

IDENTIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DURANTE A ONTOGENIA FOLIAR DE *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (IAN 873) e *H. pauciflora* Muell. Arg. SUBMETIDAS A DOIS REGIMES HÍDRICOS.

Francisco Antonio de Oliveira Pita (*)

Marco Antonio Oliva (**)

RESUMO

Através de cromatografia descendente em papel, com a utilização de três sistemas de solventes, identificaram-se os pigmentos presentes nas folhas de seringueira. Por meio das análises dos cromatogramas e dos RF encontrados, verificou-se a presença de duas antocianinas, a pelargonidina e a cianidina. Foi observada a presença de uma mancha amarela, com RF acima de 0,90, provavelmente o quempferol. O teor de antocianina foi influenciado pelo déficit hídrico em plântulas de seringueira, com drástica redução nos primeiros dez dias de ontogenia foliar. Após o vigésimo dia de idade, não houve diferença significativa entre os tratamentos. A progênie do clone IAN 873 de *Hevea brasiliensis* foi mais influenciada pela deficiência hídrica que a de *H. pauciflora*.

INTRODUÇÃO

A grande quantidade de antocianinas nas folhas jovens de diversas plantas tropicais têm chamado a atenção de alguns pesquisadores (Taylor, 1970). A maioria dos clones de seringueira mostra nas folhas jovens, elevado teor de pigmentos antociânicos. Esses pigmentos perduram até o estágio B₂ (Moraes, 1982), atingindo valores mínimos após o vigésimo dia de idade dos folíolos. A coloração vermelha das folhas de seringueira, causada pela antocianina, tem sido associada com a suscetibilidade das folhas ao fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) Arx.

Informações relacionadas com a presença de antocianinas em folhas de *Hevea* spp. são escassas. Figari (1965) separou, por cromatografia, uma mancha amarela, tida como composto fenólico originário da degradação de flavonóides, identificados como quempferol 3-ramnodiglicosídeo (Martins et al., 1970). Hashim et al. (1980) afirmaram que ela responderia à quercetina, e não ao quempferol.

(*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Divisão de Fisiologia Vegetal.

(**) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Os flavonóides são usualmente divididos em duas classes, dependendo do nível de oxidação do anel central pirânico. As duas classes mais importantes são os flavonóis ou 3-hidroxi-flavonas como a quercetina e as antocianinas como a cianidina (Harborne, 1980). Cada flavonol tem um pigmento antocianico correspondente. A quercetina e o quempferol correspondem à cianidina e à pelargonidina, respectivamente (Harborne, 1958; 1980).

Por outro lado, os efeitos do déficit hídrico na síntese ou degradação de antocianinas, ou seus precursores, ainda são pouco estudados. A degradação das antocianinas pode ocorrer na presença de peroxidases, o ácido ascórbico pode exercer papel protetor contra a degradação (Gronmeck & Markakis, 1964), ou em concentrações limitadas de água (Erlandson & Wrolstad, 1972).

Pretende-se identificar as antocianinas presentes na fase jovem da folha de seringueira e estabelecer alguma relação entre o teor de antocianinas e um estresse hídrico moderado na primeira fase do desenvolvimento foliar.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (IAN 873) e *H. pauciflora* Muell. Arg., provenientes de sementes ilegítimas, com cerca de 17 meses e quatro lançamentos, foram cultivados em casa de vegetação. Os experimentos foram realizados em Viçosa, Minas Gerais, entre outubro de 1983 e fevereiro de 1984. As plântulas cresceram em sacos de polietileno, com cerca de 10 kg de Latossolo Vermelho.

Para todos os experimentos, o delineamento experimental correspondeu a blocos inteiramente casualizados, com três repetições. Os dados colhidos foram submetidos à análise da variância, e as curvas foram ajustadas exponencialmente.

Um grupo de 40 plantas foi submetido, durante o experimento, a irrigação insuficiente, que manteve o solo com o potencial hídrico (Ψ_{ws}) de -0,5 MPa (aproximadamente um terço da capacidade de campo). Outro grupo de 40 plantas foi mantido com estado hídrico próximo da capacidade de campo. Os teores de água no solo foram controlados por meio de método gravimétrico, extrapolado para uma curva de retenção de umidade do solo.

