

# **Acúmulo de protoporfirina IX e 5-ALA a partir de inibidores da protox e fontes seletivas de luz em plantas de alface (*Lactuca sativa* cv Regina).**

**Barberis, L.R.M.<sup>1</sup> ; Trindade, M.L.B.<sup>1</sup> ; Velini, E.D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UNESP – Faculdade de Ciências Agronômicas - Botucatu/SP

## **RESUMO**

O objetivo do trabalho foi avaliar quais fontes seletivas de luz melhor responderiam ao acúmulo de de Protoporfirina IX (Proto IX) e Ácido Aminolevuvênico (5-ALA), com o uso de inibidores da Protox, precursores e antioxidantes. O experimento foi montado em cultivo hidropônico e câmara climatizada, em 9 tratamentos de luz: 1. Escuro, 2.Sombrite 75%, 3.Vitamina C+E, 4. Claro, 5.Filtro Azul, 6. Filtro vermelho, 7. Filtro Amarelo, 8. Filtro Verde, 9.Testemunha. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. As repetições se constituíram de 1 planta por repetição, sendo as mesmas pulverizadas com Oxyfluorfen + Glutamato monossódico + Vitamina C e E em simulador estacionário. Foram realizadas avaliações visuais de controle 5DAA, e no fim do estudo determinações analíticas, via extração da biomassa fresca, verificando os teores de protoporfirina IX por cromatografia líquida. Os resultados mostraram que foram detectados aumentos significativos nas concentrações de proto IX para a condição sem filtro (claro), e aumentos em 5-ALA para as condições sem filtro claro e amarelo.

**PALAVRAS CHAVES:** alface, filtros de luz, ácido levulênico

**ABSTRACT: Accumulation of protoporphyrin IX and 5-ALA starting from inhibitors of the protox and selective sources of light in lettuce plants (*Lactuca sativa* cv Regina).**

## **SUMMARY**

The objective of the work was to evaluate which selective sources of better light would answer to the accumulation of of Protoporfirina IX (Proto IX) and Ácido Aminolevuvênico (5-ALA), with the use of inhibitors of Protox, precursors and antioxidants. The experiment was set up in cultivation hidropon and acclimatized camera, in 9 light treatments: 1. darkness, 2.Sombrite 75%, 3.Vitamina C+E, 4. Clear, 5.Filtro Blue, 6. I Filter red, 7. Filtro Amarelo, 8. I Filter Green, 9.Testemunha. The adopted experimental delineation was casual entirely, with 4 repetitions. The repetitions were constituted of 1 plant by repetition, being the same ones

powdered with Oxyfluorfen + Monossodium Glutamate + Vitamina C and E in stationary simulator. Visual evaluations of control 5DAA were accomplished, and at the end of the study analytical determinations, through extraction of the fresh biomass, verifying the tenors of protoporfirina IX for liquid cromatografia. The results showed that significant increases were detected in the concentrations of proto IX for the condition without filter (clear), and increases in 5-ALA for the conditions without clear and yellow filter.

**KEY WORDS:** lettuce, light filters, aminolevulenic acid

## INTRODUÇÃO

A síntese de porfirinas é fundamental para a produção de clorofilas em plantas e heme em plantas e animais. As principais diferenças referem-se à alimentação da rota, feita a partir do glutamato em plantas e a partir de glicina e Succinil CoA em humanos. A partir do ácido 5-aminolevulênico, as enzimas envolvidas são praticamente as mesmas em todas as transformações necessárias para a produção dos tetrapirróis.

A produção e acúmulo de porfirinas em plantas tem sido bastante estudada em função de estes compostos serem precursores das clorofilas e do heme. Adicionalmente, a enzima protoporfirinogênio IX oxidase (PPO ou PROTOX) constitui-se no sítio da ação dos herbicidas difenil-éteres (oxyfluorfen, lactofen, fomesafen), oxadiazolinas (oxadiazon e oxadiargil) e ariltriazolinonas (sulfentrazone e carfentrazone). Este mecanismo de ação dos herbicidas e os compostos que nele atuam, são apresentados em detalhes por alguns autores, Dodge (1992), Hess (1993) e Weller (2002) as principais informações são apresentadas a seguir. A inibição da síntese da protoporfirina IX gera um intrigante acúmulo deste pigmento nas plantas tratadas com os herbicidas deste grupo. Em plantas, a protoporfirina IX também apresenta grande reatividade produzindo, na presença de luz, Oxigênio singleto. A protoporfirina IX é produzida nos cloroplastos, pela ação da Protox, que tem o protoporfirinogênio IX como substrato. Como a regulação da rota depende prioritariamente da concentração de protoporfirina IX e seus derivados no interior dos cloroplastos, a paralisação da atividade desta enzima gera um grande acúmulo de protoporfirinogênio IX que extravasa para o citosol. No citosol, o protoporfirinogênio IX é convertido, de modo não enzimático, a protoporfirina IX, que é acumulada em grandes concentrações.

