# INFLUÊNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS NA BIOSSÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FEIJÃO

Julie Wisniewski (PIBIC/FA), Ana Carolina M. Hacke, Romaiana P. Pereira, Rafael M. Etto (Orientador), e-mail: mazeretto@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química

**Área: Ciências Biológicas; Subárea: Bioquímica.**

**Palavras-chave:** BPCP, metabolismo, produtos naturais.

## Resumo

O feijão é uma leguminosa que traz diversos benefícios para a saúde, possui em sua composição fenólicos e flavonoides e possui também atividade antioxidante. O uso de biofertilizantes é uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos, porém os mecanismos pelos quais as bactérias promotoras do crescimento vegetal atuam, ainda não são totalmente conhecidos. Neste estudo, determinou-se a concentração de compostos fenólicos e de flavonoides e estudou-se a atividade antioxidante por três diferentes métodos nas amostras obtidas por extrações hidroalcoólicas e etanólicas, do feijão não inoculado e inoculado com a bactéria *Rhizobium tropici*. De forma geral, os extratos etanólicos apresentaram uma menor concentração de compostos fenólicos e flavonoides, além de não apresentarem atividade antioxidante nas concentrações testadas. Ao comparar os extratos hidroalcoólicos, pode-se observar que a inoculação com a bactéria modificou o metabolismo da planta, diminuindo a produção de polifenóis e a atividade antioxidante nos métodos testados.

## Introdução

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa amplamente cultivada e consumida, possui proteínas e nutrientes, trazendo benefícios para a saúde. Além destes, ele também possui compostos bioativos, como ácidos fenólicos e flavonoides, os quais estão relacionados a atividade antioxidante do feijão, como mostram alguns estudos na literatura (MARTÍNEZ et al., 2002).

O uso de fertilizantes químicos na agricultura traz malefícios a saúde e causa problemas ambientais, mas ainda são os principais responsáveis pelo aumento na produtividade e na qualidade do produto. O emprego de biofertilizantes é uma opção que pode contornar estes problemas, já que utiliza microrganismos vivos que melhoram o crescimento de plantas, reduzindo o efeito causado por organismos patogênicos (SHRIVASTAVA et al., 2015).

Estas bactérias são chamadas de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) e elas atuam por diferentes mecanismos, como fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo ou de outros minerais e síntese de enzimas que modulam o desenvolvimento da planta. Bactérias como *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* pertencem ao grupo de BPCP.

Com relação a influência da inoculação no conteúdo de metabolitos secundários, alguns estudos mostram um aumento ou diminuição destes compostos frente a inoculação com diferentes bactérias, mas ainda não se conhece totalmente os efeitos na atividade antioxidante (CAPPELLARI et al., 2013). Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e determinar o conteúdo

de metabolitos secundários do feijão comparando a amostra inoculada, com a bactéria *Rhizobium tropici*, com a não inoculada.

## Material e Métodos

### Obtenção das amostras de feijão:

As amostras de feijão, não inoculada e inoculada com a bactéria *Rhizobium tropici*, foram cultivadas na casa de vegetação da Agronomia (UEPG), durante 30 dias. As folhas foram coletadas em novembro de 2018 e secas em temperatura ambiente, em ausência de luz, durante 7 dias até peso constante.

### Obtenção do extrato hidroalcoólico e etanolico:

O extrato hidroalcoólico (H) e hidroalcoólico inoculado (H-I) foram preparados misturando as folhas ao etanol 70% (v/v). Para o preparo do extrato etanólico (E) e etanólico inoculado (E-I), misturou-se as folhas ao etanol 90% (v/v). Realizou-se a extração durante 7 dias, com agitação. Os extratos foram então filtrados e armazenados em frasco âmbar.

### Avaliação da composição química:

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras foi realizada com o reagente Folin-Ciocalteau, como descrito por Singleton et al. (1999). A curva de calibração foi construída com ácido gálico. A determinação do conteúdo de flavonoides totais foi realizada pela complexação com o alumínio, método descrito por Kosalec et al. (2004). A curva de calibração foi construída com quercetina.

### Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH•:

O método foi descrito por Brand-Williams et al. (2002). Os extratos, inoculado e não inoculado, foram diluídos em etanol nas seguintes concentrações: 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µL $mL^{-1}$. O controle positivo foi preparado com ácido ascórbico. Após 30 minutos de incubação, na ausência de luz, a leitura foi realizada a 518 nm, em um espectrofotômetro de placas.

### Avaliação da atividade antioxidante pelo método $ABTS^{\bullet+}$:

Este método foi descrito por Pellegrini et al. (1999). Os extratos foram utilizados nas mesmas concentrações do método anterior. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. A placa foi incubada por 30 minutos, na ausência de luz e a leitura foi realizada a 734 nm em um espectrofotômetro de placas.

### Ensaio do poder redutor:

O poder redutor dos extratos foi determinado pelo método descrito por Mathew e Abraham (2006). O ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Os extratos foram diluídos em etanol nas seguintes concentrações: 25, 50, 100, 250, 500 µg $mL^{-1}$. A leitura foi realizada a 700 nm em um espectrofotômetro de placas.

