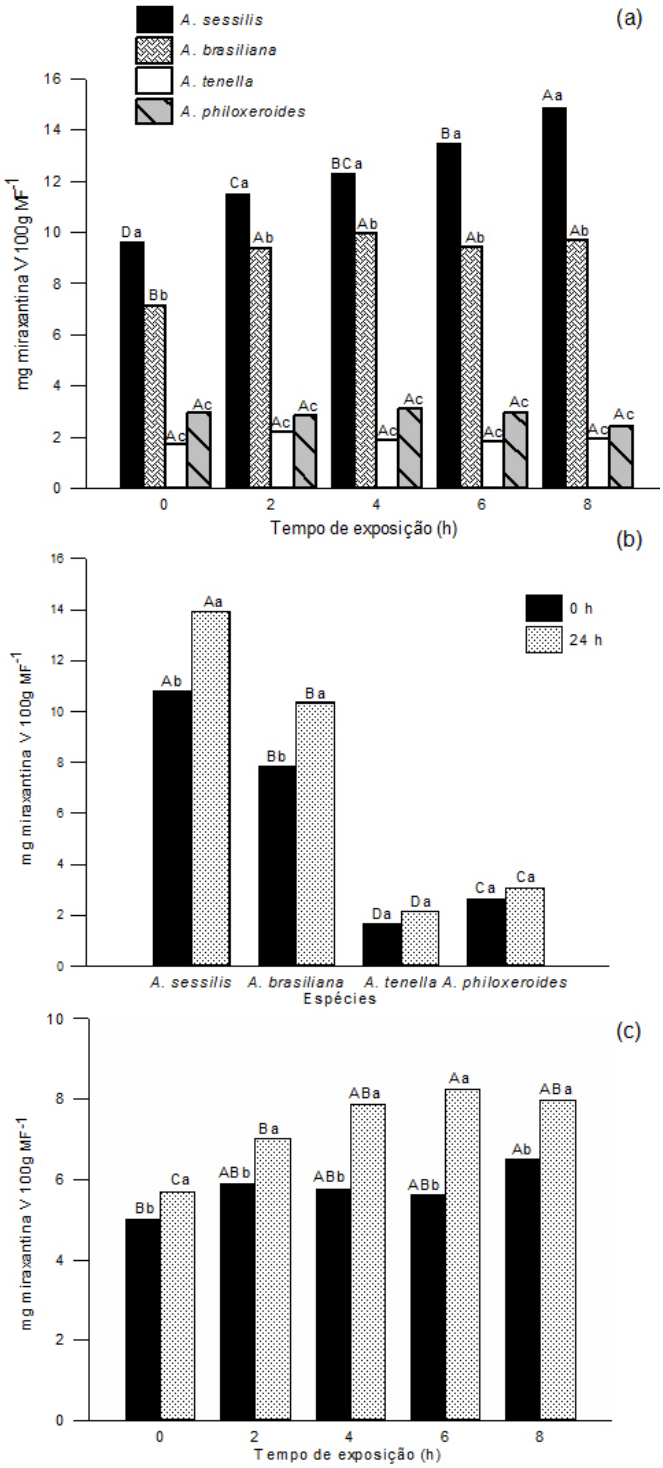

Fig. 2. Teor de betaxantinas totais da parte aérea de quatro espécies do gênero *Alternanthera*, expostas à radiação UV-B durante 0, 2, 4, 6, e 8 horas (a); Teor de betaxantinas totais nas diferentes espécies logo após a radiação (0 h) e após 24 h de recuperação (b) e teor de betaxantinas totais nos diferentes tempos de exposição: logo após a radiação (0 h) e após 24 h de recuperação (c). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para tempo de exposição e letras minúsculas diferem entre si para espécie (a); Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para espécie e letras minúsculas diferem entre si para o período de recuperação (b). Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si para tempo de exposição e letras minúsculas diferem entre si para o período de recuperação (c) de acordo com o teste de Tukey ($p<0.05$). MF= massa fresca.

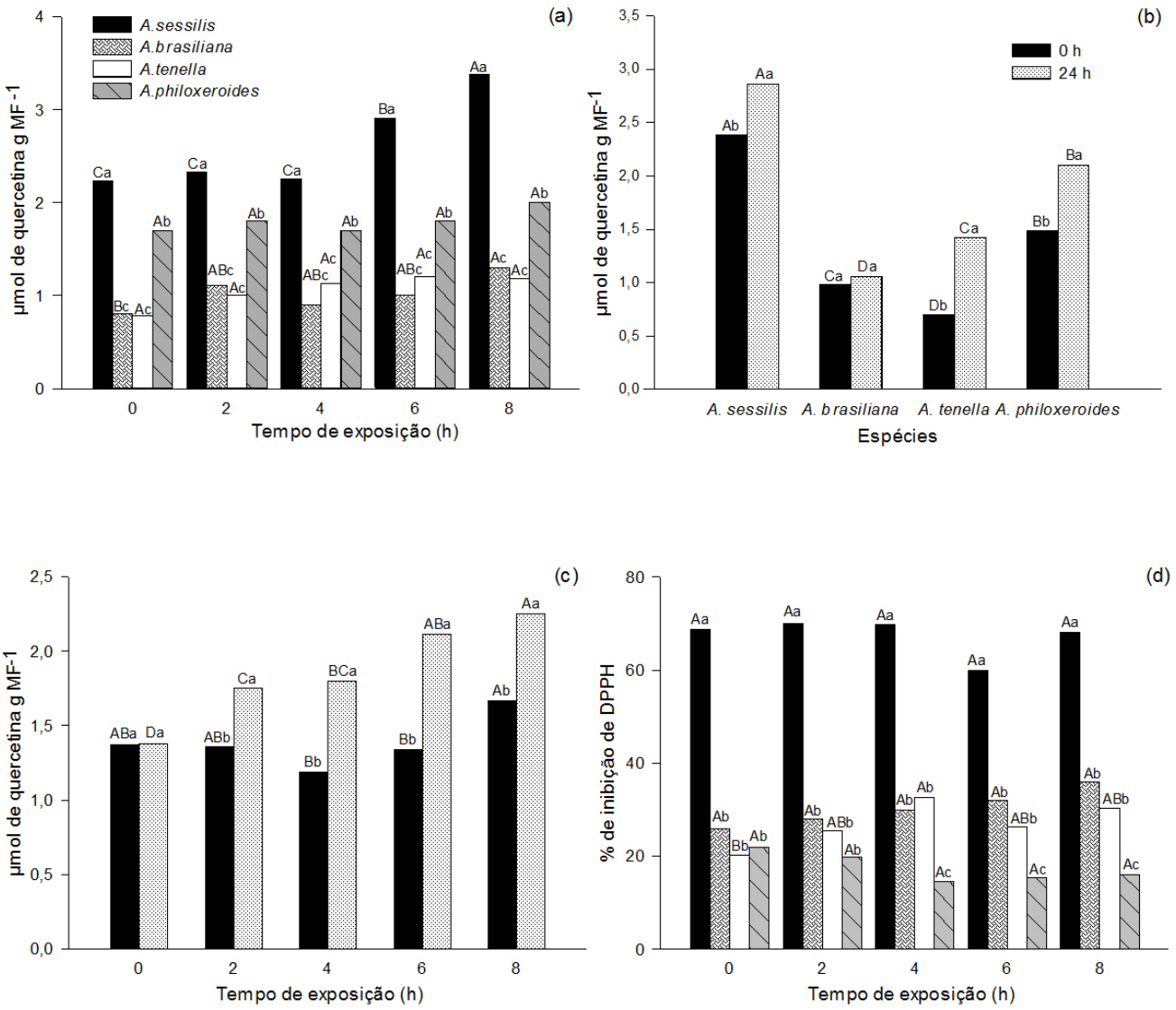

Fig. 3. Teor de flavonoides totais e atividade antioxidante da parte aérea de quatro espécies do gênero *Alternanthera*, expostas à radiação UV-B durante 0, 2, 4, 6 e 8 horas (a, d); teor de flavonoides totais em quatro espécies logo após a radiação UV-B (0 h) e após 24 h de recuperação (b). Teor de flavonoides totais nos diferentes tempos de exposição espécies logo após a radiação UV-B (0 h) e após 24 h de recuperação (c). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para tempo e letras minúsculas diferem entre si para espécie (a, d). Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para espécie e letras minúsculas diferem entre si para o período de recuperação (b). Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre si para tempo de exposição e letras minúsculas diferem entre si para período de recuperação (c) de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$). MF= massa fresca; DPPH=2,2-difenil-1-picril-hidrazil.