Foi considerado primeiro dia após a emergência, em todos os experimentos, o dia em que os folíolos atingiram 2 cm de comprimento. Em todas as determinações foram empregadas as quatro folhas anteriores do lançamento.

A antocianina foi extraída de dez discos foliares, previamente pesados, tomados ao longo da nervura central e mantidos, por 24 horas, em 5,0ml de metanol-HCL (99:1 v:v), em refrigerador (Downs & Siegelman, 1962). O extrato metanólico foi filtrado e o volume completado para 10,0ml. Procedeu-se à leitura das absorvâncias em espectrofotômetro, a 530nm para antocianina (Siegelman & Hendricks, 1958) e a 620 e 650 nm, para eliminar a interferência dos pigmentos clorofílicos (Siegelman & Hendricks, 1958; Creasy, 1968b). O cálculo da concentração de antocianina foi feito segundo Creasy (1968 a, c), através da seguinte equação:

$$A_{ant} = (A_{530} - A_{620}) - 0,1 (A_{650} - A_{620}).$$

A absorvância encontrada foi convertida em moles de antocianina, usando o coeficiente de extinção molar de 34 300 para a absorção máxima a 530nm (Siegelman & Hendricks, 1958).

A identificação parcial dos pigmentos antociânicos foi realizada por meio de cromatografia em papel, empregando-se uma combinação dos métodos de Cage *et al.* (1951) Geissman (1955) e Harborne (1958). A separação dos pigmentos foi obtida mediante cromatografia descendente em papel (Harborne, 1958). Foi empregado papel cromatográfico Wathman-1 (50 cm x 2 cm), aplicando-se 10µl de extrato metanólico à 10cm da extremidade. O cromatograma foi desenvolvido numa câmara, a 22°C, empregando-se o seguinte sistema de solventes, proposto por Harborne (1958):

BAW = butanol-ácido acético-água (4:1:5 v/v/v);

AWH = ácido acético-água-HCl (15:82:3 v/v/v);

FORESTAL = ácido acético-água-HCl (30:10:3 v/v/v);

A separação foi realizada quando a frente atingiu 35 a 40 cm da linha de partida (Cage *et al.*, 1951). Após o desenvolvimento, os cromatogramas foram secados ao ar, os Rf dos pigmentos determinados, as leituras realizadas sob luz visível e ultravioleta e confirmadas, mediante reação de cor, pela aplicação do reagente de Benedict (Harborne, 1958).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coloração vermelha dos folíolos da maioria dos clones de seringueira surge no estágio inicial do desenvolvimento das folhas (Carvalho, 1977). Na Figura 1 vêem-se os teores de antocianinas presentes nos folíolos de seringueira, acumuladas na camada inferior das células do mesófilo. São insuficientes as informações sobre a concentração e função das antocianinas durante a formação foliar. Sabe-se que a quantidade de antocianina nas folhas de *Mangifera indica* L. depende mais de fatores genéticos que do ambiente (Taylor, 1970). O déficit hídrico influenciou a síntese e a degradação de antocianina nas duas espécies de seringueira estudadas. O teor mais alto de antocianina foi encontrado em *H. pauciflora*, quando expresso com base na matéria seca (Figura 1A). O mesmo não aconteceu quando expresso com base na área foliar, e o controle apresentou valor mais baixo (Figura 1B). Folhas de seringueira apresentam elevado teor no início do desenvolvimento foliar, quando expresso com base na área foliar num tratamento estressado. Deve-se isso ao déficit hídrico, que reduz a taxa de expansão foliar. Como o número de células do mesófilo é constante, e a antocianina localiza-se nessas células, abaxialmente, ocorre um efeito de concentração do pigmento, como no caso da progênie de IAN 873. Em *H. pauciflora* a redução da antocianina e da área foliar ocorreu na mesma proporção, sob efeito do déficit hídrico (Figura 1B). A redução da concentração de antocianina, provocada pelo déficit hídrico, com base na matéria seca (Figura 1A), foi de 50 por cento em ambos os clones, nos dez dias iniciais do desenvolvimento foliar.

