

Isoflavonóides em *Medicago sativa* cv. *creoula* e nutrição controlada em nitrogênio

Isoflavonoids in *Medicago sativa* cv. *creoula* and nitrogen supply control

T. Castilhos¹, E. de Sá², J. J. Freire² & J. A. S. Zuanazzi¹

RESUMO - Este trabalho pesquisou o cultivo da forrageira *Medicago sativa* cv. *creoula* em vasos de Leonard e casa de vegetação, contendo soluções nutritivas diferentes em dois grupos testados. Um, com solução limitante em nitrogênio assimilável e outro com quantidades satisfatórias de nitrogênio para o desenvolvimento da planta. As culturas cresceram durante 10 semanas e tiveram analisados o conteúdo em dois flavonóides (ononina e formononetina) em extratos de raízes e exsudatos. As análises foram desenvolvidas empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência. Foi verificado um aumento na produção e excreção destas isoflavonas quando o vegetal cresce em meio limitante em nitrogênio.

PALAVRAS-CHAVE - Isoflavonóides, nutrição controlada, nitrogênio.

ABSTRACT - This work studied the cultivated forage crop *Medicago sativa* cv. *creoula* in Leonard jars and in a green house, containing different nutrient solutions in two tested groups: with limited and nonlimited nitrogen supply for the plant development. Its grow for 10 weeks and two flavonoids (ononin and formononetin) were analyzed in extratcts of roots and exsudates. Using high performance liquid chromatography, it was verified an increase in the production and excretion of these isoflavonoids when the plant grow in nutrient solution with nitrogen limitant.

KEYWORDS - Isoflavonoids, supply control, nitrogen.

INTRODUÇÃO

Alguns flavonóides presentes em plantas da família das leguminosas podem interagir com microorganismos presentes no solo. Estes metabólitos estão implicados em reações de defesa (fitoalexinas), como quimioatraentes para bactérias patogênicas e simbióticas ou ainda como indutores de genes em bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (rizóbios) (Peters e Verma, 1990; Sallaud *et al.*, 1997). A produção de flavonóides pelo vegetal parece ser regulada pela presença ou não de nitrogênio no solo (Coronado *et al.*, 1995) e células de *Medicago* em suspensão foram capazes de produzir diferentes níveis de fiotalexinas (flavonóides) contra diferentes eliciadores (fator Nod), implicados em simbiose com rizóbios (Savouré *et al.*, 1997) Estudos recentes com *Medicago sativa* subsp.

varia cv A2 confirmam a presença de flavonóides como responsáveis pela atividade indutora em genes *nod* de bactérias simbióticas, demonstrando que somente flavonóides estão presentes nestes extratos de plantas capazes de induzir estes genes (Zuanazzi *et al.* 1998). A função de isoflavonóides como formononetina e seu conjugado glicosilado, ononina, em extratos de *Medicago* não é clara, mas sua presença nos extratos analisados, sugere uma mudança grande no organismo do vegetal, ainda não bem elucidado. Além disso, seu aumento nas raízes da planta dependente da presença do nitrogênio assimilável, parece indicar alguma relação com a fixação deste nutriente. Neste trabalho demonstramos que em duas formas diferentes de cultivo, pobre e rico em nitrogênio, raízes e exsudatos de *Medicago sativa* cv. *creoula*, forrageira muito

utilizada em agropecuária, apresentam um teor de formononetina e ononina aumentado, respectivamente, analisados via cromatografia líquida de alta eficiência.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura do vegetal

As sementes de *Medicago sativa*, cv *creoula* foram desinfetadas, permanecendo 30 segundos em álcool etílico (96%) e em seguida mais 60 segundos em solução hipoclorito de sódio 1%, sendo posteriormente lavadas 7 vezes com água estéril. Após então, as sementes foram colocadas a germinar em papel filtro em estufa à 28°C por 48 horas. Depois disso, foram escolhidas as que apresentaram melhor germinação e colocadas em crescimento em casa de vegetação dentro de vasos de Leonard esterilizados (Somasegaran e Hoben, 1994) e uma pro-