ARTIGO 2-African Journal of Agricultural Research (AJAR) (ISSN 1991-637X)

Atividade antioxidante em plantas do gênero *Alternanthera* após exposição à radiação UV-C

Resumo

A radiação UV-C interfere em processos fisiológicos das plantas. Respostas de incremento de metabólitos secundários como os flavonoides e betalaínas, bem como atividades enzimáticas, podem esclarecer o comportamento de plantas diante da radiação. O objetivo deste estudo foi analisar as possíveis alterações no metabolismo de plantas de *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC, *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera philoxeroides* (Mart.). Grisebach, quando expostas a diferentes tempos de exposição à radição UV-C. Plantas provenientes do cultivo *in vitro* foram aclimatizadas em casa de vegetação durante 60 dias e posteriormente foram expostas durante 0, 5, 10, 15 e 20 minutos à radiação UV-C. Análises bioquímicas da produção de betanidina, betanina, betaxantinas, flavonoides totais e a resposta de enzimas antioxidantes em decorrência da exposição à radiação UV-C, foram realizadas ao final deste estudo. Os resultados mostraram que houve incremento destes compostos do metabolismo secundário na espécie *A. sessilis*, e os valores máximos foram alcançados após 10 e 12 minutos de exposição. A espécie *A. brasiliana* apresentou aumento do conteúdo de betanina após 16 minutos de exposição. Para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), não houve diferença significativa entre as espécies nos diferentes tempos de exposição e para catalase (CAT), a espécie *A. philoxeroides* mostrou maior atividade, diferindo significativamente das demais. Foi observado também para essa espécie maior atividade da ascorbato peroxidas (APX) aos 20 minutos de exposição à radiação UV-C. O conteúdo de manolildialdeído (MDA) aumentou em *A. philoxeroides* e *A. sessilis* diante da radiação UV-C. Conclui-se que as espécies estudadas acionam mecanismos de proteção diferentes diante da radiação UV-C.

Palavras chave: *estresse abiótico, flavonoides, betalaínas, mecanismos de defesa, estresse oxidativo.*

Antioxidant activity in plants of genus *Alternanthera* after UV-C radiation exposure

Abstract

The UV-C radiation interferes with the physiological processes of the plants. The increment of secondary metabolites such as flavonoids and betalains, as well as enzymatic activities, can explain the behavior of plants exposed to radiation. The objective of this study was to analyze the possible changes in the metabolism of plants of *Alternanthera sessilis* (L.) R. Br. ex DC, *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, and *Alternanthera philoxeroides* (Mart.). Grisebach, when exposed to different periods of UV-C radiation. Plants from *in vitro* culture were acclimatized in greenhouse for 60 days before they were exposed to UV-C radiation for 0, 5, 10, 15, and 20 minutes. Biochemical analyses of production of total betanidin, betanin, betaxanthins, flavonoids, and the response of antioxidant enzymes as a result of exposure to UV-C radiation were performed at the end of this study. The results showed that there was an in increment of these secondary metabolism compounds in the species *A. sessilis*, and the maximum values were achieved after 10 and 12 minutes of exposure. The species *A. brasiliana* showed increased betanin content after 16 minutes of exposure. For the enzyme superoxide dismutase (SOD) there was no significantly difference among the species in the different periods of exposure; for catalase (CAT), the species *A. philoxeroides* showed greater activity, differing significantly from the other species. We also observed greater activity of ascorbate peroxidase (APX), for this species, at 20 minutes of UV-C radiation exposure. Malondialdehyde (MDA) content increased in *A. philoxeroides* and *A. sessilis,* because of UV-C radiation. We concluded that the species studied trigger different mechanisms of protection before UV-C radiation.

Keywords: abiotic stress, flavonoids, betalains, protection mechanisms, oxidative stress.

Introdução

A radiação ultravioleta (UV) é uma pequena parte da radiação solar que atinge a superfície da Terra, mas com impacto biológico significativo sobre os organismos vivos, incluindo as plantas. De acordo com a Comissão Internacional de Iluminação, o comprimento de onda nesta região é dividido em UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-C (200-280 nm) (Katerova et al., 2009).

O efeito negativo da radiação UV é maior, quanto mais curto for o comprimento de onda. Portanto, devido à sua maior energia, a radiação UV-C provoca rapidamente altos níveis de lesões e é mais prejudicial para os organismos vivos (Hollósy, 2002; Katerova, 2012). Por outro lado, baixas doses de UV-C pode desencadear respostas de aclimatização em plantas, incluindo a ativação de sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos (Jansen et al., 2008; Lavola et al., 2003; Katerova et al., 2009; Katerova e Todorova, 2009; Katerova e Todorova, 2011; Rai et al., 2011).

Nas plantas, uma resposta comum a condições ambientais desfavoráveis é a ocorrência de estresse oxidativo com aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Mewis et al., 2012). Com isso, as plantas podem ativar enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), que irão mitigar os danos induzidos por UV-C (Rai et al., 2011). Outros mecanismos de defesa responsáveis por uma diminuição de radicais livres são os pigmentos fotoprotetores como compostos fenólicos, como os flavonoides e betalaínas (Solovcheco e Merzylak, 2008). Os flavonoides formam um grupo com uma vasta gama de funções biológicas incluindo papeis na proteção ao estresse.

As betalaínas são pigmentos nitrogenados solúveis em água. Elas podem ser divididas pela sua estrutura em dois grandes grupos: betacianinas (vermelho-violeta) e betaxantinas (amarelo) (Cai et al., 2005). As betacianias podem ainda ser classificadas pelas suas estruturas químicas como, por exemplo, em glicosiladas (betanina) e agliconas (betanidinas) (Gandia-Herrero et al., 2010).

O gênero *Alternanthera* Forsk. (Amaranthaceae), composto por 80 espécies de plantas, sendo 30 delas encontradas em território brasileiro, é caracterizado pela presença de flavonoides e betalaínas, pigmentos sugeridos substituir as antocianinas nas espécies da ordem Caryophyllales (Brochado et al., 2003; Salvador e Dias, 2004; Salvador et al., 2006; Brockington et al., 2011).

Estudos anteriores demonstraram que a exposição de espécies do gênero *Althernanthera* a radiações ultravioletas (Rudat e Göring, 1995; Silva et.al., 2005; Sharma e Guruprasad, 2009), interfere na produção de pigmentos fotoprotetores como betacianinas e flavonoides. Apesar de já ter estudos relatando o efeito da radiação UV-C no metabolismo secundário de algumas plantas (Rai et al., 2011), a radiação UV-C não foi estudada nas plantas medicinais de *Alternanthera sessilis* (L.), *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb.

