

## INDUÇÃO DE PIGMENTOS EM CALOS DE *Alternanthera brasiliana* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUZ

GABRIELA DOS SANTOS RODRIGUES<sup>1</sup>; ANDRESSA REIS<sup>2</sup>; ALITCIA MORAES KLEINOWSKI<sup>2</sup>; EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – gabrielarodrigues2094@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As culturas de células e calos são fontes alternativas de obtenção de substâncias bioativas de plantas, incluindo os pigmentos betalaínas. (KARUPPUSAMY, 2009). As pesquisas na área de corantes naturais têm aumentado nos últimos anos, uma vez que os corantes sintéticos estão apresentando avaliações negativas dos consumidores. Dessa maneira, há um aumento na busca de colorantes naturais como as betalaínas (SAKUTA, 2014).

Esses cultivos são potenciais de biofábricas onde a produção pode ser mais confiável, simples e previsível, atendendo a forte demanda para o mercado de produtos naturais (KARUPPUSAMY, 2009). Para isso, é necessário utilizar estratégias para aumentar a produção destes compostos (GEORGIEV et al., 2008) e a luz é especialmente importante, pois pode induzir a síntese de betalaínas como ocorreu em culturas celulares de *Chenopodium album* e calos de *Alternanthera brasiliana* (ZHAO et al., 2010).

Estes fitopigmentos hidrossolúveis e nitrogenados, cuja gama de cores vai desde o amarelo até o magenta, dividem-se em dois grupos estruturais, as betacianinas (compostos vermelhos ao vermelho violeta) e as betaxantinas (compostos de coloração amarela). Dentre suas propriedades funcionais, as betalaínas são identificadas como antioxidantes naturais (CAI; SUN; CORKE, 2005). A espécie *A. brasiliana* (Amaranthaceae) possui capacidade de armazenar pigmentos das classes das betalaínas (betacianinas e betaxantinas) (ANDREAZZA et al., 2013)

Com base no exposto, acredita-se que esta espécie é uma potencial fonte para estudos que envolvam diferentes qualidades de luz no incremento de betalaínas. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi analisar o aspecto e a intensidade da pigmentação nos calos de *Alternanthera brasiliana* oriundos da combinação de diferentes meios e espectros de luzes e quantificar a produção dos pigmentos betalâmicos nos mesmos.

### 2. METODOLOGIA

Entrenós de *A. brasiliana* foram inoculados e mantidos por 30 dias em três diferentes meios de cultivos sendo Meio 1: 1mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 1mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4 diclorofenoxiacético; Meio 2: 0,75 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA) e 1mg L<sup>-1</sup> 2,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) e 1mg L<sup>-1</sup> de 5-benzilaminopurina (BAP) e Meio 3: 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Posteriormente foram transferidos para Meio de Indução de Betacianinas (MIB)(ZHAO et al., 2010) e

mantidos sob três diferentes qualidades de luz (luz branca luz azul com pico de emissão de 470nm e luz vermelha com pico de emissão de 660nm), por 45 dias.

Para a avaliação qualitativa do aspecto de calos e intensidade dos pigmentos, foram observados dois parâmetros: a aparência (%) da pigmentação magenta em calos e a intensidade deste pigmento. Para o aspecto da coloração dos calos, em cada tratamento, foram dadas as seguintes notas: 0 (ausência de coloração magenta nos calos), 1 (calos com pontos magentas ao acaso), 2 (50% do calo está com cor magenta), 3 (100% do calo está pigmentado na cor magenta) e para a intensidade da cor magenta dos calos: 0 (calo sem pigmentação), 1 (intensidade baixa), 2 (intensidade moderada), 3 (intensidade alta). O teste foi composto de quatro avaliadores, para ambos os parâmetros e foi realizado em calos após 60 dias em cultivo.

Para a extração e quantificação de betaxantinas foram utilizados 250mg de calos e tampão fosfato 10mM, pH 6,0, com 10mM de ascorbato de sódio. As plantas foram maceradas em almofariz de porcelana e o homogeneizado filtrado em gaze e centrifugado a 10000g, por 20min, a 4°C, seguindo a metodologia proposta por (GANDIA-HERRERO et al., 2005).

