

Seleção de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) para acúmulo de Protoporfirina IX com uso herbicidas inibidores da Protox, precursores e antioxidantes.

Barberis, L.R.M.¹ ; Trindade, M.L.B.¹ ; Velini, E.D.¹

¹ UNESP – Faculdade de Ciências Agrônômicas - Botucatu/SP

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi selecionar genótipos de cana-de-açúcar por meio de inibidores da Protox, precursores e antioxidantes para indução do acúmulo de Protoporfirina IX (Proto IX) e ou de seus precursores em plantas, tais compostos podem ser utilizados como agentes sensibilizantes em terapia fotodinâmica (TFD), que possibilitam uma fonte de baixo custo para o tratamento de neoplasias. O experimento foi montado em câmara climatizada, com aplicação de 9 tratamentos (1.Oxyfluorfen+Glutamato Monossódico+Vitamina C e E; 2.Oxyfluorfen+Glutamato Monossódico+Vitamina C e E+ Ácido levulênico; 3.Oxyfluorfen; 4.Carfentrazone+Glutamato Monossódico+Vitamina C e E; 5.Carfentrazone+Glutamato Monossódico+Vitamina C e E+Ácido levulênico; 6.Carfentrazone; 7.Testemunha+Vitamina C e E; 8.Testemunha+Vitamina C e E+Ácido levulênico; 9.Testemunha) em 8 genótipos de cana-de-açúcar (1.PO933499; 2.RB806043; 3.RB470355; 4.PO830698; 5.SP701143; 6.PO901387; 7.PO894414; 8.SP903414); dispostos em esquema fatorial 9 x 8, com 4 repetições. As repetições se constituíram de folhas (20cm) destacadas de cada genótipo, sendo as mesmas pulverizadas com os devidos tratamentos já mencionados, em simulador estacionário. Foram realizadas avaliações visuais de controle 2DAA, e no fim do estudo, determinações analíticas via extração da biomassa fresca, verificando os teores de protoporfirina IX por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados mostraram que em curto prazo foram detectados aumentos significativos nas concentrações de proto IX para os genótipos RB470355, SP903414 submetidos ao tratamento 2 e para o genótipo SP701143 submetido ao tratamento 8, indicando que podem ser utilizadas como fontes acumuladoras de protoporfirina IX.

PALAVRAS-CHAVES: cana-de-açúcar, porfirinas, glutamato

ABSTRACT: Selection of sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) for accumulation of Protoporphyrin IX using inhibiting herbicides of Protox, precursors and antioxidants.

SUMMARY

The objective of this study was to select genotypes of sugar cane through Protox inhibitors, antioxidants and precursors to induce the accumulation of Protoporphyrin IX (Proto IX), or its precursors in plants, such compounds can be used as agents sensitizing in photodynamic therapy (PDT), which enable a source of low cost for the treatment of malignancies. The experiment was mounted on chamber heated, with application of 9 treatments (1.Oxyfluorfen + Monossodium Glutamate + Vitamin C and E; 2.Oxyfluorfen + Monossodium Glutamate + Vitamin C and E + levulenic acid; 3.Oxyfluorfen; 4.Carfentrazone + Monossodium Glutamate + Vitamin C and E; 5.Carfentrazone + Monossodium Glutamate + Vitamin C and E + levulenic acid; 6.Carfentrazone; 7.Witness + Vitamin C and E; 8. Witness + Vitamin C and E + levulenic acid; 9. Witness without spraying) in 8 genotypes of sugarcane(1.PO933499; 2.RB806043; 3.RB470355; 4.PO830698; 5.SP701143; 6.PO901387; 7.PO894414; 8.SP903414); arranged in a factorial 9 x 8, with 4 repetitions. The repetitions are formed from leaflets (20cm) deployed in each genotype, and sprayed them with the appropriate treatments mentioned in stationary simulator. Evaluations were carried out visual control 2DAA, and at the end of the study, analytical determinations by extraction of fresh biomass, checking the contents of protoporphyrin IX by high performance liquid chromatography. The results showed that in the short term were detected significant increases in the concentrations of proto IX for the genotypes RB470355, SP903414 undergoing treatment 2 and the genotype SP701143 subjected to treatment 8, indicating that can be used as sources accumulators of protoporfirina IX.

WORD-KEY: sugarcane, porphyrin, glutamate

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 Prottox, 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 Prottox, 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.

A maior limitação do uso da TFD é a baixa disponibilidade e ou alto custo dos agentes fotossensibilizantes. Este trabalho tem como principal objetivo selecionar genótipos de cana-de-açúcar como unidades de produção ou como fontes de dois importantes agentes fotossensibilizantes que são do ácido 5-aminolevulênico e a Protoporfirina IX.