Essas espécies são conhecidas por serem utilizadas na medicina popular devido à atividade antiviral, antimicrobiana, hepatoprotetora, antifúngica, anti-diarréica e analgésica de seus extratos (Ferreira et al., 2003).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo, foi avaliar a influência da radiação UV-C sobre a produção de metabólitos secundários e a atividade de

enzimas antioxidantes de três espécies medicinais do gênero *Alternanthera*: *A. sessilis*, *A. brasiliana* e *A. philoxeroides.* Para isto, investigou-se nessas espécies, o efeito fotoprotetor de flavonoides, betacianinas totais e de betaxantinas, e a resposta de enzimas antioxidantes em decorrência da exposição ao UV-C.

Material e métodos

Material vegetal e condições de cultivo

Plantas de *A. sessilis*, *A. brasiliana* e *A. philoxeroides*, estabelecidas por 30 dias *in vitro*, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), sem regulador de crescimento, no Banco de Plantas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) foram aclimatizadas durante 60 dias em casa de vegetação. Para isso, as plantas retiradas do meio de cultura tiveram suas raízes lavadas em água corrente, buscando retirar qualquer vestígio de meio, e foram transferidas, individualmente, para copos plásticos, contendo vermiculita como substrato. A irrigação das plantas foi realizada a cada dois dias com solução nutritiva de Hogland 50 % (Hoagland e Arnon, 1938) até completarem 60 dias em casa de vegetação. Após esse período, plantas com 10 a 15 pares de folhas foram submetidas à radiação UV-C por 0 (sem exposição- controle), 5, 10, 15, 20 minutos. Para isso foi utilizado câmara UV-C com lâmpadas Philips TUV-C 30 W/G30T8 Holland 254 nm, a uma distância de 35 cm das plantas, correspondendo a uma radiação de 1,7; 3,5; 5,2 e 6,9 Kj m^{-2} dia^{-1}, respectivamente. A radiação foi medida com radiômetro, marca *Instrutherm Instrumentos de Medição* LTDA, modelo MRUR-203, na parte superior da copa das plantas.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com esquema fatorial 3x5, sendo três espécies e cinco tempos de exposição à radiação UV-C. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma planta, totalizando 75 plantas. Para a atividade enzimática e peroxidação lipídica o esquema fatorial foi 3x2, sendo três espécies e dois tempos de exposição à radiação UV-C (0 e 20 min de exposição). Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma planta, totalizando, neste caso, 30 plantas. O material coletado foi armazenado em ultrafreezer a -80 ºC para posteriores análises bioquímicas.

Os resultados para betacianinas totais, betaxantinas e flavonoides foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial, com auxílio do software estatístico WinStat. O ponto de máxima de cada curva foi calculado pelos coeficientes da equação de 2º grau (-b/2a). Os dados de enzimas e peroxidação lipídica foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico WinStat (Machado e Conceição, 2002).

Análises bioquímicas

Quantificação de betacianinas totais

Para a extração de betacianinas totais, em virtude de serem indicados diferentes tampões para extração de betacianinas totais, nas quais o tampão fosfato de potássio (pH 6,0) favorece a extração de betanina e betaxantinas enquanto que o tampão acetato/metanol (pH 5,0) é ideal para estabilizar a betanidina (Gandia-Herrero et al., 2005, 2007, 2010).

Desta forma, para a extração das betanidina e betanina, foi realizada com dois tipos diferentes de tampão extrator. Para betanidina optou-se por utilizar tampão acetato 10 mM e metanol (70/30 %) e, acrescido a essa solução, ascorbato de sódio numa concentração de 10 mM. Para betanina a extração foi efetuada utilizando tampão fosfato 10 mM, pH 6,0, acrescido de ascorbato de sódio 10 mM, sem adição de solvente orgânico. Para as duas análises utilizou-se 125 mg de massa fresca da parte aérea, que foram maceradas em almofariz e o estratofiltrado em gaze e centrifugado a 10000 g, por 20 min, a 4 ºC como descrito por Gandia-Herrero et al. (2007). O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo de betanidina foi de ϵ= 54000M^{-1} cm^{-1} e para betanina foi de ϵ= 65000M^{-1} cm^{-1}, conforme relatado por Schwartz e Von Elbe (1980), em um comprimento de onda de 536 nm. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS modelo Ultrospec 7000 marca Ge Healthcare.

Quantificação de Betaxantinas

Para a extração de betaxantinas foram utilizados 125 mg de massa fresca da parte aérea as quais foram maceradas em almofariz com tampão fosfato 10mM, pH 6,0, acrescido 10mM de ascorbato de sódio. O homegeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 10000 g, por 20 min, a 4 ºC conforme metodologia já descrita por Gandia-Herrero et al. (2005). A concentração de betaxantina foi determinada levando em consideração o coeficiente de extinção molar para miraxantina ϵ=48000M^{-1} cm^{-1}, em comprimento de onda de 480 nm e o resultado foi expresso em mg de miraxantina 100g MF^{-1} (Schliemann et al., 1999).

Quantificação de Flavonoides

O teor de flavonoides também foi realizado utilizando tampão acetato/metanol como solvente extrator. As determinações de flavonoides foram expressas em µmol de quercetina por grama de massa fresca. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, conforme descrito anteriormente em 330 nm (Gandia-Herrero et al., 2007; Reis, 2013).

Atividade Enzimática

Para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD, EC1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC1.11.1.11) e catalase (CAT, EC1.11.1.6), foram pesadas aproximadamente 200 mg de massa fresca da parte aérea e homogeneizados em 2,5 mL no tampão de extração contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 *g* por 10 min a 4 ^{o}C e o sobrenadante coletado para determinar a atividade das enzimas.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) conforme Giannopolitis, Ries (1977) em um meio de reação composto por fosfato de potássio 50 mM (pH.7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM . Os tubos com o meio de reação e a amostra (100 µL para *A. sessilis* e 50 µL para as demais), completando volume final de 2 mL, foram iluminados por sete minutos em uma caixa adaptada com lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação, porém sem a amostra foi iluminado e, como branco, foi utilizado um tubo com meio de reação mantido no escuro, também utilizado para zerar o espectrofotômetro. As leituras foram realizadas a 560 nm.

Uma unidade da SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50 % a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998) com modificação, onde o autor descreve que a atividade foi monitorada por 2 minutos. Neste trabalho a atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 1,5 minutos em meio de reação (volume do extrato de 100 µL para *A. sessilis* e de 50 µL para as demais, totalizando 4 mL de volume final) incubado a 28 °C, contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e 12,5 mM de H_2O_2.

A atividade da APX foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H_2O_2 0,1 mM (volume do extrato de 100 µL para *A. sessilis* e de 50 µL para as demais, totalizando 4 mL de volume final).

Determinação do conteúdo de malonildialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada a partir de protocolo descrito por Velikova et al. (2000) utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA) que determina MDA como produto final da peroxidação lipídica. Aproximadamente 300 mg de massa fresca da parte aérea foi homogeneizada em 2,5 mL de ácido tricloacético (TCA) 0,1 % (p/v). Este foi centrifugado a 12000 *g* por 15 minutos a uma temperatura de 4ºC. Para a espécie *A. sessilis* foi preparado um meio de reação utilizando 200 µL do sobrenadante acrescido de 300 µL de TCA 0,1 % e também 1 mL de uma solução contendo 0,5 % (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10 % (p/v) de TCA. Para as demais espécies, além de 1mL de 0,5 % (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10 % (p/v) de TCA foram utilizados 400 µL

de sobrenandante acrescentando 100 µL de TCA 0,1 % totalizando 1,5 mL na reação.

Após o preparo da reação as amostras foram incubadas em banho-maria a 90 ºC durante 20 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em mmol de Malonaldeído (MDA) por grama de massa fresca e o coeficiente de extinção molar utilizado para calcular foi 155 mM^{-1} cm^{-1}.