Recebido em 24/7/2000

¹Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Ipiranga, 2752 - Porto Alegre, RS - 90.610-000

²Faculdade de Agronomia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Bento Gonçalves, 7712 - Porto Alegre, RS - 91.501-970

porção de areia e carvão de 3:1, respectivamente. Assim, tivemos uma parte das plantas (18 vasos - contendo 3 plantas cada) contendo solução nutriente normal (não limitante em nitrogênio- 13,8mM KNO₃ - Blondon, 1964) e o mesmo número com solução limitante em nitrogênio (1 mM KNO₃). O cultivo durou 10 semanas, findo o qual os exsudatos e raízes foram recolhidos para preparação dos extratos.

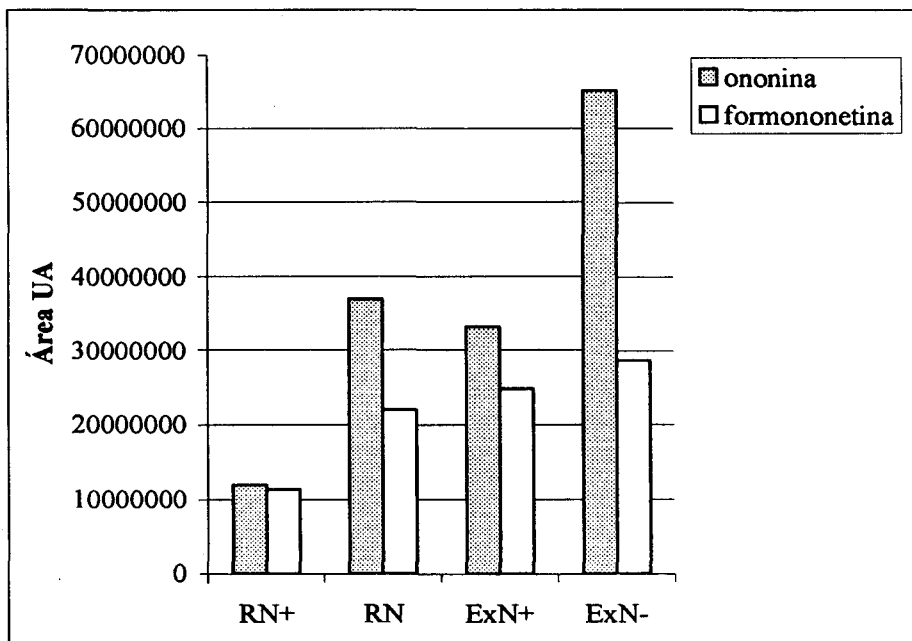
Preparação dos extratos

Os exsudatos foram obtidos lavando-se a fase sólida dos vasos com etanol 96%, e em seguida eliminado o etanol em rota-vapor. A água remanescente foi eliminada por liofilização. As raízes foram moídas. O liofilizado dos exsudatos e as raízes moídas foram posteriormente maceradas em etanol 96%. Após 48 horas o macerado foi filtrado e o remanescente colocado novamente em maceração. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Os filtrados reunidos, tiveram eliminado o solvente em aparelho de rota-vapor, posteriormente re-suspendidos em água e extraídos com diclorometano. Eliminado o solvente, os extratos foram pesados e diluídos em MeOH à 100 mg/mL para análise em CLAE.

Análise em cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras (10µL) foram injetadas em coluna Waters NovaPack C18, medindo 3,9x150mm, com diâmetro de partícula de 4µm, sob fluxo de 1 mL/min, protegida por pré-coluna. O sistema empregado foi de gradiente linear, iniciando com MeOH:H₂O:TFA (30:70:0,05, V/V/V) passando a MeOH:TFA (100:0,05 V/V) durante 15 minutos. No final, 5 minutos de desenvolvimento isocrático completou a análise total de 20 minutos por injeção. Foi empregado módulo de separação Waters Alliance 2690, com injetor automático e detector UV variável por arranjo de diodos Waters 996 (entre 200 e 400 nm), com uma leitura a cada 1,8 segundos e 4,8 nm de resolução. O sistema de controle e gerenciamento de dados empregado foi um Waters Millennium V.2.15.01.