### Análise estatística:

Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente pela comparação das médias através do teste Student-Newman-Keuls, e $p < 0,05$ foi considerado significativo para todos os casos.


ISSN 1676-0093

## Resultados e Discussão

A análise dos dados obtidos nos métodos DPPH e ABTS foi realizada pelo cálculo do $CI_{50}$. Os valores de concentração dos compostos fenólicos e flavonoides totais e o $CI_{50}$ calculados nos métodos DPPH e ABTS estão apresentados na Tabela 1.

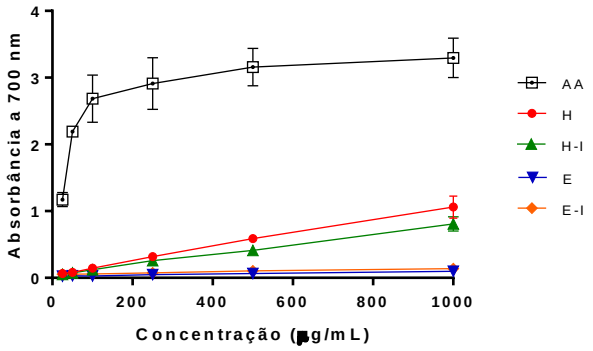
**Tabela 1** – Conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidantes dos extratos, inoculado e não inoculado, de feijão.

| | Fenólicos totais (mg AG**/ g)* | Flavonoides totais (mg QER**/ g)* | DPPH $CI_{50}$ ($\mu g\ mL^{-1}$)* | ABTS $CI_{50}$ ($\mu g\ mL^{-1}$)* |
|---|---|---|---|---|
| **AA** | - | - | 2,9±0,6 a | 6,1±0,1 a |
| **H-I** | 18,1±0,9 b | 2,2±0,2 b | 194,1±12,4 c | 146,6±3,5 c |
| **H** | 20,9±1,4 a | 9,1±0,7 a | 152,8±4,4 b | 112,4±5,9 b |
| **E-I** | 4,8±0,5 c | 1,5±0,4 b | >1000 | >1000 |
| **E** | 4,3±0,5 c | 1,9±0,5 b | >1000 | >1000 |

*Valores apresentados como a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes (a-c) diferem estatisticamente na mesma coluna (Newman-Keuls a $p < 0,05$).
**AG = ácido gálico, QER = quercetina.

A amostra não inoculada apresentou um teor estatisticamente maior de compostos fenólicos e flavonoides, diferindo da amostra inoculada, que apresentou uma diminuição na produção de polifenóis.
A atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos são maiores do que os extratos etanólicos ($CI_{50} > 1000$), nos métodos DPPH e ABTS. Foi observado um aumento da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico não inoculado com relação ao extrato hidroalcoólico inoculado em ambos os métodos.
A Figura 1 mostra os valores de absorbância em função das concentrações dos extratos de feijão obtidos no ensaio do poder redutor.

**Figura 1** – Poder redutor dos extratos H, H-I, E, E-I.




Pode-se dizer que, pelos métodos testados, o extrato hidroalcoólico não inoculado é o que possui maior atividade antioxidante.
A interação planta-bactéria pode ter alterado o metabolismo da planta, diminuindo o anabolismo dos compostos fenólicos e de flavonoides com consequente alteração da atividade antioxidante. Um estudo na literatura observou a diminuição da atividade antioxidante enzimática do feijão quando inoculado com a mesma bactéria, concordando com os resultados obtidos neste trabalho (TEJERA et al., 2004). Além disso, estudos onde a inoculação foi feita com outras bactérias, *Pseudomonas fluorescens* e *Azospirillum brasilense*, mostram o efeito contrário ao observado (CAPPELLARI et al., 2013).

**Conclusão/ões**

Este estudo demonstrou que a inoculação do feijão com a bactéria *Rhizobium tropici* diminuiu o teor de compostos fenólicos e de flavonoides e consequentemente a atividade antioxidante dos extratos, nos métodos empregados. Indicando que a interação planta-bactéria alterou o metabolismo da planta, diminuindo a produção destes compostos antioxidantes. Estudos sobre quais compostos foram alterados, poderiam ser úteis para compreender melhor os mecanismos envolvidos na ação desta bactéria.

**Agradecimentos**

UEPG, PIBIC, Fundação Araucária, LABMOM/UEPG.

**Referências**

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenchaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CAPPELLARI, L. R.; SANTORO, M. V.; NIEVAS, F.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E.; Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 16-22, 2013.

KOSALEC, I.; BAKMAZ, M.; PEPELINIAK, S.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S., Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta Pharmaceutica**, v. 54, p. 65-72, 2004.

MARTÍNEZ, A. C.; PIÑA, G. L.; OOMAH, B. D. Antioxidant Activity in Common Beans (Phaseolus vulgaris L.). **Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6975-6980, 2002.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (Cinnamomum verum) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chemistry**, v. 94, p. 520-528, 2006.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379-389, 1999.

SHRIVASTAVA S.; EGAMBERDIEVA D.; VARMA, A. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. **Soil Biology**, v. 42, p. 1-43, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTO, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

TEJERA, N. A.; CAMPOS, R.; SANJUAN, J.; LLUCH, C. Nitrogenase and antioxidante enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 329-338, 2004.