Resultados

Quantificação de Betanidina, Betanina, Betaxantinas e Flavonoides totais

Os valores obtidos para as variáveis betanidina, betanina, betaxantina e flavonoides totais, para as três espécies em estudo, quando submetidas a diferentes tempos de exposição à UV-C, estão representados na Figura 1. Observou-se que os teores de betanidina são maiores para a espécie *A. sessilis*, em comparação com as demais, sendo que o tempo de 9,8 minutos foi o que apresentou o valor máximo. Nesse intervalo de tempo ocorreu um aumento de 42 % em relação ao controle (tempo zero), totalizando 29,4 mg de betanidina por 100 g de massa fresca. Para as espécies *A. brasiliana* e *A. philoxeroides* não houve diferença significativa nos teores de betanidina em função dos tempos de exposição à radiação. O maior valor encontrado para essas espécies foram 19,6 e 2,7 mg (20 e 15 min) de betanidina por 100 g de massa fresca, respectivamente (Fig. 1A).

Os níveis de betanina em função da exposição à radiação UV-C mostraram interação significativa entre tempo e espécie (Fig. 1B). Dentre as espécies estudadas, *A. sessilis* foi a que apresentou maior teor de betanina (25

mg de betanina por 100 g de massa fresca), estimada em 12 minutos de exposição à radiação UV-C, aumento esse que corresponde a 61 % em relação ao controle. Quando comparado com o controle, na espécie *A. brasiliana* houve um incremento de 44 % na produção de betanina até o tempo estimado de 14 min, atingindo valor máximo de 23 mg de betanina por 100 g de massa fresca, enquanto na espécie *A. philoxeroides* não houve um aumento significativo em relação ao tempo de exposição, onde o valor máximo estimado foi de 2,6 mg de betanina por 100 g de massa fresca.

Figura 1 (aqui)

No presente estudo verificou-se que o teor de betaxantinas (Fig.1C) não alterou em relação ao aumento do tempo de radiação nas espécies *A. brasiliana* e *A. philoxeroides*, permanecendo com teores médios de 6,0 e 2,0 mg de betaxantinas por 100 g de massa fresca, respectivamente. Já para *A. sessilis*, os níveis de betaxantinas aumentaram gradualmente, com o aumento da radiação até atingir 12 minutos onde foi estimado 10,7 mg de betaxantinas por 100 g de massa fresca. Este valor correspondeu a um incremento de 72 % na produção deste composto em relação ao controle.

Os valores médios de flavonoides totais analisados de plantas tratadas com UV-C indicam que a exposição à radiação resultou em uma interação significativa para tempo e espécie (Fig. 1D). Foi encontrada uma maior quantidade de flavonoides totais em *A. sessilis* aos 11 minutos de exposição onde se estimou 1,56 µmol deste composto por grama de massa fresca. O aumento neste intervalo de tempo foi 79 % em relação ao controle. As espécies *A. brasiliana* e *A. philoxeroides* apresentaram conteúdo máximo estimado entre 0,7 e 0,6 µmol de flavonoides totais por grama de massa fresca, no entanto

estes resultados não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tempos.

Identificou-se que os maiores teores dos metabólitos estudados encontram-se na radiação incidida no intervalo entre 10 e 12 minutos (3,8 e 4,1 Kj m^{-2} dia^{-1}, respectivamente) para a espécie *A. sessilis*. Comparando os conteúdos de betanidina, betanina, betaxantinas e flavonoides totais na espécie A. *sessilis*, em relação à *A. brasiliana* observou-se incremento de 50 %, 8,7 %, 78 % e 122 %, respectivamente, enquanto que em relação à *A. philoxeroides* a diferença é maior. Em *A. sessilis é* constatado que houve pequena redução do conteúdo desses metabólitos, após 12 minutos de exposição à radiação.

Atividade das enzimas SOD, CAT, APX e Peroxidação Lipídica

Para a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), não houve interação significativa entre as fontes de variação testadas. Os maiores valores da atividade da enzimas SOD são verificados em *A. brasiliana* (94,86 mg^{-1} Prot. no tempo zero e 93,08 mg^{-1} Prot. no tempo de 20 minutos) os quais não diferem estatisticamente das demais espécies (Fig. 2A).

A atividade da enzima CAT na espécie *A. philoxeroides*, foi superior as demais espécies, independente de estar submetido à radiação ou não, sendo o valor 190 % maior que o de *A. sessilis* e foi de 297 % superior do que o de *A. brasiliana.* Quando comparada com o controle a exposição de 20 min não apresentaram diferenças significativas nas espécies estudadas (Fig. 2B).

Para a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi observada interação significativa entre os fatores em estudo, sendo que a espécie *A. philoxeroides* foi a que apresentou maior atividade (25,8 µmol ASA min^{-1} mg^{-1}

Prot.) após 20 min de exposição à radiação. Este valor difere significativamente de *A. sessilis* (10,13 µmol ASA min^{-1} mg^{-1} Prot.) e *A. brasiliana* (13,6 µmol ASA min^{-1} mg^{-1} Prot.), após 20 min de radiação correspondendo a aumentos de 154 % e 89 %, maior respectivamente (Fig. 2C).

No presente estudo exceto para a espécie *A. brasiliana*, os danos às membranas celulares devido à radiação UV-C foi evidente pelo aumento do MDA celular, que é um produto secundário do processo de peroxidação. A diferença de MDA entre as espécies foi significativa, sendo a que apresentou maior conteúdo foi *A. philoxeroides* (27,7 mmol g MF^{-1}), seguida por *A. sessilis* (13,96 mmol g MF^{-1}) e *A. brasiliana* (2,4 mmol g MF^{-1}), após 20 min de radiação. Este aumento em *A. philoxeroides* aos 20 minutos correspondeu a 98 % a mais do encontrado em *A. sessilis* e *A. brasiliana*.

Quando se comparou o efeito da radiação aos 20 min em relação ao controle, sem radiação, observou-se incremento significativo de 57 % em *A. philoxeroides* e de 72 % em *A. sessilis* para o teor de MDA celular. Já para a espécie *A. brasiliana* não houve aumento significativo nas plantas irradiadas em relação às não irradiadas (Fig. 2D).

Figura 2 (aqui)

Discussão

A exposição à radiação UV-C pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). Para sua proteção as plantas podem ativar mecanismos enzimáticos e não enzimáticos que são fundamentais na prevenção de danos oxidativos. Antioxidantes solúveis em água, incluindo flavonoides, antocianinas e betalaínas são agentes não-enzimáticos para a eliminação de ERO (Jansen et al., 2008; Sharma e Guruprasad, 2009).

De acordo com os resultados obtidos nas condições deste experimento a espécie *A. sessilis* aumentou o conteúdo de betacianinas totais (betanidina e betanina) e betaxantinas diante da radiação UV-C nos diferentes tempos. Incremento da quantidade de betacianinas sob condições de radiação aumentada já é relatado por outros autores que trabalharam com as espécies *Mesembryanthemum crystallinum* L., *Chenopodium quinoa* Willd, e *Amaranthus caudatus* L. (Ibdah et al., 2002; Htlal et al., 2004; Sharma e Guruprasad, 2009), todas pertencentes a mesma família do gênero *Alternanthera*.

A espécie *A. philoxeroides* foi a que apresentou menor quantidade de betanidina, betanina e betaxantinas. No entanto, diante de outros elicitores como a tirosina o aumento de betacianinas totais foi proporcional a maior concentração de tirosina em plantas de *A. philoxeroides* cultivadas *in vitro* durante 40 dias que apresentaram conteúdo de betacianinas totais em folhas maiores do encontrado neste trabalho (15, 32 mg por 100 grama de massa fresca) (Kleinovski et al., 2013).