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 dos tratamentos foi feita em pulverizador experimental regulado para um consumo de calda de 1000 l/há, em pedaços de 20 cm de folhas, dispostas horizontalmente em bandejas plásticas. Após esta etapa, as folhas foram inseridas em copos plásticos com algodão umedecido no fundo e, em seguida, alocadas em câmara climatizada a 25°C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14 horas de luz durante 15 dias.

Foram adotados nove tratamentos: 1.Oxyfluorfen (6ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 2.Oxyfluorfen (6ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 3.Oxyfluorfen (6ml p.c./l); 4.Carfentrazone (0,250ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 5.Carfentrazone (0,250ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 6.Carfentrazone (0,250ml p.c./l); 7.Testemunha + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 8.Testemunha + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 9.Testemunha; os quais foram aplicados em 8 diferentes genótipos: 1.PO933499; 2.RB806043; 3.RB470355; 4.PO830698; 5.SP701143; 6.PO901387; 7.PO894414; 8.SP903414.

Portanto, o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado por esquema fatorial 9 x 8, com quatro repetições (cada repetição constituiu-se de um pedaço de 20cm de folha de cana). Os sintomas de acúmulo de porfirinas foram avaliados aos 2 DAA dos tratamentos. A avaliação consistiu na determinação da porcentagem da superfície com a cor característica da porfirina (marrom-avermelhada) através de notas visuais de controle, baseadas em uma escala percentual, onde “0” representa nenhum sintoma e “100” sintomas por toda superfície da folha (tabela 2). Após a avaliação, as folhas foram coletadas e acondicionadas em freezer à -20°C.

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 μ . 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 NH₄OH e acetonitrila 9/1 v/v) na fase móvel. A coluna empregada foi uma pré-coluna de C₁₈ de....., com volume de injeção de 5 μ l. O tempo total de corrida foi de 15 minutos e o tempo de retenção da proporfirina 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

O método analítico mostrou maiores acúmulos em ug/g de protoporfirina IX nos genótipos SP903414, RB470355 submetidos ao tratamento 2 (Oxyfluorfen (6ml p.c./l) + Glutamato (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização)) e SP701143 submetido ao tratamento 8 (Testemunha + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização)), respectivamente 21,25; 19,75 e 15,25 ug/g, diferindo significativamente da testemunha dos genótipos correspondentes, conforme tabela 1. As maiores concentrações foram observadas com o uso do inibidor da protox, juntamente com os precursores e antioxidantes, demonstrando que ocorreu a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase e ocasionou o acúmulo do protoporfirigênio no cloroplasto, cuja substância se extravasa para o citosol da célula e se transforma em protoporfirina IX que na presença de luz e oxigênio, forma o oxigênio singleto, responsável pela peroxidação de lipídeos, degradação da membrana e morte celular.

Deve-se levar em conta que as maiores médias de porcentagem dos sintomas ocorreram no genótipo SP903414 submetido ao tratamento 3 (Oxyfluorfen (6ml/l)), com 80% da superfície foliar com sintoma (tabela 2). Esta observação evidencia que a não utilização dos compostos antioxidantes (vitamina C e E) e precursores da rota metabólica (glutamato) fez aumentar os níveis de danos causados nas folhas pela formação do oxigênio singleto. A adição das vitaminas C e E (α -tocoferol), como ação antioxidante, tiveram como objetivo reverter os efeitos do oxigênio singleto produzido quando há interação da Proto IX com Oxigênio e luz. Já a adição do glutamato garantiu o suprimento por compostos precursores, sendo ele, o principal precursor da síntese de porfirinas em plantas. Para os tratamentos 2 e 8, que superaram os demais no acúmulo de protoporfirina IX, foram os que apresentaram médias mais baixas de sintomas (tabela 2), comprovando a hipótese acima da ação dos antioxidantes e precursor. Outro fator relevante observado foi que no tratamento 8 os inibidores de protox (oxyfluorfen e carfentrazone) não estão presentes, atuando somente o precursor (ácido levulênico) e antioxidantes (vitamina C e E), portanto são necessários maiores estudos, uma vez que, pode se tornar uma alternativa interessante na produção de protoporfirina IX na terapia fotodinâmica, devido a não utilização dos inibidores anteriormente citados.

O composto carfentrazone foi selecionado em função da baixa dose de uso, ser fortemente retido no solo e a sua translocação ser limitada pela rápida inativação dos tecidos condutores. O oxyfluorfen foi selecionado em função da sua intensa fotólise e da baixíssima

translocação em plantas; efetivamente, o composto pode ser classificado como imóvel tanto na parte aérea quanto no sistema radicular.

