

SILVIO C. DA COSTA

**EFEITO DO ISOESTEVIOL, COMO SUBSTRATO  
INESPECÍFICO, SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS  
DE *FUSARIUM MONILIFORME***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

CURITIBA

1991

Tese orientada pelo professor

Dr. *MAURO ALVAREZ*

Agradeço as Instituições patrocinadoras deste trabalho, CNPq e Concitec.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero expressar os meus agradecimentos a todos os professores e funcionários dos Departamentos de Bioquímica e Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá e do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Em especial gostaria de agradecer:

- . ao Professor Doutor Mauro Alvarez, pela orientação segura deste trabalho e principalmente por sua ajuda eficiente, constante e amigável durante o desenrolar das atividades e sobretudo na fase final;
- . ao Professor Sérgio Paulo Severo de Souza Diniz pela disponibilidade para discussões e ajuda em muitos dos experimentos realizados;
- . ao Professor José Domingos Fontana, pelas análises em

GLC do padrão do isoesteviol;

- . a Sra. Leonita Cristina Kawanichi pela amizade, pela boa vontade e ajuda sempre constante e segura na parte de computação;
- . a minha querida Cecília, pela paciência demonstrada na convivência diária e no apoio efetivo na superação de todas as dificuldades;
- . aos meus pais que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os momentos;
- . a todas aquelas pessoas que se mostraram verdadeiramente amigas e que colaboraram sobre diversos aspectos, o meu muito obrigado.

## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	01
1.1.	Histórico.....	01
1.2.	Nomenclatura.....	08
1.3.	Biossíntese de Giberelinas.....	10
1.3.1.	Formação do ent-caureno.....	11
1.3.2.	Formação do GA12-aldeído a partir do caureno...	14
1.3.3.	Via posterior ao GA12-aldeído.....	15
1.3.3.1.	Via posterior ao GA12-aldeído em plantas.....	15
1.3.4.	Via posterior da GA12-aldeído em <i>Gibberella</i> <i>fujikuroi</i> .....	17
1.4.	Metabolismo de Substrato Inespecífico.....	18
1.4.1.	Metabolismo de steviol por cepas de <i>Gibbe-</i> <i>rella fujikuroi</i> .....	19
1.4.2.	Metabolismo do isoesteviol por cepas de <i>Gibberella fujikuroi</i> .....	20
1.5.	Objetivos.....	21
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.1.	Materiais.....	22
2.1.1.	Microorganismos.....	22
2.1.2.	Obtenção do isoesteviol - Testes do grau de pureza.....	22
2.1.3.	Reagentes.....	23
2.1.4.	Sementes de Arroz ( <i>Oryza Sativa</i> L) para biotestes.....	23

2.1.5	Semestres de Alface ( <i>Lactuca sativa</i> ) para biotestes.....	23
2.2.	Métodos.....	24
2.2.1.	Preparação dos meios de cultura para <i>Fusarium moniliforme</i> .....	24
2.2.1.1.	Meio de Cultura BDA (sólido).....	24
2.2.1.2.	Cultura em meio BD.....	25
2.2.1.3.	Cultura em meio sintético ICI.....	25
2.2.2.	Determinação dos parâmetros metabólicos.....	27
2.2.2.1.	Determinação da massa micelial úmida.....	27
2.2.2.2.	Determinação do teor de amido.....	27
2.2.2.3.	Teor de carboidratos totais.....	27
2.2.2.4.	Teor de glucose.....	27
2.2.2.5.	Teor de proteínas.....	28
2.2.3.	Extração dos produtos metabólicos.....	28
2.2.4.	Determinação do efeito giberelínico.....	28
2.2.4.1.	Bioteste do arroz.....	28
2.2.4.2.	Bioteste do hipocótilo do alface.....	29
2.2.5.	Análises cromatográficas.....	30
2.2.5.1.	Análises do isoesteviol (HPLC).....	30
2.2.5.2.	Análise do ácido giberélico (HPLC).....	31
2.2.5.3.	Cromatografia em camada delgada (TLC).....	31
3.	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	32
3.1	Padrão de Isoesteviol - Caracterização cromatográfica.....	32
3.1.1.	Em HPLC.....	32
3.1.2.	Em GLC.....	32

3.2.	Padrão de GA <sub>3</sub> - Caracterização cromatográfica.....	37
3.2.1.	Em HPLC.....	37
3.2.2.	Em TLC.....	37
3.3.	Bioteste para determinação do efeito giberélico.....	37
3.3.1.	Padronização do bioteste com plântulas de Arroz.....	37
3.3.2.	Padronização do Bioteste com hipocótilo de Alface.....	39
3.4.	Caracterização metabólica do isolado UEM.....	41
3.4.1.	Influência do Inóculo no Crescimento Micelial.....	41
3.4.2.	Cultivo do isolado UEM em meio BD - Parâmetros metabólicos.....	46
3.4.3.	Determinação da presença de GA <sub>3</sub> no meio de cultura.....	49
3.4.3.1.	Em TLC.....	49
3.4.3.2.	Em HPLC.....	50
3.4.4.	Bioteste do arroz com extratos da cultura do isolado UEM .....	52
3.4.5.	Bioteste do hipocótilo do alface com extratos da cultura do isolado UEM.....	53
3.5.	Influência do isoesteviol como substrato inespecífico sobre parâmetros metabólicos do isolado UEM.....	55
3.5.1.	Cultivo do isolado UEM em presença de	



	isoesteviol.....	55
3.5.2.	Consumo do isoesteviol no cultivo do isolado UEM.....	56
3.5.3.	Análise em TLC dos extratos dos cultivos realizados em presença do isoesteviol .....	62
3.5.4.	Determinação de giberelinas através de cromatografia líquida de alta resolução.....	64
3.5.5.	Bioteste do arroz.....	68
3.6.	Bioteste Demonstrando o Efeito do Isoes- teviol sobre a ação do ácido Giberélico .....	72
3.7.	Determinação da faixa de concentrações de isoesteviol determinantes da inibição.....	77
3.7.1.	Cultivo do isolado UEM em meio sintético ICI...	77
3.7.2.	Análise em TLC dos extratos dos cultivos do isolado UEM em meio sintético ICI.....	78
3.7.3.	Determinação do teor de GA <sub>3</sub> através de HPLC....	80
3.7.4.	Determinação do ácido caurenóico.....	82
3.7.5.	Bioteste do hipocótilo do alface.....	86
4.	CONCLUSÕES.....	90
5.	BIBLIOGRAFIA.....	92