O baixo conteúdo de betacianinas totais e betaxantinas encontrados em *A. philoxeroides* podem ser explicados pela dose de radiação, a qual devido a aspectos morfológicos como, por exemplo, o tamanho de folhas pode ter desencadeado respostas diferentes em plantas de *A. philoxeroides.* Em geral o efeito da radiação sobre metabólitos secundários é dependente da dose, e a dose real que é percebida pelos tecidos das plantas depende de uma série de fatores, tais como a estrutura morfológica da planta, aspectos genéticos e bioquímicos das plantas (Schreiner et al., 2009; Schreiner et al., 2012). Além disso, tem sido documentado que as plantas respondem diferentemente ao tempo de exposição ao UV (Frohnmeyer e Staiger, 2003).

A luz UV-C produz fótons que podem ser absorvidos por moléculas orgânicas, como betalaínas, que possuem ligações conjugadas e anéis aromáticos responsáveis pela cor (Woo et al., 2011). Na presença da luz UV-C esses pigmentos podem ter sido degradados, o que poderia explicar a redução no teor destes pigmentos aos 20 minutos de exposição na espécie *A. sessilis*. Guerrero-Beltrán et al. (2009) relataram que tratamentos com luz UV-C em frutas provocaram reações de descoloração dos pigmentos.

Além da ação destes pigmentos na absorção da radiação UV, estudos anteriores demonstraram também a capacidade que as betalaínas possuem na eliminação de radicais livres, agindo como compostos antioxidantes (Kanner, 2001; Cai et al., 2003). A relação entre a estrutura e a atividade química das betalaínas é que a ação eliminadora de radicais livres geralmente aumenta com o número de grupos hidroxilas e da glicosilação de moléculas de betalaínas agliconas (betanidina).

A posição C-5 de grupos hidroxila em moléculas de betalaínas melhora significativamente a atividade antioxidante (Cai et al., 2005). Neste sentido, pode-se presumir que as diferentes espécies podem modificar a estrutura dos compostos como resultado da exposição à radiação UV-C, o que justificaria os resultados estimados para betanina (betacianina glicosilada) terem sido maiores em *A. sessilis* e *A. brasiliana* neste estudo, onde a planta estaria buscando uma maior defesa contra o estresse.

Dentre os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, destacam-se os flavonoides (Apel e Hirt, 2004). Absorção característica na região do UV de flavonoides tem sido considerada como evidência para o papel deles na proteção UV (Winkel-Shirley, 2002).

Trabalhos mostram evidências de que em *Petúnia leaves* (petúnia) e *Arabidopsis* a luz UV-C induz a síntese de flavonoides com elevados níveis de hidroxilação. A hidroxilação não afeta as propriedades de absorção de UV destes compostos, mas afeta a sua capacidade antioxidante, na resposta ao estresse por UV (Ryan et al., 2002). As plantas de *A. sessilis* podem ter ativado um mecanismo de defesa aumentando os pigmentos não fotossintéticos. Estes compostos podem estar atuando removendo oxigênio singleto produzido em processos oxidativos de fótons.

Certa quantidade de flavonoides totais e betalaínas estavam presentes em plantas controle de *A. sessilis*, porém, diante da radiação UV, ocorre aumento na biossíntese desses compostos, intensificando a atividade de eliminação de ERO (espécies reativas de oxigênio) e as propriedades de blindagem à radiação UV (Jansen et al., 2008).

Estudos anteriores mostraram que pigmentos fotoprotetores possuem uma alta fotoestabilidade (Merzlyak e Solovchenko, 2002; Wang et al., 2003). Por conseguinte, uma “tela fotoprotetora” poderia ser formada nas plantas com uma despesa mínima de energia, possibilitando uma proteção natural a longo prazo (Pietrini et al., 2002). Plantas com uma boa eficiência deste mecanismo é menos afetada por estresses ambientais (tais como radiação UV), reduzindo a necessidade dos sistemas enzimáticos em fornecer um nível adequado de proteção (Hoch et al., 2003). Os resultados deste experimento mostraram que as espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana* possuem maior quantidade de pigmentos e menor atividade enzimática. O que leva a presumir que as betacianinas, betaxantinas e os flavonoides poderiam estar atuando como uma barreira de defesa natural nestas espécies.

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que remove radicais superóxido em O_2 e H_2O_2, reduzindo os danos nas células e tem sido apontada como uma defesa essencial contra a potente toxicidade do oxigênio (Chakraborty et al., 2009). Estudos anteriores demonstraram que a atividade da SOD sob exposição à radiação UV-C não aumentou durante dois dias de exposição em *Brassica oleraceae* L. var. alboglabra (Chairat et al., 2013).

No presente trabalho, a enzima SOD não aumentou sua atividade diante da radiação. O fato da enzima SOD não ter aumentado a sua atividade pode estar relacionado com o não aumento do substrato desta enzima diante da radiação UV-C. Além disso, os flavonoides presentes nessas plantas também eliminam radicais superóxido (Apel, Hirt, 2004).

A catalase (CAT) é uma enzima comum encontrada em organismos vivos. Suas funções incluem catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Chakraborty et al., 2009). O fato desta enzima ter uma característica constitutiva, ou seja estar presente mesmo em plantas que não estão submetidas ao estresse, explica a sua maior atividade em plantas controle de *A. philoxeroides*, podendo ser uma defesa natural desta planta. Aqui pode se inferir que a proteção natural contra o estresse oxidativo em *A. sessilis* e *A. brasiliana* são os pigmentos fotoprotetores e em *A. philoxeroides* esta proteção se da por meio da atividade enzimática.

Um fator importante na atividade antioxidante é a afinidade das enzimas pelo substrato. Enquanto a CAT tem uma baixa afinidade pelo H_2O_2, sendo ativa somente quando este está em altas concentrações, ou seja, quando o estresse é mais severo, a APX e outras peroxidases, que também eliminam o H_2O_2, tem alta afinidade, eliminando o H_2O_2 quando em baixas concentrações.

Além disso, a CAT atua nos peroxissomos, enquanto a APX atua basicamente nos cloroplastos e paredes celulares (Gechev et al., 2006; Jaleel et al., 2009).

Ascorbato peroxidase (APX) é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons. O H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) produzido pelo metabolismo aeróbico e em situações de estresse biótico ou abiótico (Ribeiro, 2012).

Maior expressão da APX em plantas tem sido demonstrada durante as diferentes condições de estresse (Thind e Goyal, 2012). Barka (2001) verificou que a radiação UV-C na dose de 3,7 kJ m^{-2} em frutos de tomate, aumentou a atividade de ascorbato peroxidase, enquanto que a atividade da catalase permaneceu inalterada. Em estudo com calos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) Zacchini e Agazio (2004) relataram que a atividade de APX foi aumentada, 24 h após a irradiação UV-C, sendo que o mesmo não ocorreu com a atividade da CAT. Estes resultados estão de acordo com os encontrados neste trabalho para a espécie *A. philoxeroides*.

Um aumento na atividade total de APX observado neste estudo reforça a importância desta enzima na proteção de danos causados por espécies reativas de oxigênio. A maior atividade desta enzima sob crescentes níveis de UV-C pode resultar em uma melhor proteção contra ERO, por diminuir os níveis de H_2O_2. A exposição de plantas à radiação UV-C pode ter induzido aumento de peróxido de hidrogênio que é formado principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias e estes poderiam se difundir para o citosol e então serem eliminados por APX que é uma enzima citosólica (Saurabh et al., 2011).

Pode-se inferir também que a atividade das enzimas está relacionada com o tempo de exposição à radiação UV-C. De acordo com Li et al. (2007), a atividade de diferentes enzimas antioxidantes sob radiação UV-C em plantas de trigo (*Oryza sativa*) e ervilha (*Pisum sativum*) primeiro aumentou, mas reduziu significativamente com o aumento do tempo de exposição. A resposta demonstra que a ação da radiação UV-C sob a atividade enzimática varia em diferentes espécies de plantas, o que foi observado nas espécies estudadas.