A extração e quantificação das betacianinas, betanidina e betanina, foi realizada com dois tipos de tampão extrator, tampão acetato/metanol e tampão fosfato, respectivamente. A primeira análise foi realizada com 70% de tampão acetato na concentração de 10 mM e 30% de metanol (v/v), pH 5,0, acrescido de ascorbato de sódio 10mM. A segunda análise foi realizada utilizando tampão fosfato 10mM, pH 6,0, acrescido de ascorbato de sódio 10mM, sem adição de solvente orgânico. Para ambas as análises foram utilizadas 250mg de calos, conforme GANDIA-HERRERO et al. (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Aspecto e Intensidade dos pigmentos

Os calos que cresceram no decorrer dos 40 dias no MIB eram compostos de massas bastante compactas de células esféricas brancas, verdes e magenta e com coloração de superfície opaca. O aspecto da coloração dos calos presentes nos três meios estudados diferiu dependendo da luz ao qual foram expostos. As luzes azul e branca proporcionaram maior formação dos calos com pontos pigmentados, parcialmente magenta e totalmente magenta, coloração característica das betalaínas, que puderam ser avaliados visualmente, nos três meios estudados. As luzes azul e branca foram ideais para a indução de calos mais pigmentados, com coloração predominantemente rosácea, no meio 2.

Já na luz vermelha, não houve diferenças estatísticas entre os três meios, não havendo desenvolvimento de pigmentação em nenhum deles (Figura 1A).

A avaliação da intensidade de coloração nas massas celulares apresentou resultados semelhantes aos do aspecto da coloração, onde as melhores luzes para intensificar as nuances presentes nos calos foram azul e branco, formando pigmentos de intensidades mediana e alta. O meio 2 obteve melhores resultados, com maior intensidade de cor magenta nas três luzes testadas (Figura 1B).

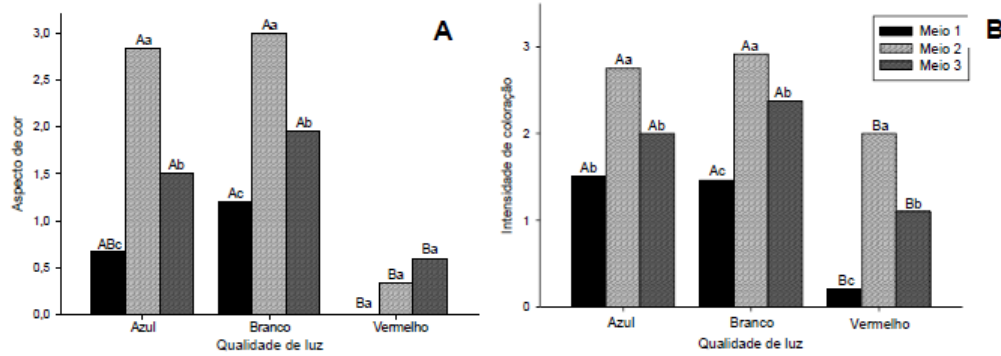


Figura 1- Aspecto e intensidade de coloração em calos de *Alternanthera brasiliana*, após 45 dias em MIB, sob diferentes qualidades de luz.\* Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### Quantificação de betaxantinas e betacianinas

Foi observado que as lâmpadas de cor azul foram mais efetivas na biossíntese de betaxantinas (Figura 2A) para todos os meios testados. Os resultados mostraram também que os calos do meio 2 produziram maior quantidade deste.

Na irradiação por luz vermelha, os meios 3 e 2 foram os que induziram maior acúmulo de betaxantinas e na luz branca, a concentração desse pigmento foi bastante baixa.