A ação e codificação da Protox, que está presente e atua nos cloroplastos (produzindo clorofila) e mitocôndrias (produzindo heme) é inteiramente codificada no núcleo (Watanabe *et al.* 2001). Os autores também estudaram e demonstraram a existência da translocação intracelular do Protoporfirinogênio e da Protoporfirina IX. Os resultados indicam que os excessos destes compostos presentes nos cloroplastos e citosol, em decorrência da ação sub-letal de herbicidas (aplicados em baixas doses), podem ser utilizados nas mitocôndrias para a produção de grupos heme (Watanabe *et al.* 2001).

Porfirinas são importantes tanto em plantas quanto em humanos. As principais etapas da rota de produção destes compostos também são similares em animais e vegetais. Na presença de luz com comprimentos de onda adequados, as porfirinas fluorescem e induzem a formação de Oxigênio singleto, tornando-se compostos fototóxicos com capacidade de promover a oxidação de lipídeos, a ruptura de membranas e a morte celular. Estas duas características, associadas às particularidades bioquímicas das células neoplásicas, têm levado ao maior acúmulo e atividade de porfirinas nestas, permitindo o desenvolvimento de sistemas seletivos para o diagnóstico e tratamento de neoplasias de vários tipos e em diferentes órgãos de humanos.

Como a produção de Oxigênio singleto depende obrigatoriamente da presença de luz em comprimentos de ondas adequados, o fornecimento ou indução do acúmulo de porfirinas tem sido amplamente utilizado para que se obtenha a fotossensibilização necessária ao uso da Terapia Fotodinâmica (TFD). Também há a possibilidade de fornecer tanto a luz quanto o agente fotossensibilizante de forma tópica aumentando a seletividade da técnica.

Este trabalho tem como objetivo selecionar fontes seletivas de luz adequados para o acúmulo de protoporfirina IX e 5-ALA .

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia - NUPAM da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, campus de Botucatu/SP. A aplicação nas plantas de alface foi feita com Oxyfluorfen (4ml p.c./l) + Glutamato monossódico (10g/l) + Vitamina C (25g/l) e E (2,5ml/l) em pulverizador experimental regulado para um consumo de calda de 1000 l/ha, foram utilizadas mudas de alface cultivar Regina em cultivo hidropônico (Castellane & Araújo), mantidas em câmara climatizada a 25°C e 70% de umidade relativa com fotoperíodo de 24 horas.

No tratamento sem filtro de luz a aplicação com vitaminas C (25g/l) e E (2,5ml/l) foi realizado 24 horas da aplicação do inibidor da protox, para redução do estresse oxidativo. Os sintomas de acúmulo de porfirinas foram avaliados aos 2 DAA . Os espectros de absorção e emissão foram determinados em espectrofotômetro de duplo feixe e fluorômetro, respectivamente. Utilizou-se espectrofotômetros de duplo feixe para determinar as intensidades de absorção ou transmissão de luz com diferentes comprimentos de onda (190 a 900nm) pelos filtros.

A parte laboratorial envolveu duas etapas: extração e análise do material. Para a extração utilizou-se o método segundo Pornprom et. al. (1994), Becerril et. al. (1992) e Sherman et. al. (1991), cuja biomassa fresca das plantas é triturada em grau de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido ou de areia purificada. Após a trituração das folhas, a extração foi feita com 8ml de metanol e hidróxido de amônia em 0,2 gramas do material triturado em ambiente protegido de luz. Para tanto, tubos “falcon” foram envolvidos com papel alumínio, antes de passarem no ultra-som e centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos e, então, filtrados em filtro tipo membrana Millex (Millipore) de 200 $\mu$ . As análises foram realizadas em CLAE-EM (cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa tipo quadropolo), marca Shimadzu, modelo 2010EV, que apresenta resposta uniforme a grupos de compostos com características similares, mantendo uma relação aproximadamente constante entre a intensidade de sinal (área do pico cromatográfico) e a concentração dos diferentes compostos expressas em unidades molares.