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Estrutura das GAS (GA <sub>1</sub> -GA <sub>68</sub> ).....	03
2. Estruturas de precursores de GAS e similares.....	09
3. Estruturas do GA <sub>3</sub> -Série C19 (I) e do GA <sub>13</sub> -Série C20 (II).....	10
4. Via biossintética do mevalonato ao ent-caureno.....	12
5. Estruturas químicas de 03 inibidores de cres- cimento, AMO 1618 (I); Fosfon-D (II) e CCC (III)....	13
6. Transformação do ent-caureno em GA12-aldeído.....	14
7. Biossíntese de GAS depois de GA12-aldeído em sementes imaturas de <i>Pisium satium</i> .....	16
8. Vias biossintéticas de GAS após GA12-aldeído estabelecidas para <i>Gibberella fujikuroi</i> .....	17
9. Metabolismo do steviol por <i>Gibberella fujiku- roi</i> B <sub>141a</sub> .....	19
10. Cromatograma em TLC do isoesteviol padrão.....	33
11. Análise em GLC (Cap-MS) da amostra de isoes- teviol per-sililado.....	34
12. Perfil cromatográfico em HPLC do ácido gibe- rélico padrão.....	35
13. Cromatograma em TLC do GA <sub>3</sub> padrão.....	36

14.	Medida do comprimento de plântulas de arroz da variedade IRGA 410.....	38
15.	Curvas de crescimento do isolado UEM em meio BD.....	43
16.	Curvas de crescimento do isolado UEM em meio BD.....	44
17.	Curvas demonstrando a velocidade do crescimento do cultivo do isolado UEM em meio BD.....	45
18.	Determinação dos parâmetros metabólicos do cultivo do isolado UEM em meio BD.....	47
19.	Consumo de amido pelo cultivo do isolado UEM em meio BD.....	48
20.	Perfil cromatográfico em HPLC do extrato do cultivo do isolado UEM.....	51
21.	Efeito do extrato da cultura do isolado UEM após 360 horas do cultivo sobre o comprimento de plântulas de arroz.....	53
22.	Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM em presença de isoesteviol na concentração de 1 mg/ml.....	57
23.	Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM cultivado em meio BD na ausência de isoesteviol (controle) obtido no tempo zero.....	58
24.	Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM em presença de isoesteviol na concentração de 1 mg/ml.....	59
25.	Curva demonstrando a cinética do metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM cultivado em meio BD.....	60

26.	Cromatograma em HPLC do ácido giberélico padrão.....	65
27.	Cromatograma em HPLC do extrato do cultivo do isolado UEM em presença de isoesteviol na concentração de 1 mg/ml.....	66
28.	Efeito do ácido giberélico (10 ug/ml) sobre o hipocótilo do alface na presença de isoesteviol (10 ug/ml) e do produto do metabolismo do isoesteviol (10 ug/ml) pelo isolado UEM em meio BD..	73
29.	Efeito do ácido giberélico sobre plântulas de arroz tratadas com isoesteviol.....	75
30.	Efeito do ácido giberélico sobre plântulas de arroz tratadas com o produto do metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM.....	76
31.	Efeito do isoesteviol na faixa de concentração de 0,03 - 3 mMolar sobre a produção de ácido giberélico pelo isolado UEM cultivado em meio sintético ICI.....	81
32.	Cromatograma em HPLC do ácido caurenóico padrão.....	83
33.	Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM cultivado na ausência de isoesteviol (cultura controle) por um período de 7 dias....	84
34.	Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM cultivado em presença de isoesteviol na concentração de 3 mMolar por um período de 7 dias.....	85

## LISTA DOS QUADROS

QUADRO	PÁGINA
I- Efeito do ácido giberélico padrão na faixa de 0,5 a 20 ug/ml sobre o comprimento do hipocótilo de plântulas de alface.....	40
II- Cromatografia em camada delgada do ácido giberélico padrão e dos extratos da cultura do isolado UEM após 120, 210 e 360 horas de cultivo...	50
III- Efeito do extrato da cultura do isolado UEM após 360 horas de cultivo sobre o comprimento do hipocótilo de plântulas de alface.....	54
IV- Cromatografia em camada dos extratos da cultura do isolado UEM, cultivados na presença de isoesteviol e na ausência de isoesteviol.....	63
V- Comprimento das plântulas de arroz após 90, 120 e 169 horas de tratamento com extratos da cultura do isolado UEM cultivado em presença de isoesteviol.....	69
VI- Cromatografia em camada delgada dos extratos na concentração de 1 mg/ml dos cultivos do isolado UEM em meio sintético ICI.....	79

VII- Efeito dos cultivos do isolado UEM, cultivados em meio sintético ICI na presença de isoesteviol na faixa de 0,03 a 3,0 mMolar, sobre o comprimento do hipocótilo de plântulas de alfãçe..... 87

## RESUMO

Estudos foram realizados com a finalidade de obter uma cepa de *Fusarium moniliforme* que fosse capaz de produzir ácido giberélico em seu meio de cultura e observar os parâmetros metabólicos básicos e a ação de substratos inespecíficos sobre os mesmos.

Entre as diversas cepas analisadas, uma denominada de isolado UEM, coletada de plantações de trigo no Norte do Paraná, mostrou-se capaz de produzir ácido giberélico tanto em meio BD como em meio sintético (meio ICI). Sua capacidade para produção de massa celular e consumo de glucose, amido e proteína também foi medida.

Como substrato inespecífico foi usado o isoesteviol, um diterpeno tetracíclico obtido por hidrólise ácida do steviosídeo, um glicosídeo diterpenico extraído da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. O isoesteviol, provavelmente devido a sua similaridade estrutural com giberelinas, induziu uma forte mudança metabólica, inibindo completamente a produção de giberelinas. Foi demonstrado também, que houve acúmulo de ácido caurenóico e que os produtos metabólicos do isoesteviol promovem ação anti-giberélica nos bioteste com plântulas de arroz e com hipocótilo de alface. Não foi observado a mudança em outros parâmetros metabólicos.

## ABSTRACT

Several studies were done for obtention of a *Fusarium moniliforme* strain which would be able to produce gibberellic acid in its culture medium, to observe its basic metabolic parameters and analyse the action of inspecific metabolites on those parameters.