Os principais compostos disponíveis no Brasil e capazes de inibir a ação da Protox, promovendo o acúmulo de Protoporfirina IX e, possivelmente, do ácido 5-aminolevulênico e de heme, são descritos por Rodrigues e Almeida (2005). Dentre os compostos disponíveis há vários que são utilizados em baixas doses ou com baixa toxidez viabilizando o seu uso em uma fração das doses herbicidas para o aumento das concentrações da protoporfirina IX e, possivelmente, do ácido 5-aminolevulênico e de heme. Os valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável) de vários dos compostos (destacando-se carfentrazone e flumioxazin) são relativamente altos e compatíveis com uma dieta exclusiva a partir de alimentos que receberam a aplicação (na dose máxima para alcançar efeito herbicida) imediatamente antes de serem colhidos. Uma característica comum aos inibidores da Protox é a expressiva degradação quando expostos a luz, mas não há informações sobre os comprimentos de onda que promovem sua inativação. A determinação destes comprimentos de onda pode permitir o desenvolvimento de procedimentos de fotólise dos compostos, reduzindo suas concentrações nas plantas, após a indução da produção da protoporfirina IX, mas, é necessário que o comprimento de onda selecionado não induza a fluorescência do tetrapirrol. Também não se sabe se a supressão dos comprimentos que geram a degradação pode permitir a redução da dose aplicada.

De uma forma geral os aumentos na concentração de proto IX, mostraram que em curto prazo foram detectadas diferenças significativas nas concentrações em $\mu\text{g/g}$ nos genótipos RB470355, SP903414 e SP701143, submetidos aos tratamentos 2 e 8, respectivamente, indicando que podem ser utilizadas como fontes acumuladoras de protoporfirina IX. Novos ensaios com os genótipos acima selecionados se fazem necessários por se mostrarem promissores quanto ao objetivo proposto no trabalho.

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 das concentrações de porfirina ($\mu\text{g/g}$) em 8 genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes tratamentos. FCA – Unesp – Botucatu/SP, 2008

tratamentos	Genótipos							
	PO933499	RB806043	RB470355	PO830698	SP701143	PO901387	SP903414	PO894414
1	11,75 Aa	11,25 Aa	13,50 Ba	11,75 Aa	10,50 Ba	14,50 Aa	12,50 Ba	10,00 Aa
2	12,25 Ab	14,75 Ab	21,25 Aa	14,00 Ab	12,25 Bb	13,25 Ab	19,75 Aa	10,75 Ab
3	12,00 Ab	14,25 Aa	14,50 Ba	14,50 Aa	12,75 Bb	12,75 Ab	9,50 Bc	11,50 Ab
4	11,25 Aa	11,50 Aa	14,75 Ba	11,00 Aa	12,75 Ba	12,75 Aa	12,25 Ba	11,50 Aa
5	14,75 Aa	10,25 Ab	13,50 Ba	10,00 Ac	10,50 Bb	11,00 Ab	10,25 Bb	12,25 Ab
6	11,00 Aa	12,50 Aa	12,75 Ba	12,25 Aa	10,25 Ca	13,00 Aa	13,00 Ba	12,00 Aa
7	12,00 Aa	13,75 Aa	12,25 Ba	12,25 Aa	12,25 Ba	14,25 Aa	11,50 Ba	14,25 Aa
8	11,50 Ab	11,25 Ab	10,50 Ba	12,25 Ab	15,25 Aa	12,25 Ab	12,75 Bb	13,00 Ab
9	11,50 Aa	12,00 Aa	12,00 Ba	11,25 Aa	10,00 Ca	11,00 Aa	10,75 Ba	11,50 Aa
F (tratamento)				3,676 **				
F (genótipos)				7,010**				
F (trat x gen)				2,612**				
CV (%)				17,51				
D.M.S.				12,41				

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

Tabela 2: Escala percentual média de sintomas visuais (0-100%) em folhas de cana-de-açúcar 2DAA.

tratamentos	genótipos							
	PO933499	RB806043	RB470355	PO830698	SP701143	PO901387	SP903414	PO894414
1	37,00	5,50	6,50	18,75	9,25	11,25	50,00	20,00
2	11,50	2,50	30,00	9,00	20,00	10,00	47,50	34,00
3	43,25	22,50	32,50	18,75	23,75	33,25	80,00	18,00
4	2,50	0,25	11,50	6,25	1,25	0,75	4,00	12,75
5	3,50	2,50	0,50	5,00	0,50	0,00	3,00	15,00
6	3,25	1,50	0,25	2,25	1,25	0,25	3,25	4,00
7	1,00	2,25	2,50	1,50	1,50	1,00	1,00	2,75
8	3,75	1,50	0,00	4,00	1,00	1,50	1,00	2,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