A progênie do clone IAN 873 sofreu maior influência do déficit hídrico, conforme

as diferenças discriminadas na Figura 1A. Entretanto, os teores de antocianina após o vigésimo dia da emergência foliar foram semelhantes em ambos os tratamentos, provavelmente, em consequência da degradação da antocianina em compostos fenólicos, o que não foi confirmado experimentalmente (Figuras 1A e 1B). Assim, o teor de antocianina, em relação à idade foliar, mostra uma taxa de degradação e/ou diluição exponencial, verificando-se queda brusca no teor de antocianina até o vigésimo dia após a emergência foliar, com concentrações mínimas no quadragésimo dia.

A radiação luminosa pode influenciar, mediante ação do fitocromo (Ku & Mancinelli, 1972) ou fornecimento de açúcares, que estimulariam a síntese de flavonóide (Eddy & Mapson, 1951; Creasy & Swain, 1966). Em discos foliares de *Fragaria vesca* L., quando expostos à luz, foi verificado rápido aumento da fenilalanina amônia-liase (PAL), medido através da síntese de flavonóides, ácido cinâmico e lignina (Creasy, 1968a; Goodwin & Mercer, 1983).

O ácido xiquímico é conhecido como precursor dos aminoácido aromáticos: L-fenilalanina e L-tirosina. Esses aminoácidos podem ser desaminados para formar os ácidos trans-cinâmico e trans-p-cumárico, respectivamente. A desaminação da L-fenilalanina ocorre em todas as plantas e é catalisada pela PAL, que é ativada pela luz (Creasy, 1968a). Esses ácidos são os primeiros precursores da biosíntese de flavonóides (Goodwin & Mercer, 1983).

Nas Tabelas 1 e 2 apresentam-se os resultados dos valores dos RF e das reações de cor, visível e ultravioleta, e com o reativo de Benedict. Os valores encontrados mostram a presença de dois tipos de antocianinas nas folhas jovens de seringueira, pelargonidina e antocianidina, ambas na forma de glicosídeos (Geissman, 1955).

A rota metabólica para a formação da cianidina e da quercetina é a mesma (Harborne, 1980), caracterizada por uma malha interativa das rotas de formação do quemferol e da quercetina. Isso poderia explicar a presença dos dois compostos verificados por Figari (1965), Martins *et al.* (1970) e Hashim *et al.* (1980) em folhas de seringueira.

CONCLUSÃO

O déficit hídrico reduziu a concentração de antocianinas em 50%, nos dez dias iniciais do desenvolvimento foliar, sendo o clone IAN 873, o mais sensível. Estão presentes dois tipos de antocianinas nas folhas de *Hevea* sp., a pelargonidina e a antocianina, na forma de glicosídeos, correspondendo respectivamente aos flavonóides quercetina e quemferol.

SUMMARY

Pigments of rubber tree leaves were identified by means of descending paper chromatography, using three solvent systems. Analysis of the chromatograms and Rf values indicated the presence of two anthocyanins, pelargonidin and cyanidin. A yellow spot, with

R_f value greater than 0.90, was probably kaempferol.

The anthocyanin level was influenced in rubber tree seedlings subjected to water stress, showing a drastic reduction in the first ten days of leaf ontogeny. Leaves older than 20 days showed no significant difference under different water stress treatments. Clone IAN 873 progeny more strongly affected by water stress than that of *H. pauciflora*.