Among several analysed strains, one, called isolated UEM, collected in Paraná Northern from wheat plantations, showed gibberellin production in a good way in complex medium (PD medium) well as in sintetic medium (ICI medium). Its capacity for cellular mass production and, glucose, starch and protein uptake was also measured.

As inspecific metabolite was used the isoesteviol, a tetracyclic diterpene obtained by an acidic hidrolyses of steviosídeo, a diterpenic glicoside extracted from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. The isosteviol, probably due to its structural similarity with gibberellins, induced a strong change in that metabolic pathway inhibiting completely the gibberellins production. It was also shown that there was an accumulation of caurenolic acid and that metabolic products from isosteviol promote an antigibberellic action on rice seedling and lettuce hypocotile biotests. There was not observed change in other metabolic parameters.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - Histórico

No Japão se conhece há mais de 150 anos uma doença chamada **Bakanae** (plantinha boba), que afeta as plantas de arroz (*Oriza Sativa* L.) provocando um alongamento excepcional das plântulas. No início do século XX, um extensivo programa de pesquisa por causa da doença **Bakanae** foi iniciado. Patologistas japoneses primeiro demonstraram a conexão da doença com o fungo *Fusarium heterosporum* Ness que infectava as plantas doentes, mais tarde identificado como *Fusarium moniliforme* Sheld em seu estágio imperfeito e como *Gibberella fujikuroi* em seu estágio final. SAWADA (1912) postulou que a doença podia ser causada por alguma substância secretada pelo fungo. KUROSAWA (1926) deu suporte experimental a este postulado, quando conseguiu estimular o crescimento exagerado de plântulas de arroz, milho, sésamo e aveia utilizando filtrados estéreis do meio de cultura no qual o fungo havia se desenvolvido.

YABUTA (1935) , da Universidade de Tóquio denominou de giberilina o fator ativo nos filtrados de *Gibberella fujikuroi*. YABUTA & SUMIKI (1938) purificaram parcialmente o fator ativo, obtendo duas substâncias biologicamente ativas que eles denominaram de Giberelinas A e B.

Os trabalhos japoneses a respeito de giberelinas permaneceram desconhecidos no ocidente até aproximadamente o

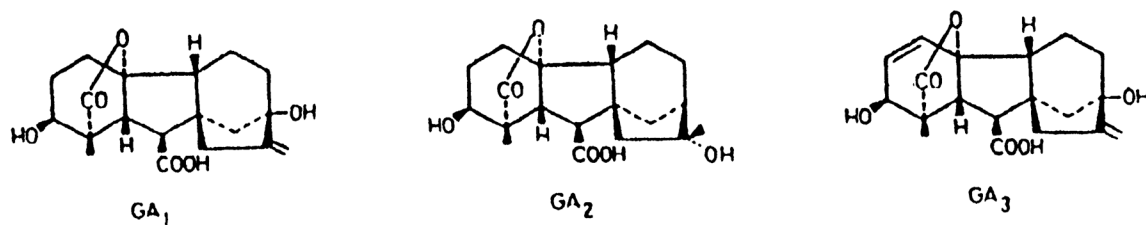
início da década de 50, quando se tornaram disponíveis em inglês.

Em 1954, pesquisadores britânicos da Imperial Chemical Industries Ltda (ICI), isolaram um princípio ativo de *Gibberella fujikuroi* que exibia atividade promotora do crescimento de plantas (CURTIS & CROSS, 1954). O composto apresentava atividade biológica similar àquelas apresentadas pelas GAs isoladas pelos japoneses, mas a natureza química era claramente diferente. Os pesquisadores denominaram a nova substância isolada de ácido giberélico. Em 1955, um grupo de pesquisadores da "Northem Regional Research Laboratories (NRRL)" dos Estados Unidos, reportaram a separação da Giberelina A obtida por eles em dois componentes, sendo um denominado de Giberelina X e o outro de Giberelina A (STODOLA et al., 1955). Naquele mesmo ano pesquisadores da Universidade de Tóquio reinvestigaram a pureza da Giberelina A obtida por eles e reportaram a separação de três Giberelinas: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> (TAKAHASHI et al., 1955).

A comparação direta entre as várias substâncias isoladas pelos três grupos demonstrou que a Giberelina A<sub>1</sub> (Universidade de Tóquio) e a Giberelina A (grupo NRRL) eram idênticas; o ácido giberélico (grupo ICI), a Giberelina X (grupo NRRL) e a Giberelina A<sub>3</sub> (Universidade de Tóquio) eram idênticas; e a Giberelina A<sub>2</sub> era uma nova substância. A estrutura do ácido giberélico ou GA<sub>3</sub>, como é conhecido atualmente, foi elucidada somente em 1956. Descobriu-se (WEST & PHINNEY, 1956; RADLEY, 1956) que giberelinas são substâncias

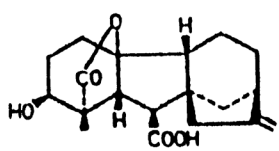
naturais dos tecidos das plantas superiores, porque até então, este grupo de compostos representados pelo ácido giberélico ( $GA_3$ ), que já era produzido em larga escala e disponível comercialmente na Grã-Bretanha, era reconhecido mais como uma toxina fúngica do que como uma substância promotora do crescimento de *per se*. Logo se percebeu que o ácido giberélico disponível comercialmente era na verdade uma secreção que continha várias giberelinas, sendo que a mais abundante era o ácido giberélico ou  $GA_3$ .

A primeira giberelina ( $GA_1$ ) quimicamente pura foi isolada somente em 1958 (MACMILLAN & SUTER, 1958)<sup>1</sup>. Em 1961 nove giberelinas já haviam sido isoladas (STUART & CATHEY, 1961). Quando PELAG (1965) revisou este assunto o número de giberelinas conhecidas era somente de treze, entretanto, o número de giberelinas aumentou para 29 nos cinco anos seguintes (LANG, 1970). Até 1985, 68 giberelinas já haviam sido identificadas (Figura-1), sendo que uma nomenclatura simples foi adotada ( $GA_1$  a  $GA_{68}$ ) e as novas estruturas que forem sendo caracterizadas serão numeradas seqüencialmente,  $GA_{69}$ ..... $GA_n$  (TAKAHASHI & MACMILLAN, 1968).