Mesmo diante das defesas acionadas pelas plantas quando expostas à radiação UV-C, radicais livres podem iniciar a peroxidação lipídica, que conduz a danos na membrana (Sreenivasulu et al., 2007). No presente estudo, observou-se um aumento no conteúdo de MDA em *A. sessilis* e *A. philoxeroides*. Nesse sentido Du et al. (2003) também relataram um aumento no conteúdo de MDA em *Taxus cuspidata* expostos à radiação UV-C.

Os radicais hidroxila e oxigênio singleto podem reagir com os lipídios e formar hidroperóxido (Hollósy, 2002; Blokhina et al., 2003). Os radicais peróxidos de hidrogênio podem abstrair de outros ácidos graxos insaturados, levando a uma reação em cadeia da peroxidação. A peroxidação dos lipídios da membrana leva à quebra de sua estrutura e função (Hollósy, 2002). Mudança no conteúdo de MDA é uma evidência no presente estudo de que a radiação UV-C induziu estresse oxidativo com maior intensidade em *A. philoxeroides*.

No presente trabalho, o aumento de MDA em *A. sessilis* pode ser explicado pelo fato de que, apesar desta planta possuir mecanismos de defesa não enzimáticos ativados, diante do estresse, este mecanismo não foi suficiente para a proteção destas plantas. Além disso, a não ativação do

sistema enzimático resultou em danos a membrana. Brosché e Strid (2003) relataram que as plantas atuam primeiro estimulando o sistema de defesa antioxidante não enzimático e, em seguida, o sistema de defesa antioxidante enzimático provavelmente devido a padrões de expressão gênica temporais.

Ao investigar a ação antioxidante, percebe-se que a espécie *A. philoxeroides* apresentou maior atividade da enzima ascorbato peroxidase e conteúdo de MDA quando comparado com as demais espécies aos 20 minutos de exposição à radiação. Já é relatado na literatura que esta espécie possui baixo teor de betalaínas ao ser comparada com *A. sessilis* e *A. brasiliana* em condições de estresse (Reis, 2013). Como estes compostos possuem ação antioxidante, sua baixa concentração, em *A. philoxeroides*, poderia explicar parcialmente a maior atividade de ascorbato peroxidase e conteúdo de MDA, como mecanismo compensatório de defesa ao estresse promovido pela radiação UV-C.

Descobertas revolucionárias no campo de percepção da radiação UV vieram com a identificação do gene UVR8 sensível a luz UV. Este medeia respostas de defesa através da ativação de um caminho de sinalização UVR8-COP1- hY5, o que aumenta os pigmentos que agem como protetor solar além da atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio sobre os níveis de radiação UV (Nawkar et al., 2013).

Conclusão

Os resultados sugerem que a radiação UV-C aumenta a produção de metabólitos secundários nas espécies *A. sessilis* e *A. brasiliana* e a atividade das enzimas CAT e APX na espécie *A. philoxeroides*, além de incrementar a peroxidação lipídica em *A. sessilis* e *A. philoxeroides*, indicando que as

espécies estudadas acionam mecanismos de proteção diferentes diante desta radiação.

Referências Bibliográficas

Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology. 55: 373-399.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998). Responses of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. Plant Physiology. 104: 280-292.

Barka AE (2001). Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. Australian Journal of Plant Physiology. 28: 785-791.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany. 91: 179-194.

Brochado CO, Almeida AP, Barreto BP, Costa LP, Ribeiro LS, Pereira RL, Gonçalves-Koatz VL, Costa SS (2003). Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. Journal of the Brazilian Chemical Society. 14: 449-451.

Brockington S, Walker RH, Glover BJ, Soltis PS, Soltis DE (2011). Complex pigment evolution in the Caryophyllales. New Phytologist. 190: 854–864.

Brosché M, Strid A (2003). Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. Physiologia Plantarum. 117: 1–10.

Cai YZ, Sun M, Corke H (2003). Antioxidant activity of betalains from plants in the Amaranthaceae. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 2288–2294.

Cai YZ, Sun M, Corke H (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. Trends Food Science Technology. 16: 370-376.

Chairat B, Nutthachai P, Varit S (2013). Effect of UV-C treatment on chlorophyll degradation, antioxidant enzyme activities and senescence in Chinese kale

(*Brassica oleracea* var. alboglabra). International Food Research Journal. 20 (2): 623-628.

Chakraborty P, Kumar S, Dutta D, Gupta V (2009). Role of antioxidants in common health diseases. Journal of Pharmacy Tecnology. 2 (2): 238-244.

Du YJ, Jin YH, Wang B (2003). Effect of far ultraviolet radiation on lipid peroxidation and inherent protection system in seedlings of *Taxus cuspidate*. Journal of Applied Ecology. 11: 660–664.

Ferreira EA, Procópio SO, Silva EAM, Silva AA, Rufino RJN (2003). Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. IV- *Amaranthus deflexus, Amaranthus spinosus*, *Alternanthera tenella* e *Euphobia heterophylla*. Viçosa-MG. Planta Daninha. 21 (2): 263-271.

Frohnmeyer H, Staiger D (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. Plant Physiology. 133: 1420–1428.

Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F (2005). Betaxanthins as substrates for tyrosinase. an approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. Plant Physiology. (138): 421-432.

Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F (2007). Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. Journal Agriculture Food Chemistry. 55: 1546-1551.

Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F (2010). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. Planta. 232: 449–460.

Gechev TS, Breusegem FV, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. Bio Essays. 28: 1091–1101.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutase occurrence in higher plants. Plant Physiolology. 59: 309–314.

Guerrero-Beltrán JA, Welti-Chanes JS, Barbosa-Cánovas, GV (2009). Ultraviolet-C light processing of grape, cranberry and grapefruit juices to inactivate *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Process Engineering. 32 (6): 916–932.

Hoagland DR, Arnon DI (1938). The water-culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experiment Station. (347): 1938.

Hoch WA, Singsaas EL, Mcown BH (2003). Resorption Protection. Anthocyanins Facilitate Nutrient Recovery in Autumn by Shielding Leaves from Potentially Damaging Light Levels. Plant Physiology. 133: 1296–1305.

Hollósy F (2002). Effect of ultraviolet radiation on plant cells. Micron. 33: 179–197.

Htlal M, Parrado MF, Rosa M, Gaiiardo M, Orce L, Massa EM, Gonzalez JA, Prado, FE (2004). Epidermal Lignin Deposition in Quinoa Cotyledons in response to UV-B Radiation. Photochemistry and Photobiology. 79 (2):.205-210.

Ibdah M, Krins A, Seidlitz HK, Heller W, Strack D, Vogt T (2002). Spectral dependence of flavonol and betacyanin accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* under enhanced ultraviolet radiation. Plant Cell and Environment. 25: 1145–1154.

Jaleel CA, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Ines J, Al-Juburi HJ, Chang-Xing Z, Hong-Bo S, Panneerselvam, R (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. Acta Physiology Plant. 31: 427–436.

Jansen MAK, Hectors K, O'brien NM, Guisez Y, Potters G (2008). Plant stress and human health: Do human consumers benefit from UV-B acclimated crops. Plant Science.175: 449-458.

Kanner K, Harel S, Granit R (2001). Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 5178–5185.

Katerova Z, Ivanov S, Mapelli S, Alexieva V (2009). Phenols, proline and low-molecular thiol levels in pea (*Pisum sativum*) plants respond differently toward prolonged exposure to ultraviolet-B and ultraviolet-C radiations. Acta Physiologiae Plantarum. 31 (1): 111-117.

Katerova Z, Todorova D (2009). Endogenous polyamines lessen membrane damages in pea plants provoked by enhanced ultraviolet-C radiation. Plant Growth Regulation. 57 (2): 145–152.