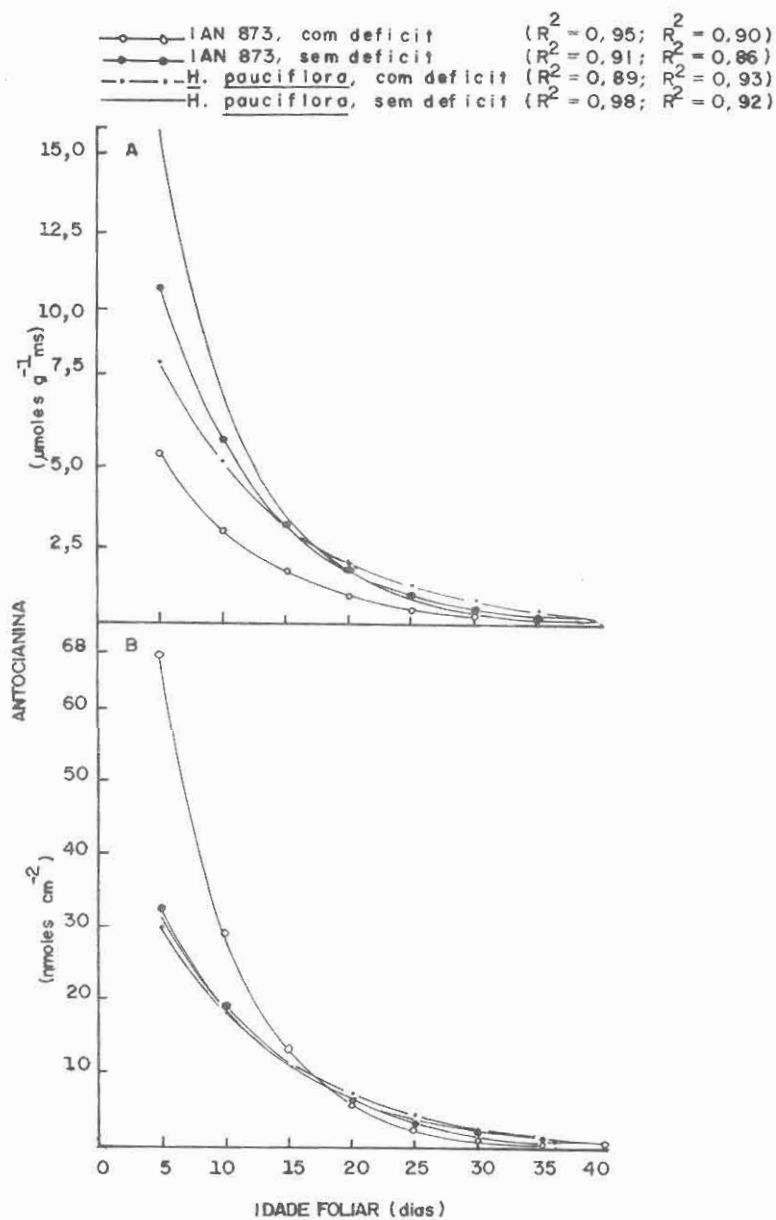


Fig. 1A e 1B. Teor de Antocianina, em relação a Idade Foliar, de *Hevea brasiliensis* (IAN 873) e *H. pauciflora*, submetidas a dois Regimes Hídricos. A - com base na Matéria Seca Foliar. B - com base na Área Foliar.

Tabela 1. Valores dos RF de antocianinas presentes em *Hevea* spp., usando cromatografia descendente em papel, com três sistemas de solventes, BAW (Butanol-Ácido Acético-Água 4:1:5); AWH (Ácido Acético-Água-HCl, 15:82:3); FORESTAL (Ácido Acético-Água-HCl, 30:10:3). (1).

Amostra	BAW (6h)	BAW (12)	FORESTAL(12)	AWH (4h)
A		0,32 c	0,34 p	0,36 p
	0,36 p	0,36 p	0,58 c	0,54 c
	0,98 q	0,96 q	0,98 q	
B	0,33 c	0,30 c		
	0,44 p	0,39 p	0,58 c	0,56 c
	0,93 q	0,93 q	0,95 q	
C	0,33 c	0,30 c	0,32 p	0,39 p
			0,59 c	0,58 c
	0,93 q	0,92 q		0,92 q

(1) p = pelargonidina; c = cianidina; q = quemferol.

Tabela 2. Reações de cor das manchas, observadas à luz, visível (V) e Ultravioleta (UV), e tratadas com solução de Benedict (B), do cromatograma desenvolvido em três sistemas de solventes. (VM, Vermelho; VB, Vermelho Brilhante; VD, Verde, AZ, Azul; RX, Roxo; AM, Amarelo; p, Pelargonidina; c, Cianidina; q, Quemferol.