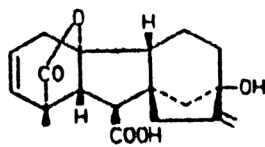


**Figura 1** - Estrutura das GAS ( $GA_1$  -  $GA_{68}$ ).<sup>1</sup>

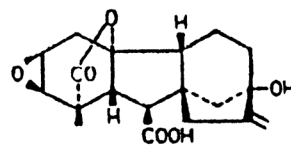
<sup>1</sup>Citado por MOORE (1979).



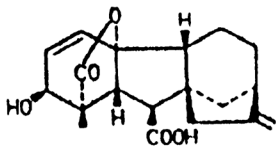
GA<sub>4</sub>



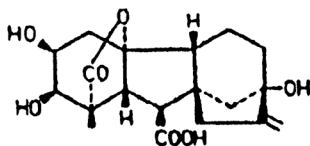
GA<sub>5</sub>



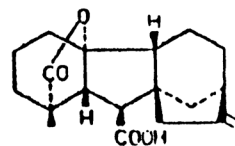
GA<sub>6</sub>



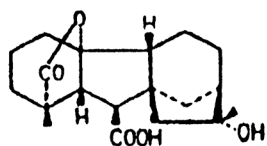
GA<sub>7</sub>



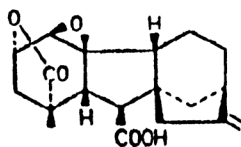
GA<sub>8</sub>



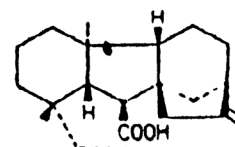
GA<sub>9</sub>



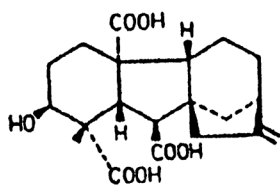
GA<sub>10</sub>



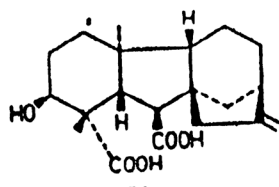
GA<sub>11</sub>



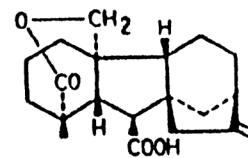
GA<sub>12</sub>



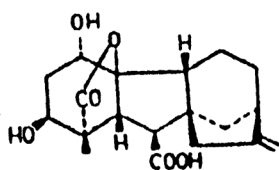
GA<sub>13</sub>



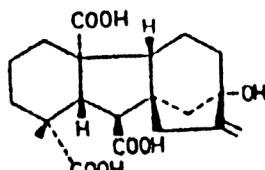
GA<sub>14</sub>



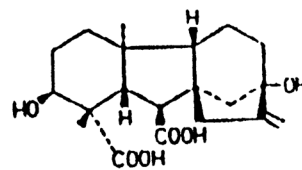
GA<sub>15</sub>



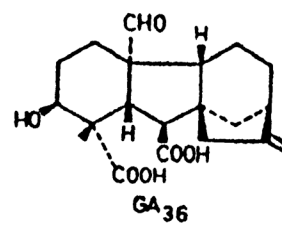
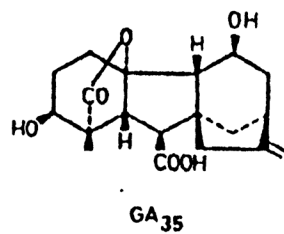
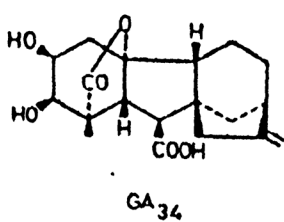
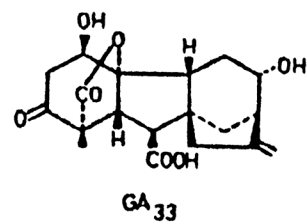
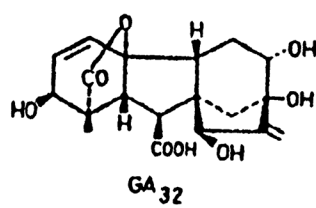
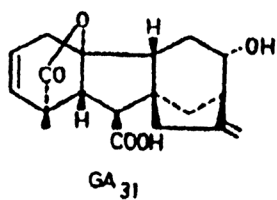
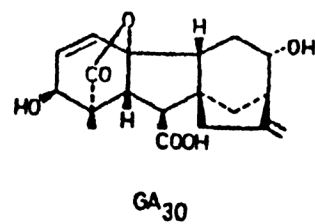
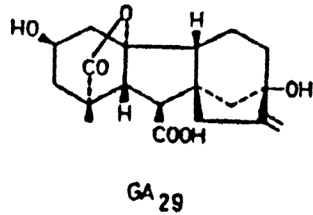
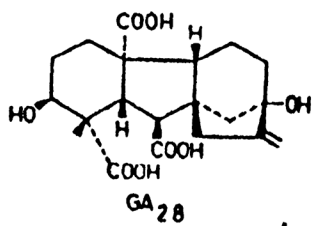
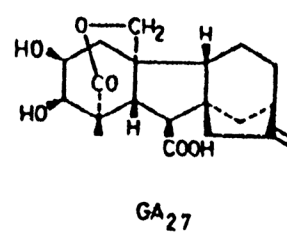
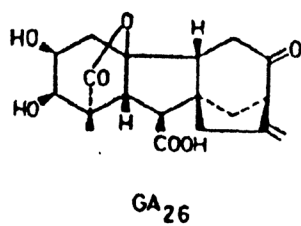
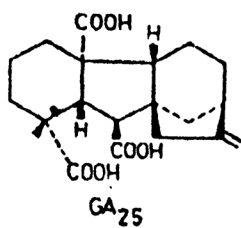
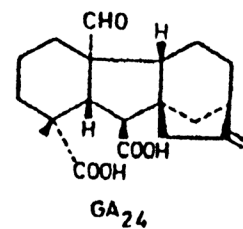
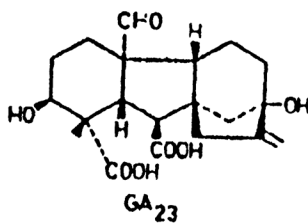
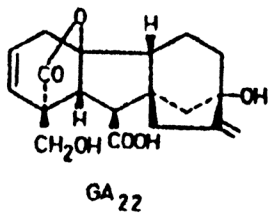
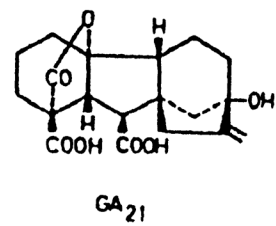
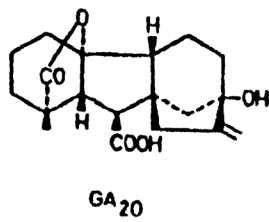
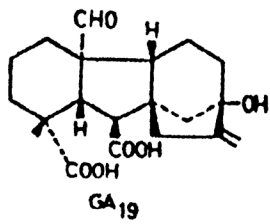
GA<sub>16</sub>