Katerova Z, Todorova D (2011). Effect of enhanced UV-C irradiation on growth, some stress markers, polyamines, IAA and IAA-oxidase activity in pea plants (*Pisum sativum* L.).Comptes-rendus de l' Académie- bulgare des Sciences. 64 (11): 1555–1562.

Katerova Z, Todorova D, Tasheva K, Sergiev L (2012). Influence of ultraviolet radiation on plant secondary metabolite production genetics. Review Plant Physiology. 2 (3): 113–144.

Kleinowski AM et al (2013). Pigment production and growth of Alternanthera plants cultured in vitro the presence of tyrosine. Brazilian Archives of Biology and Technology. (online): 1-8.

Lavola A, Aphalo PJ, Lahti M, Julkunen-Tiitto R (2003). Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in *Scots pine*. Environmental and Experimental Botany. 49: 49–60.

Li XM, Zhang LH, He XY, Hao L (2007) Photosynthetic responses of wheat and pea seedlings to enhanced UV-C radiation and their resistances. Chinese Journal Applied Ecology. 18: 641–645.

Machado A, Conceição AR (2002). Programa estatístico WinStat-Sistema de Análise Estatístico para Windows. Versão 2.0. Pelotas, RS.

Merzlyak M, Solovchenko A (2002). Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. Plant Science. 163: 881-888.

Mewis I, Schreiner M, Nguyen CH, Krumbein A, Ulrichs C, Lohse M, Zrenner R (2012). UV-B Irradiation Changes Specifically the Secondary Metabolite Profile in Broccoli Sprouts: Induced Signaling Overlaps with Defense Response to Biotic Stressors. Plant Cell Physiology. 53 (9): 1546–1560.

Murashige T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. (15): 473-497.

Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology. 22: 867-880.

Nawkar M, Maibam P, Park JH, Sahi VP, Lee SY, Chang H (2013). UV-Induced Cell Death in Plants. Journal of Molecular Science. 14: 1608-1628.

Pietrini F, Lannelli MA, Massacci A (2002). Anthocyanin Accumulation in the Illuminated Surface of Maize Leaves Enhances Protection from Photo-Inhibitory Risks at Low Temperature, without Further Limitation to Photosynthesis. Plant Cell and Environment. 25: 1251–1259.

Rai R, Meena RP, Smita SS, Shukla A, Rai SK, Pandey-Rai S (2011). UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. An antimalarial plant. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 105: 216–225.

Reis A (2013). Síntese de betalaínas induzida pela luz em espécies do gênero *Alternanthera*. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. 102.

Ribeiro CW (2012). Analise funcional das isoformas citosólicas e peroxissomais de ascorbato peroxidase em Arroz (*Oryza sativa* L). Tese (Doutor em Ciências), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. p. 166.

Rudat A, Göring H (1995), Induction of betacyanin formation in cell cultures of Chenopodium album under UV-light irradiation. Journal Experimental Botany. 46: 129-134.

Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C (2002). Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia leaves*. Phytochemistry. 59: 23-32.

Salvador MJ, Dias DA (2004). Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritime* (Mart.) 275 St. Hil. (Amaranthaceae). Biochemical Systematic and Ecology. 32: 107-110.

Salvador MJ, Ferreira EO, Mertens-Talcott SU, Whocely VC, Butterweck V, Derendorf H, Dias DA (2006). Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 61: 19-25.

Saurabh CS, Pankaj KJ, Grimm B, Sandeep A (2011). Alleviation of ultraviolet-C induced oxidative damage through over expression of cytosolic ascorbate peroxidase. Versita Biologia Section Cellular and Molecular Biology. 66 (6): 1052-1059.

Schliemann W, Kobayashi N, Strack D (1999). The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. Plant Physiology. (119): 1217-1232.

Schreiner M, Krumbein A, Mewis I, Ulrichs C, Huyskens-Keil S (2009). Short-term and moderate UV-B radiation effects on secondary plant metabolism in different organs of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). Innovative Food Science and Emerging Technologies. 10: 93–96.

Schreiner M, Mewis I, Huyskens-Keil S, Jansen M, Zrenner R, Winkler JB, O'brien N, Krumbein A (2012).UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites-Potential Benefits for Plant and Human Health. Critical Reviews in Plant Sciences. 31: 229-240.

Schwartz SJ, Von Elbe JH (1980). Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (28): 540-543.

Sharma A, Guruprasad KN (2009). Similarities in the biochemical changes between solar UV exclusion and GA application in *Amaranthus caudatus*. Physiology and Molecular Biology of Plants.15 (4): 367-370.

Silva NCB, Macedo AF, Lage CLS, Esquibel MA, Sato A (2005). Developmental effects of additional ultraviolet a radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. Brazilian archives of biology and technology. 48: 779-786.

Solovchenko AE, Merzlyak MN (2008). Screening of Visible and UV Radiation as a Photoprotective Mechanism in Plants. Russian Journal of Plant Physiology. 55 (6): 719–737.

Sreenivasulu N, Sopory SK (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene. 388: 1-13.

Thind SK, Goyal P (2012). Oxidative Stress and Anti-oxidant Machinery of Plants. An International Journal of Life Sciences. 1 (2): 143-148.

Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. Plant Science. 151: 59–66.

Wang B, Zarka A, Trebst A, Boussiba S (2003). Accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photo protective process under high irradiance. Journal Phycology. 39: 1116–1124.

Winkel-Shirley B (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current. Opinion in Plant Biology. 5: 218–223.

Woo KK, Ngoou LS, Ngo, WK, Soong PY, Tang (2011). Stability of betalain pigment from red Dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). American Journal of Food Technology. 6: 140-148.

Zacchini M, Agazio M (2004). Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. Plant Physiology and Biochemistry. 42: 445-450.