Na avaliação relativa ao conteúdo de betacianinas dos calos, a extração foi realizada com dois solventes, buscando extrair diferentes betalaínas, glicosiladas e não glicosiladas. Dessa maneira, por meio da extração com tampão fosfato (Figura 2B), percebeu-se que a luz azul foi mais efetiva, porém, no meio 1, os calos cultivados nas diferentes qualidades de luz não apresentaram diferenças significativas entre si. Quando as betacianinas foram extraídas com tampão acetato, acrescido de metanol (Figura 2C), tampão de pH 5,0, que facilita a extração de moléculas agliconas, o resultado foi diferente. As qualidades de luz que auxiliaram no incremento destes pigmentos foram azul e branca, para os meios 2 e 3, porém, para o meio 1 apresentou resultados semelhantes nas três condições luminosas.

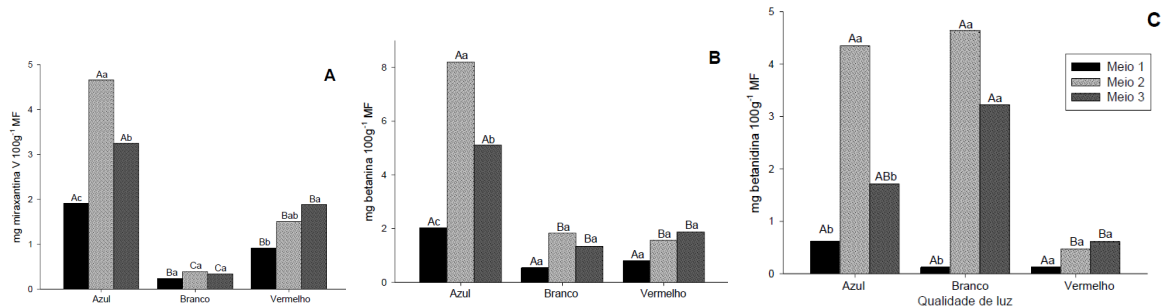


Figura 2- Teor de betaxantinas totais (A), betacianinas totais extraídas com tampão fosfato, pH 6,0 (B) e extraídas com tampão acetato, pH 5,0, (C) em calos de *Alternanthera brasiliana*, cultivados sob diferentes qualidades de luz, durante 40 dias em Meio de Indução de Betacianinas.\* Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si para qualidade de luz e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si para espécie, de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

#### 4. CONCLUSÕES

O meio que promoveu maior incremento de pigmentos nos calos produzidos, independente da qualidade de luz foi o meio 2, composto por uma auxina natural e uma sintética, o AIA ( $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o 2,4-D ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), sugerindo que este regulador de crescimento pode ser utilizado como elicitador no metabolismo secundário das plantas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREAZZA, N.L.; DE LOURENCO, C.C.; SIQUEIRA, C.A.; SAWAYA, A.C.; LAPINSKI, T.F.; GASPARETTO, A.; KHOURI, S.; ZAMUNER, S.R.; MUNIN, E. Photodynamic inactivation of yeast and bacteria by extracts of *Alternanthera brasiliana*. **Curr Drug Targets**, Salvador MJ, v.14, p.1015-1022, 2013.
- CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. **Trends Food Science Technology**, v.16, p.370-376, 2005.
- GANDIA H.F.; ESCRIBANO J.; GARCIA C. F. Betaxanthins as substrates for tyrosinase. an approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains. **Plant Physiol**, v.138, p.421-432, 2005.
- GANDIA, H.F.; ESCRIBANO, J.; GARCIA, C.F. Characterization of the activity of tyrosinase on betanidin. **J. Agric. Food Chem**, v.55, p.1546-1551, 2007.
- GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. Betalain production in plant *in vitro* systems. **Acta Physiologia Plantarum**, v.30, p.581- 593, 2008.
- KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n.13, p. 1222-1239, 2009.
- SAKUTA, M. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins *Plant Biotechnol Rep* v.8 p.37-48, 2014.
- ZHAO, S.Z.; SUN H.Z.; Chen M.; Wang B.S. Light-regulated betacyanin accumulation in euhalophyte *Suaeda salsa* calli. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.102, p.99-107, 2010.