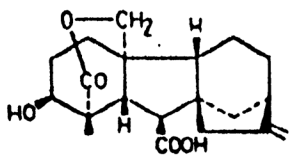


GA<sub>17</sub>

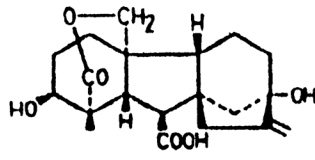


GA<sub>18</sub>

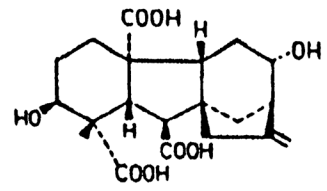




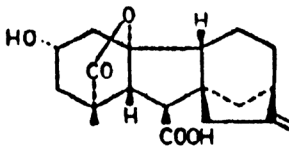
GA<sub>37</sub>



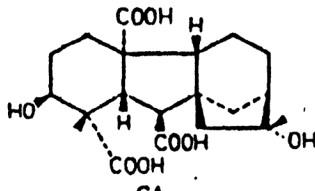
GA<sub>38</sub>



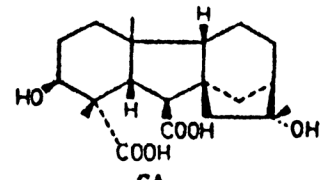
GA<sub>39</sub>



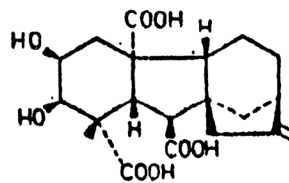
GA<sub>40</sub>



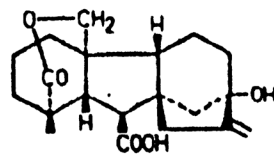
GA<sub>41</sub>



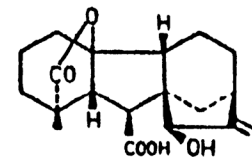
GA<sub>42</sub>



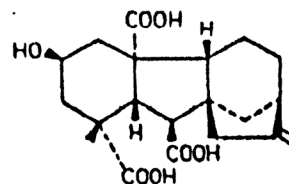
GA<sub>43</sub>



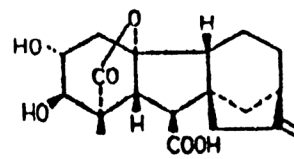
GA<sub>44</sub>



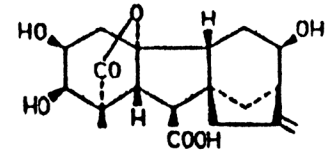
GA<sub>45</sub>



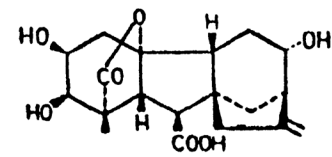
GA<sub>46</sub>



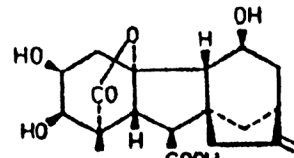
GA<sub>47</sub>



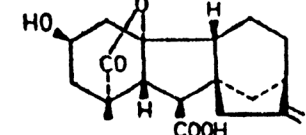
GA<sub>48</sub>



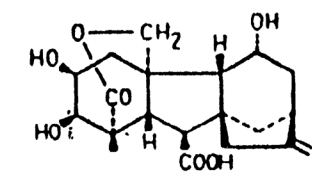
GA<sub>49</sub>



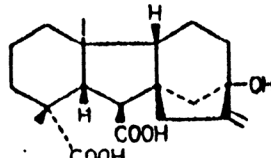
GA<sub>50</sub>



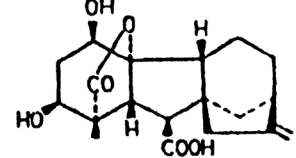
GA<sub>51</sub>



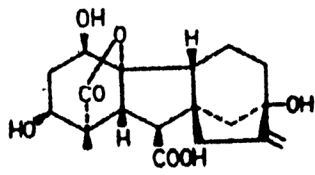
GA<sub>52</sub>



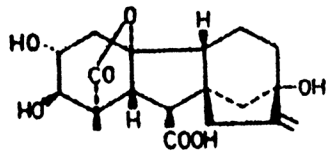
GA<sub>53</sub>



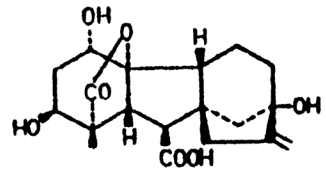
GA<sub>54</sub>



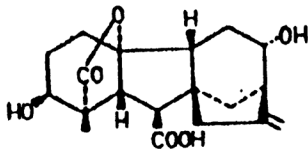
GA55



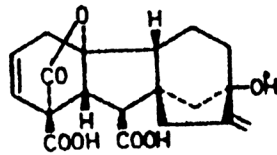
GA56



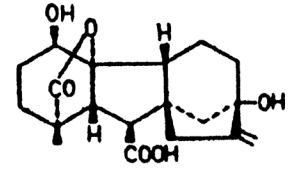
GA57



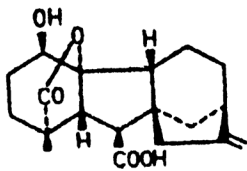
GA58



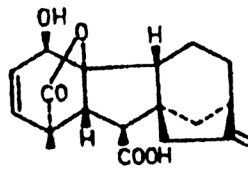
GA59



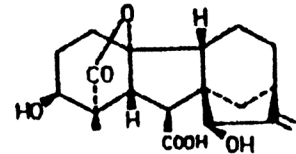
GA60



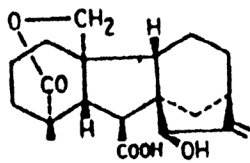
GA61



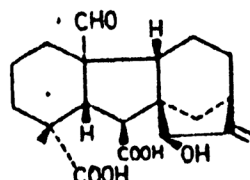
GA62



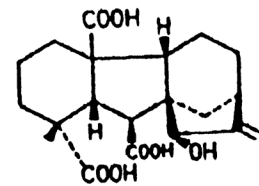
GA63



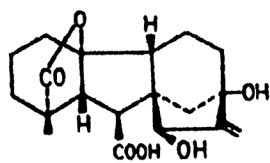
GA64



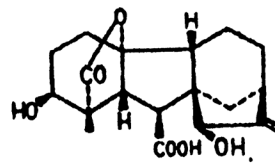
GA65



GA66



GA67



GA68

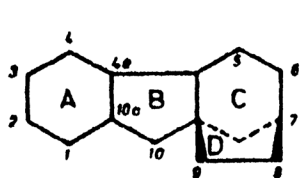
## 1.2 - Nomenclatura

A nomenclatura sistemática das GAS tinha como referência o esqueleto do gibano (I), sendo posteriormente substituído pelo caurano (II), o qual se relaciona com os precursores caurenóides das GAS e o giberelano (III) que se relaciona com as giberelinas (McCRINDLE & OVERTON, 1969). O prefixo ent é utilizado para reverter a designação estereoquímica em todos os centros de rotação da molécula, portanto a nomenclatura sistemática se baseia no ent-caurano (IV) e no ent-giberelano (V) uma vez que os precursores caurenóides e as GAS apresentam estereoquímica absoluta enantiomérica ao caurano e ao giberelano.

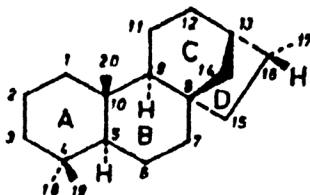