GRÁFICO I



Presença de ononina e formononetina em exsudatos e extratos de raízes de *Medicago sativa cv creoula*. As áreas referem-se aos picos dos flavonóides analisados em cromatograma (CLAE) à 250 nm. R: raízes, Ex: exsudatos, N+: crescimento em meio não carente em nitrogênio, N-: crescimento em meio carente em nitrogênio.

Soluções de referência

Amostras de ononina e formononetina de procedência Extrasynthèse (França), foram cromatografadas em CLAE no mesmo sistema que os extratos e exsudatos de vegetal em concentrações de 10 mg/mL. Para cada solução de referência foram injetadas 10µL. As soluções de flavonóides foram co-injetadas com os extratos vegetais e o UV (200-400 nm) dos picos obtidos em cromatogramas diferentes foram comparados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos permitem observar que da mesma forma que outros cultivares de *Medicago* (Harrison e Dixon, 1993; Dakora et al., 1993; Zuanazzi et al., 1998), *Medicago sativa cv creoula*, contém grandes quantidades de isoflavonóides. Dois conhecidos isoflavonóides, formononetina e ononina, foram identificados nos exsudatos e extratos de raízes da planta. Os flavonóides foram identificados empregando-se análises em CLAE com soluções referência co-injetando os flavonóides e extratos de vegetais. O tempo de retenção obtido para a ononina neste sistema cro-

matográfico foi de 6 minutos e para a formononetina, 10 minutos. Além da superposição dos picos, foram analisados os perfis dos espectros na região do ultravioleta, entre 200 e 400 nm dos picos em cromatogramas diferentes, havendo superposição total dos espectros obtidos nas soluções de referência e extratos vegetais. Conclui-se, assim, a presença dos isoflavonóides ononina e formononetina em todos os extratos vegetais analisados (raízes e exsudatos).

Uma maior quantidade destes flavonóides ocorre quando o vegetal desenvolve-se em carência de nitrogênio assimilável. Da mesma forma que nas raízes, quando o meio está pobre em nitrogênio (N-) há um aumento na produção e excreção dos dois isoflavonóides, para o meio (exsudato). (Gráfico I).

Embora a planta produza e exsude mais isoflavonóides quando está carente de nutrição nitrogenada demonstrado aqui, é surpreendente a fato de a planta exsudar ononina e formononetina de suas raízes, mesmo quando o vegetal cresce com fornecimento normal de nitrogênio (N+). Sem dúvida, pode-se supor uma importância muito grande destes metabólitos em mecanismos de defesa e/ou in-

teração com micro-organismos em *Medicago*. Sua variação, aqui relacionada com a nutrição nitrogenada pode indicar a possibilidade de implicação destes metabólitos com a fixação de nitrogênio atmosférico. Os flavonóides indutores conhecidos neste gênero pertencem às classes das flavononas, flavonas e chalconas (Györgypal *et al.*, 1991; Hartwig *et al.*, 1990). Há somente um relato de indução de genes implicados na fixação de nitrogênio por isoflavonóides (ononina) em *Medicago* (Léon-Barrios *et al.*, 1993). Todavia, em outro trabalho esta atividade não foi verificada, nem com extratos nem com formononetina, ononina e seu derivado malonil isolados (Coronado *et al.*, 1995). Embora formononetina e ononina aparentemente não sejam responsáveis pela ativação de genes *nod*, sua presença em exsudatos vegetais e sua relação com o aumento e diminuição de nitrogênio na nutrição vegetal, pode sugerir algum tipo de participação neste processo complexo. Zuanazzi e colaboradores (1998) sugerem a presença de substâncias presentes em exsudatos de *Medicago* capazes de inibir a indução dos genes atuantes no processo de nodulação, corroborando a idéia de que o vegetal possui o controle do processo simbiótico (Coronado *et al.*, 1995). Embora não tenha sido comprovado nenhum efeito ativador ou

inibidor de genes de nodulação por estes isoflavonóides em *Medicago*, o esclarecimento da causa de sua alteração conforme o meio nutritivo, poderá abrir caminho para a melhor compreensão do processo de fixação de nitrogênio e/ou defesa do vegetal.