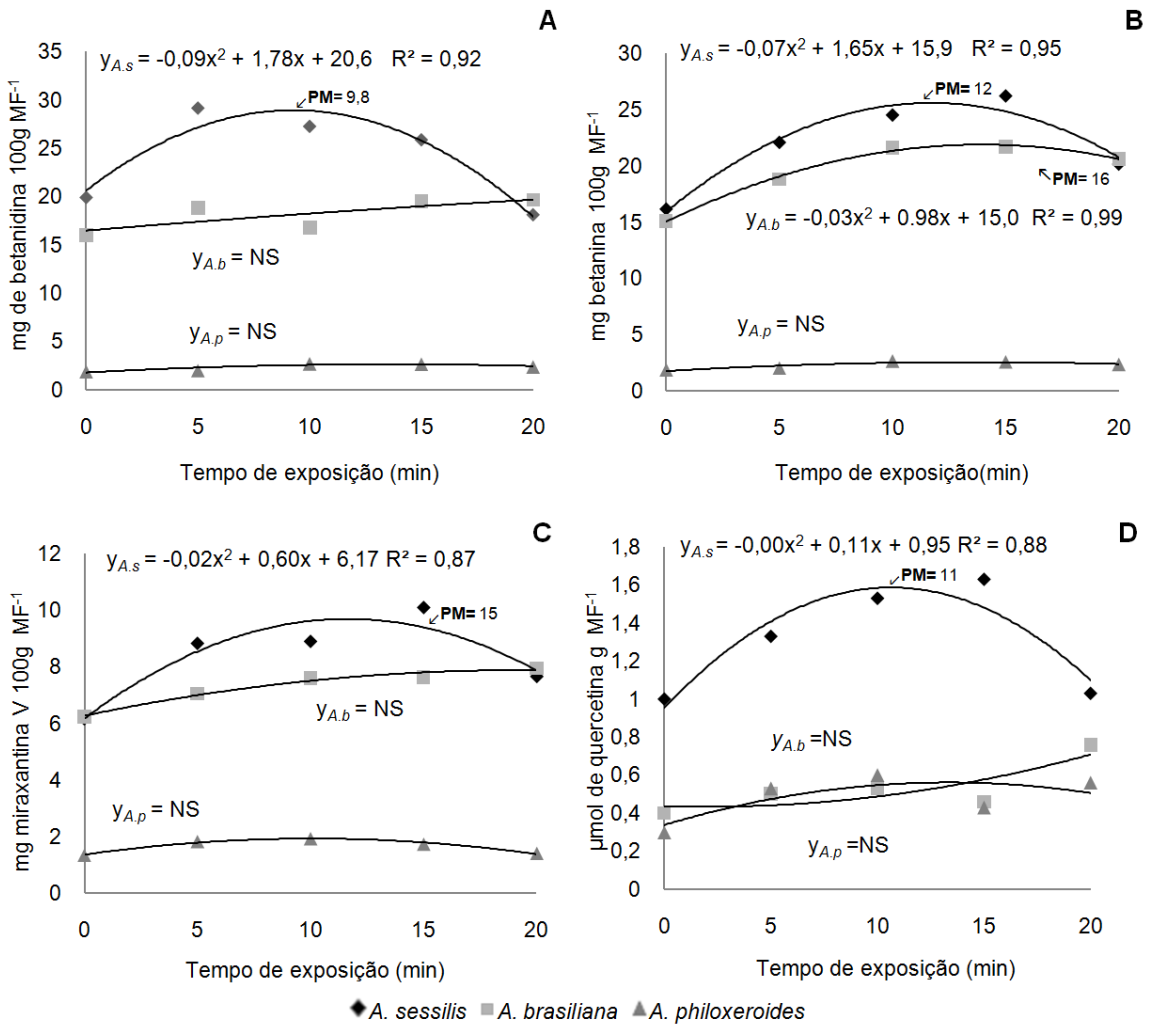

Fig. 1 Teor de betanidina (**A**), betanina (**B**) betaxantina (**C**) e flavonoides totais (**D**) quantificados na parte aérea de três espécies do gênero *Alternanthera,* expostas à radiação UV-C durante 0, 5, 10, 15 e 20 minutos. Setas indicam o ponto de máxima relativo de cada curva e NS significa que a equação da reta não foi significativa ao nível de 5 % de probabilidade de erro. MF= massa fresca.

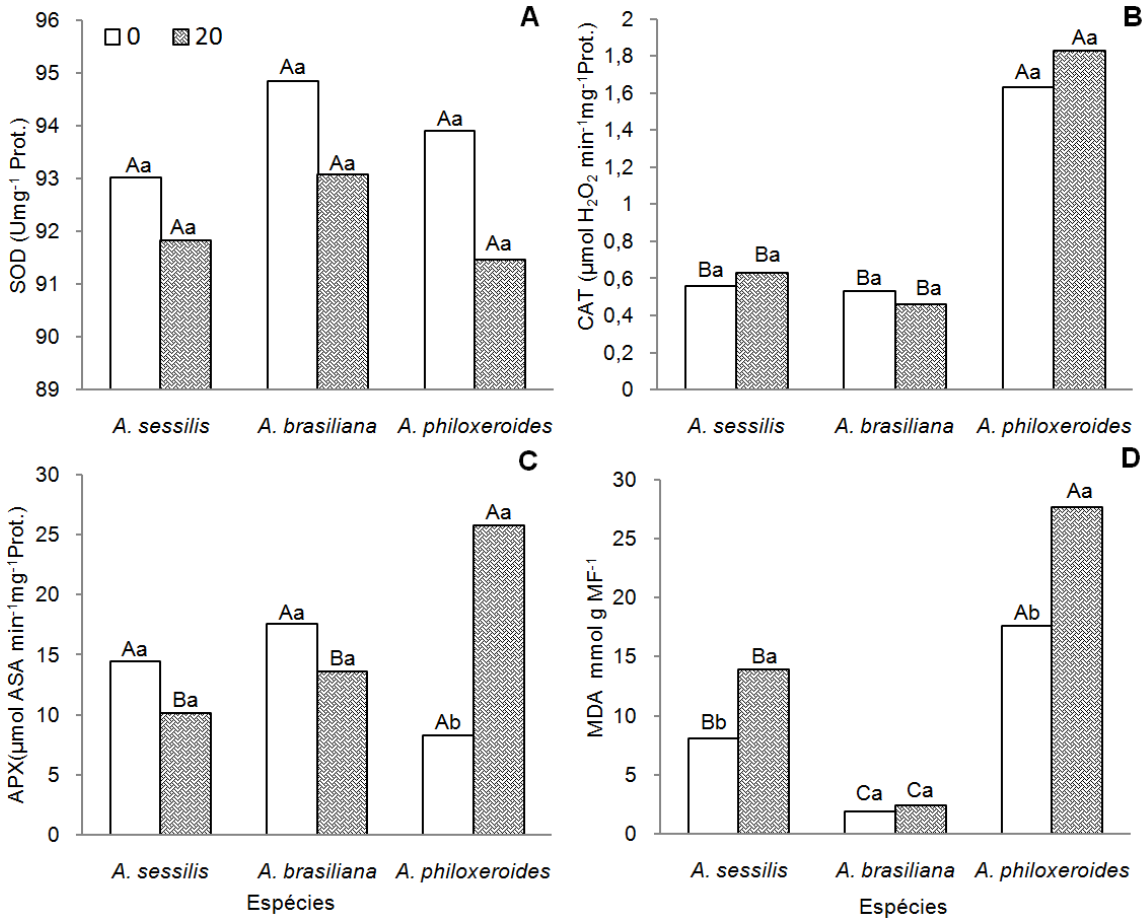

Fig. 2 Atividade especifica das enzimas SOD (**A**), CAT (**B**) e APX (**C**) e conteúdo de malondialdeído (MDA), (**D**) de três espécies do gênero *Alternanthera,* expostos à radiação UV-C (0 e 20 minutos). Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5 %, sendo que letras minúsculas comparam os diferentes tempos de exposição dentro de cada espécie e letras maiúsculas comparam as espécies nos diferentes tempos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As radiações UV-B e UV-C aumentam a síntese de betalaínas e flavonoides. Estudos sobre as limitações do metabolismo primário diante do aumento desses compostos podem esclarecer o comportamento fisiológico de *A. sessilis*, *A. brasiliana*, *A. philoxeroides* e *A. tenella* quando expostas às radiações UV.

As espécies do gênero *Alternanthera* possuem características morfológicas que as diferem entre elas, por exemplo, *A. philoxeroides* possui folhas menores que *A. brasiliana*. Novas compreensões sobre a interferência da morfologia das folhas na absorção de radiação UV podem responder às diferenças nos mecanismos de resposta acionados pelas plantas.

Para ter uma visão geral do potencial antioxidante de *A. sessilis*, *A. brasiliana*, *A. philoxeroides* e *A. tenella* é necessário um estudo mais aprofundado sobre os principais inibidores de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, outras peroxidases devem ser investigadas, bem como padrões de expressão gênica destas espécies.

Plantas do gênero *Alternanthera* submetidas à radiação UV-B apresentaram maiores concentrações de betalaínas e flavonoides quando comparadas com as plantas expostas à radiação UV-C. Tendo em vista o menor acúmulo, bem como, possíveis efeitos tóxicos da radiação UV-C este estudo ressalta a radiação UV-B como um potencial elicitor de compostos medicinais presentes nas plantas.

No entanto, os efeitos em longo prazo da radiação UV-B em plantas ainda não é bem entendido, portanto, mais pesquisas precisam ser realizadas com períodos de exposição mais longos e também devem ser mais bem

investigados os efeitos da interação da radiação UV-B com outros fatores de estresse.