De acordo com a nomenclatura sistemática (ROWE, 1968) o steviol (VI) é um ácido (4 alfa)-13-hidroxi-caur-16-en-18 óico; o isoesteviol (VII) é o (4 alfa, 8 beta, 13 beta)-ácido-13-metil-16-oxo-17-morcauran-18-óico; a GA<sub>40</sub> é um ácido ent-2 alfa- hidroxigiberl-16-ano,7,19,20 tióico.

Porém, a nomenclatura GA<sub>1</sub>.....GA<sub>n</sub> (TAKAHASHI, 1968), pela sua simplicidade é a mais comumente empregada na designação das giberelinas. Os precursores das GAS, que se relacionam com o caureno, podem ser designados por nomes simples, como no caso da estrutura (VIII), denominada de 7 beta-hidroxicaurenolídeo. Outros recebem nomes sistemáticos ou semi-sistemáticos. Dessa forma, a estrutura (IX) é do ácido ent-7 alfa-hidroxicaur-16en-19 óico, ou mais comumente, ácido ent-7 alfa hidroxicaurenóico.

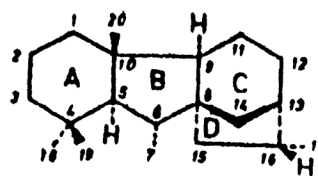




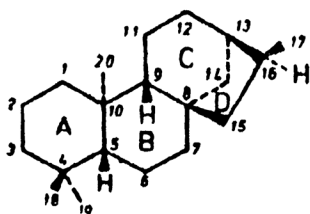
Gibano (I)



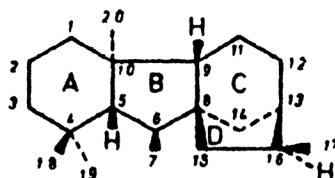
Caurano (II)



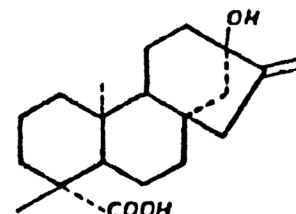
Giberelano (III)



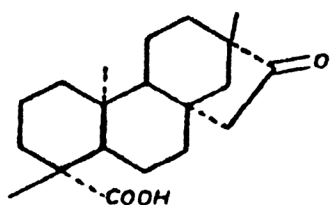
ent-caurano (IV)



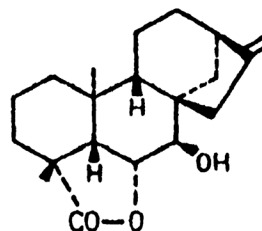
ent-giberelano (V)



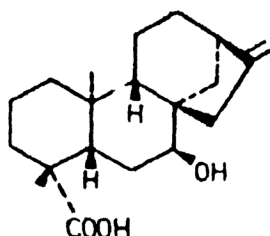
Steviol (VI)



Isoesteviol (VII)



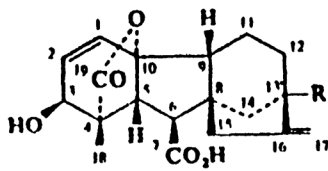
7 beta-hidroxicaurenolideo (VIII)



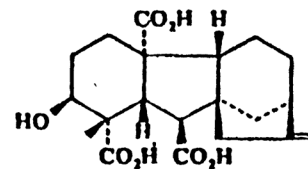
ácido ent-7- alfa-hidroxicaurenónico (IX)

Figura 2 - Estruturas de precursores de GAs e similares.

As giberelinas são substâncias de natureza isoprenóides e pertencem a uma classe de compostos chamados diterpenos. Elas são caracterizadas por um esqueleto de carbono comum (ent-giberelano), diferindo-se umas das outras na posição e no número de grupos funcionais. Elas podem ser divididas em duas famílias: uma série C-19 exemplificada pelo ácido giberélico (I) e uma série C-20 exemplificada pela giberelina A<sub>13</sub> (II). As GAs da série C-20 apresentam o carbono 20 que pode estar sob a forma de CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -CHO ou -COOH.



GA<sub>3</sub> (I)



GA<sub>13</sub> (II)

Figura 3 - Estruturas do GA<sub>3</sub> - Série C19 (I) e do GA<sub>13</sub> - Série C20 (II).

### 1.3 - Biossíntese de Giberelinas

As vias do metabolismo secundário usualmente não funcionam continuamente durante o ciclo de vida do microrganismo, mas tornam-se ativas sob baixas taxas de

crescimento. BORROW et al. (1961) identificaram três fases gerais na produção de muitos metabólitos secundários.