CONCLUSÃO

O vegetal *Medicago sativa* cv. *creoula* produz um aumento dos isoflavonóides ononina e formononetina em quantidade, nas raízes e exsudatos, quando cresce em meio nutritivo limitante em nitrogênio. Este aumento pode estar implicado em processos de defesa do vegetal ou ainda em mecanismos de simbiose com rizóbios e fixação de nitrogênio atmosféricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blondon, F. Contribution à l'étude du développement de graminées fourragères: ray-grass et dactyle. *Rev. Gén. Bot.* 71: 293-381.
2. Coronado, C.; Zuanazzi, J.A.S.; Sallaud, C.; Quirion, J.-C.; Esnault, R.; Husson, H.-P.; Kondorosi, A. & Ratet, P. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiol.* 108:533-542, 1995.
3. Dakora, F. D.; Joseph, C. M. & Phillips, D. A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.*, 101:819-824. 1993.
4. Györgypal, Z.; Kiss, G. G. & Kondorosi, A. Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* Nod proteins. *Bioassays.* 13(11):575-581.1991.
5. Harrison, M. J. & Dixon, R. A. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6: 643-654.1993.
6. Hartwig, U. A.; & Maxwell, C. A.; Joseph, C. M. & Phillips, D. A. Chrysoeril and luteolin released from alfalfa seeds induce *nod* Genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 92: 116-122, 1990.
7. Léon-Barrios, M.; Dakora, F. D.; Joseph, C. M. & Phillips, D. A. Isolation of *Rhizobium meliloti* nod Gene induces from alfalfa rhizosphere soil. *Am. Soc. Microb.* 59(2): 636-639. 1993.
8. Peters, N. K. & Verma, D. P. S. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3: 4-8, 1990.
9. Sallaud, C.; Zuanazzi, J.; El-Turk, J.; Leymarie, J.; Breda, C.; Buffard, D.; de Kozak, I.; Ratet, P.; Husson, P.; Kondorosi, A. & Esnault, R. Gene expression is not systematically linked to phytoalexin production during alfalfa leaf interaction with pathogenic bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10(2): 257-261. 1997.
10. Savouré, A.; Sallaud, C., El-Turli, J.; Zuanazzi, J.; Ratet, P.; Schultze, M.; Kondorosi, A.; Esnault, R. & Kondorosi, E. Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. *The Plant J.* 11(2): 277-287. 1997.
11. Somasegaran, P. & Hoben, H.J. *Handbook for Rhizobia: Methods in legume Rhizobium technology*, Springer-Verlag, New York, 450 p. 1994.
12. Zuanazzi, J.A.S.; Clergeot, P.-H.; Quirion J.-C.; Husson, H.-P., Kondorosi, A. & Ratet, P. Production of *Sinorhizobium meliloti* nod Gene actin factor and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11(8): 784-794. 1998.

Atividade citotóxica e antileishmanial do pericarpo da *Anona muricata*

M. C. Jaramilho *et al*
Fitoterapia 71(2): 183-186, 2000

A *Anona muricata* é conhecida, no Brasil, pelo nome popular de graviola. Nesse trabalho, os autores demonstraram que o pericarpo do fruto possui atividade citotóxica e é ativo contra as lesões causadas pela *Leishmania brasiliensis* como antimonial usado atualmente. Na fração ativa, foram isolados e identificados três acetogoninas.

Ação hipotensora em roedores pelo nangapiry, um produto natural do Paraguai

K. Morioca *et al*
Phytomedicine 7(2): 99-103, 2000

A *Eugenia uniflora*, o nangapiry no Paraguai e pitangueira no Brasil, foi empregado no estudo da atividade hipotensora do extrato aquoso das folhas.

A atividade observada foi atribuída à dilatação arterial e relaxamento cardíaco.