Para as análises, as condições do CLAE estabelecidas foram os seguintes gradientes dos solventes (metanol, água e metanol/0,1 N de NH<sub>4</sub>OH e acetonitrila 9/1 v/v) na fase móvel. A coluna empregada foi uma pré-coluna de C<sub>18</sub> de 5 x 2mm, marca Shimadzu com volume de injeção de 5 $\mu$ l. O tempo total de corrida foi de 15 minutos e o tempo de retenção da protoporfirina IX foi de 7,1 minutos. Foram estabelecidos 6 pontos para a curva de calibração sendo empregada a quantificação em diferentes concentrações do padrão de protoporfirina IX. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e comparação de médias com uso do teste Tukey no nível de 5% de probabilidade

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados mostraram que foram detectados aumentos significativos nas concentrações de proto IX para a condição sem filtro (claro), e aumentos em 5-ALA para as condições sem filtro claro e amarelo.

A partir dos espectros de absorção e emissão da Proto IX (630nm), foram selecionados filtros com capacidade de interferir na fluorescência e produção de Oxigênio Singleto pela Proto IX.

Os resultados indicaram que a intoxicação das plantas ocorreram mesmo com o uso de filtros com diferentes cores e que os tratamentos com maior potencial de uso em termos de indução da síntese de Proto IX eram os tratamentos sem seleção de comprimentos de onda, no caso, sem filtro (claro), já para indução da síntese de 5-ALA os melhores tratamentos foram, claro e amarelo, respectivamente, com comprimentos de ondas mais próximos e diferindo significativamente da testemunha.

#### **LITERATURA CITADA:**

Becerril, M.; Duke, M.V.; Nandinalli, U.B.; Matsumoto, H.; Duke, S.O. Light control of porphyrin accumulation in acifluorfen-methyl. *Physiol. Plant.* (1992) 86, 6-16.

Dodge, A D. (1992). Photosynthesis. In: Ralph C. Kikwood. *Target Sites for Herbicide Action*. University of Stranthclyde, Glasgow, United Kingdom. p. 1-27

Hess, F.D. (1993) Herbicide effects on plant structure, physiology and biochemistry. In: Altman, J. *Pesticide Interactions in Crop Production Beneficial and Deleterious Effects*. CRC Press, London. 579p.

Pornpon, T.; Matsumoto, H.; Usui, K.; Ishizuka, K. *Pesticide Biochemistry and physiology* (1994) 50,107-114.

Rodrigues, B.N.; Almeida, F.S. (2005). *Guia de Herbicidas*. 5a Ed. Londrina. 592p.

Sherman, D.T.; Becerril, J.M.; Matsumoto, H.; Duke, M.V.; Jacobs, J.M.; Jacobs, N.J.; Duke, S.O. Physiological basis for differential sensitivities of plant species to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. *Plant Physiol.* (1973) 51, 130-145.

Watanabe, N.; Fang-Sik Che; Iwano, M.; Takayama, S.; Yoshida, S.; Isogai, A. (2001). Dual targeting of spinach Protoporphyrinogen Oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of in-frame initiation codons. *The Journal of Biological Chemistry.*, v.273, n.23, p.20447-81.

Weller, S. (2002). Photosystem II Inhibitors. In: Herbicide Action Course. Purdue University, West Lafayette. p. 127-80.

**Tabela 1:** Médias transformadas (raiz quadrada) das concentrações de porfirina e ácido levulênico em plantas de alface submetidas aos diferentes tratamentos de luz. FCA/UNESP/Botucatu – 2008.

Tratamentos	Porfirina	Ácido aminolevulênico
	(µg/g)	
Escuro	3,053959 c	83,150576 ab
Sombrite 75%	4,830593 abc	88,806467 ab
Vit C+E Claro	5,436275 abc	86,712962 ab
Filtro Azul	4,642736 bc	71,771734 ab
Filtro vermelho	5,373788 abc	78,234464 ab
Filtro Amarelo	3,398273 c	<b>95,529035 a</b>
Filtro Verde	4,065904 bc	80,430336 ab
Claro	<b>7,519356 a</b>	<b>96,974275 a</b>
Testemunha	6,423779 ab	57,641493 b
F (tratamentos)	6,05**	4,17**
C.V. (%)	23,18	14,55
D.M.S	2,74	28,44

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P<0,05). \*\* - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