Na fase balanceada de crescimento a razão de captura e utilização de nutrientes é máxima, e o fungo cresce exponencialmente, sendo que metabólitos secundários raramente são produzidos nesta fase. Tão logo um nutriente seja depletado para um ponto que se torna limitante, a razão de crescimento diminui e a fase de reserva tem início, sendo que nesta fase a divisão celular cessa, mas a massa seca pode aumentar levemente devido ao acumulação de produtos de reserva, como lipídios e polissacarídeos. É nesta fase que a produção de metabólitos secundários começa. Eventualmente o fungo entra na fase de manutenção quando a massa micelial torna-se constante, a produção de metabólitos secundários abaixa e a autólise celular tem início. Em um esquema modificado de BORROW et al. (1961), BÚLOCK (1965)<sup>1</sup> tem proposto o termo "Tropofase" para o período de crescimento exponencial e "Idiofase" para o período de crescimento limitado e produção de metabólitos secundários em *Gibberella fujikuroi*.

### 1.3.1 - Formação do ent-caureno

A via biossintética das giberelinas podem ser divididas em três etapas. A primeira consiste em uma seqüência de reações partindo do mevalonato e tendo como

produto o ent-caureno, diterpeno tetracíclico (Figura 4).

As enzimas que atuam nessa fase são solúveis e requerem ATP,  $Mn^{++}$  e  $Mg^{++}$  como cofatores (COOLBAUGH, 1983).

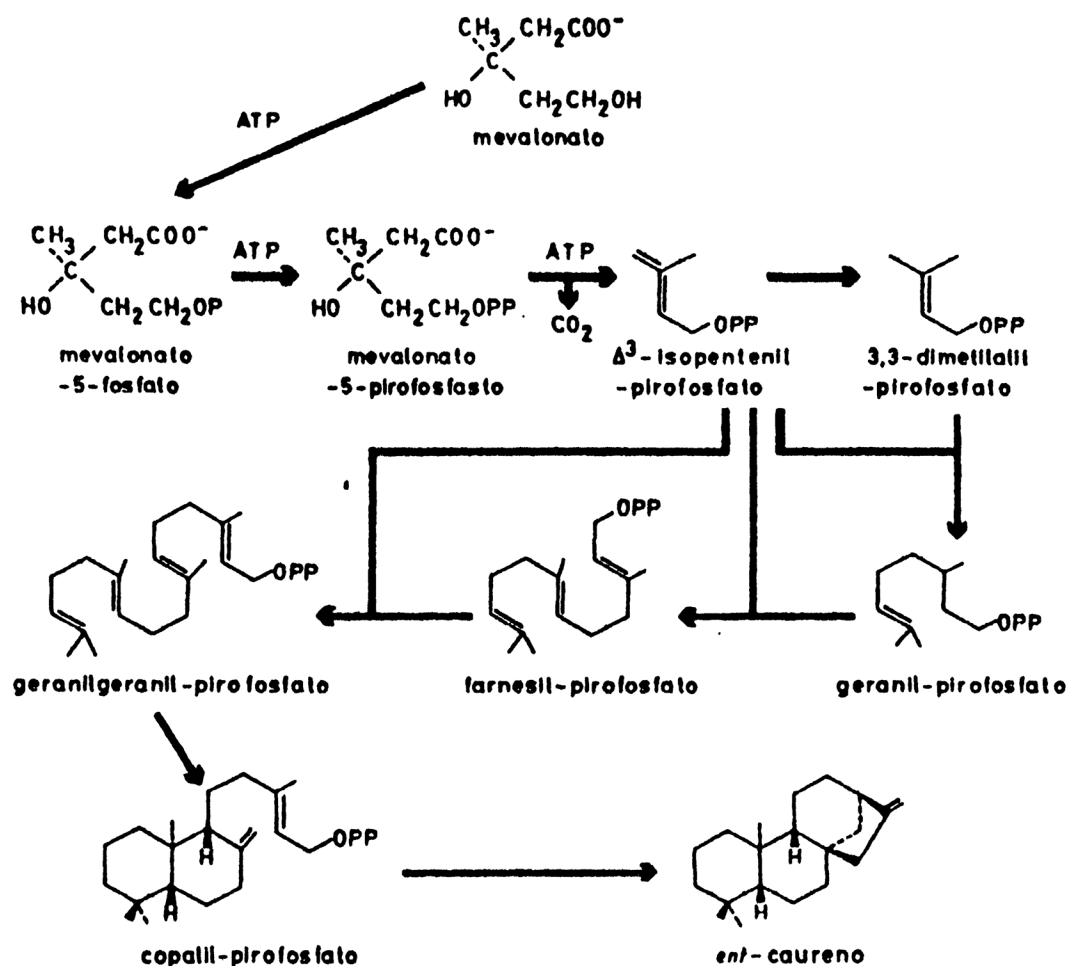


Figura 4 - Via biossintética do mevalonato ao ent-caureno.

Os anéis A e B do ent-caureno são formados por uma ciclização próton inicializada do GGPP para dar o CPP (RUZICKÁ, 1953); enquanto os anéis C e D são resultantes da perda do pirofosfato, pelo CPP, seguida pelo rearranjo do íon

carbônio resultante e a perda do H<sup>+</sup> do carbono 17 para produzir o ent-caureno (HANSON & WHITE, 1969; EVANS & HANSON, 1972).

As seguintes substâncias AMO 1618 (I), o Fosfon D (II) e o CCC (III) (figura 5), são inibidores da via biossintética tanto em fungos quanto em plantas, atuam a nível de caureno sintetase impedindo que o geranyl-geranyl pirofosfato seja transformado, via copalil pirofosfato, em ent-caureno (COOLBAUGH, 1983).