Amostra	BAW 6 h			BAW 12h			FORESTAL 4h			AWH 4 h		
	V	UV	B	V	UV	B	V	UV	B	V	UB	B
A	VM	RX	AZ ^C	VM	RX	AZ ^C	VM	VB	VD ^P	VM	VB	VD ^P
	AM	AM	AM ^q	AM	AM	AM ^q	VM	RX	AZ ^C	VM	RX	AZ ^C
B				+	RX		VM	VB	VD ^P	VM	VB	VD ^P
	VM	RX	AZ ^C	+	AZ		AM	AM	AM ^q			
	VM	VB	VD ^P				AM	AM	AM ^q			
	AM	AM	AM ^q	AM	AM	AM ^q						
C	VM	RX	AZ ^C	VM	RX	AZ ^C	VM	VB	VD ^P	VM	VB	VD ^P
	AM	AM	AM ^q	AM	AM	AM ^q	VM	RX	AZ ^C	VM	RX	AZ ^C
										AM	AM	AM ^q

Referências bibliográficas

- Carvalho, C. J. R. - 1977. Fisiologia. Parte III. In: SUDHEVEA FCAP. I Curso de Especialização em Heveicultura. Belém. 158 p.
- Creasy, L. L. - 1968a. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. **Phytochem.**, 7:441-446.
- - 1968b. The significance of carbohydrate metabolism in flavonoid synthesis in strawberry leaf disks. **Phytochem.**, 7: 1743-1749.
- - 1968c. The role of low temperature in anthocyanin synthesis in "McIntosh" apples. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 93: 716-724.
- Creasy, L. L. & Swain, T. - Flavan production in strawberry leaves. **Phytochem.**, 5:501-509.
- Downs, R. J. & Siegelman, H. W. - 1963. Photocontrol of anthocyanin synthesis in milo seedlings. **Plant Physiol.**, 38: 25-30.
- Eddy, B. P. & Mapson, L. W. - 1951. Some factors affecting anthocyanin synthesis in cress seedlings. **Biochem. J.**, 49: 694-699.
- Erlanson, J. A. & Wrolstad, R. E. - 1972. Degradation of anthocyanins at limited water concentration. **J. Food Sci.**, 37: 592-595.
- Figari, A. - 1965. Substancias fenólicas tóxicas al hongo *Dothidella ulei* en hojas de clones de *Hevea brasiliensis*. **Turrialba**, 15: 103-110.
- Gage, T. B.; Douglass, C. D.; Wender, S. H. - 1951. Identification of flavonoid compounds by filter paper chromatography. **Anal. Chem.**, 22: 1582-1585.
- Geissman, T. A. - 1955. Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water-soluble plant pigments. In: Paech, K. & Tracey, M. V. (eds.). **Modern Methoden der Pflanzenanalyse**. Berlin, Springer-Verlag. v. III. p. 450-498.
- Goodwin, T. W. & Mercer, E. L. - 1983. **Introduction to plant biochemistry**. New York, Pergamon Press. 677 p.
- Grommeck, R. & Markakis, P. - 1964. The effect of peroxidase on anthocyanin pigments. **J. Food. Sci.**, 29: 53-57.
- Harborne, J. B. - 1958. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. **J. of Chromat.**, 1: 473-488.
- - 1980. Flavonoids. In: Heskettie, J. D. & Jones, J. W. (eds.). **Phytochemistry**. New York, CRC Press, v. I. p. 344-380.
- Hashim, I.; Chee, K. H.; Wilson, L. A. - 1980. The relationship of phenols and oxidative enzymes with the resistance of *Hevea* to south american leaf blight. **Phytopath. Z.**, 97: 332-345.
- Ku, Ping-Kaung & Mancinelli, A. L. I. - 1972. Action of short, prolonged, and intermittent irradiations on the formation of anthocyanins in cabbage, mustard, and turnip seedlings. **Plant Physiol.**, 49: 212-217.
- Martins, E. M. F.; Moraes, W. B. C.; Cardoso, R. M. G.; Kuc, J. - 1970. Purificação e identificação de uma substância ligada à resistência de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) ao fungo *Dothidella ulei* P. Henn. **Biológico**, 36: 112-114.
- Moraes, V. H. F. - 1982. Fisiologia. Parte I. In: SUDHEVEA/FCAP. **Curso de Especialização em Heveicultura**. Belém. 54 p.

- Siegelman, H. W. & Hendricks, S. B. - 1958. Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. **Plant Physiol.**, 33: 185-190.
- Taylor, F. J. - 1970. Some aspects of the development of mango (*Mangifera indica* L.) leaves. **New Phytol.**, 69: 377-394.

(Aceito para publicação em 12.06.1987)