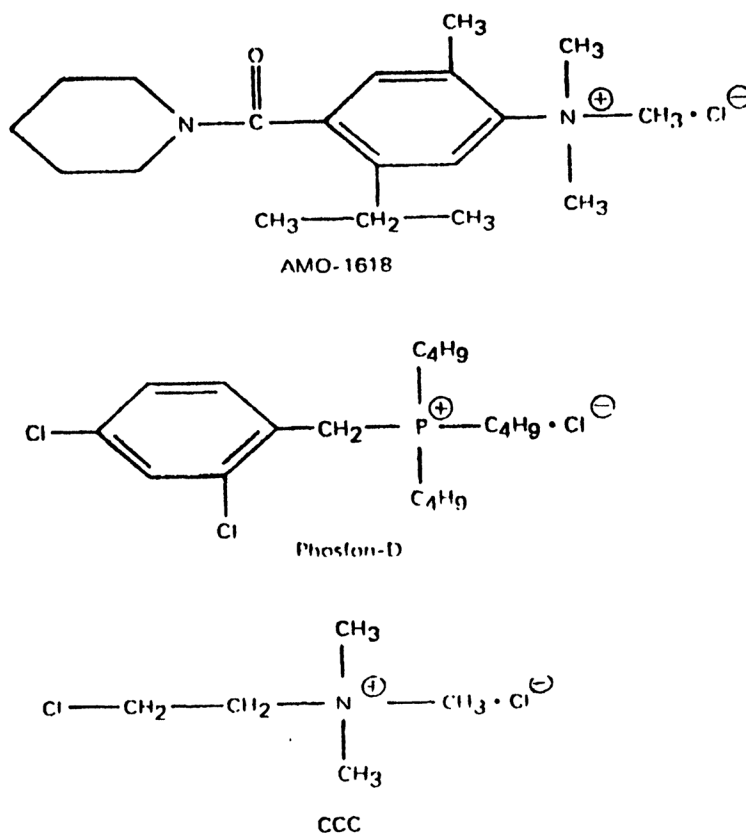


Figura 5 - Estruturas químicas de três inibidores de crescimento, AMO-1618 (cloreto de 2`-isopropil-4-(tri-metilamônio)-5`-metilfenilpiperidina-1-carboxi-lato) (I), Fosfon-D (cloreto tributil-2-,4-diclorobenzilamônio) (II) e CCC (cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio) (III).

### 1.3.2 - Formação do GA<sub>12</sub>-aldeído a partir do caureno

A segunda etapa consiste em uma seqüência de reações que levam à oxidação do grupo metil ( C-19 ) e à contração do anel B de seis átomos de carbono para cinco, (HANSON & WHITE, 1969) produzindo um composto denominado GA<sub>12</sub>-aldeído. (Figura 6).

Nesta fase atuam uma série de oxidases não solúveis, unidas ao citocromo P 450, as quais necessitam de NADPH e O<sub>2</sub>. Todos os passos desta etapa podem ser inibidos pelo ancimidol, um potente inibidor do crescimento das plantas (COOLBAUGH, 1983).

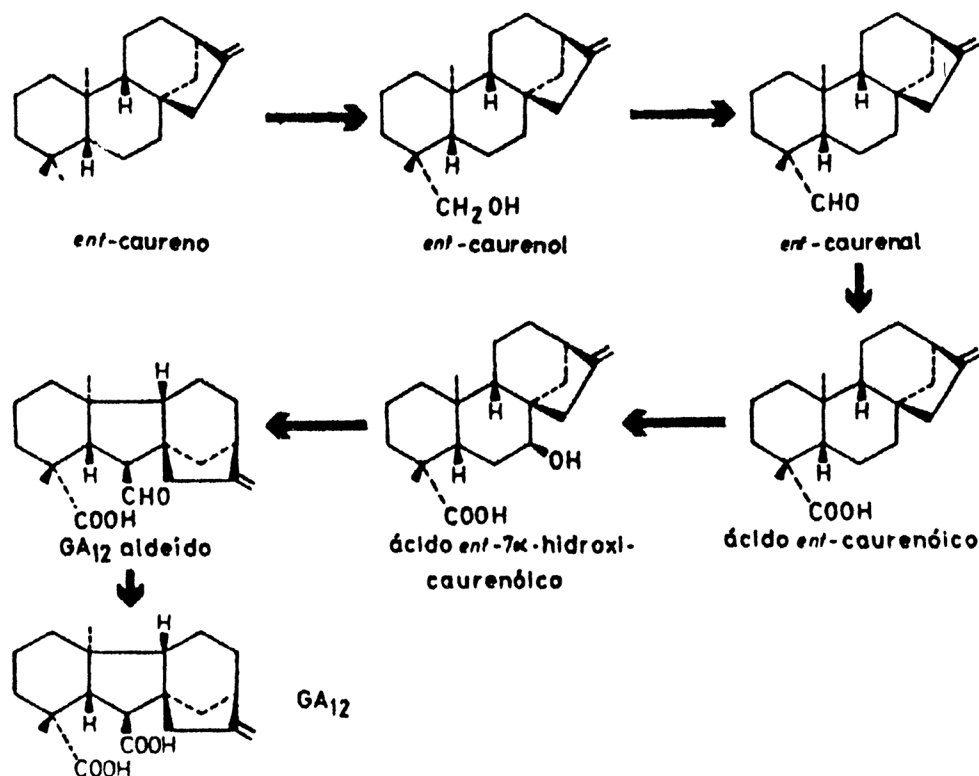


Figura 6 - Transformação do ent-caureno em GA<sub>12</sub>-aldeído.

### 1.3.3 - Via posterior ao GA12-aldeído

A terceira etapa do metabolismo, que é constituída pelos passos de reações que estão após a formação do GA12- aldeído, é mais complexa sendo diferente entre plantas e fungos (*Gibberella fujikuroi*) (BEARBER, 1983; HEDDEN, 1983).

#### 1.3.3.1 - Via posterior ao GA12-aldeído em plantas

Utilizando-se sistemas livres de células (*Cucurbita máxima* e *Phaseolus vulgaris*, entre outras) obteve-se em esquema geral para as plantas estudadas, o qual pode sofrer pequenas variações de espécie para espécie e até de órgão para órgão em relação ao passo em que ocorre a 13 beta-hidroxilação do intermediário metabólico. Basicamente, como pode ser observado pela figura-7, existem duas vias principais a partir do GA12-aldeído: uma que leva compostos 13, beta-hidroxilados e outra cujos intermediários não apresentam hidroxila em C-13. Independentemente da via seguida, a GA12-aldeído passa por uma série de etapas que são comuns à duas vias: oxidação em C-7 originando um dicarboxilo; oxidação em C-20 tendo como produto um tricarboxílico ou lactonização com a perda do C-20 na forma de CO<sub>2</sub>, levando a GAS da série C-19. A via geralmente é finalizada por uma reação de hidroxilação no C-2. Dentre as reações citadas, duas devem ser destacadas: a primeira diz

respeito à transformação de giberelinas C-20 em giberelinas C-19, sendo que as giberelinas da série C-19 são bioativas, de acordo com os bioensaios padrão, enquanto que as giberelinas da série C-20 tem a sua bioatividade dependente da possibilidade de sua conversão em giberelinas da série C-19 no sítio em que foi aplicada (REEVE & CROZIER, 1974). A segunda reação, a 2, beta-hidroxilação, consiste num mecanismo de controle da atividade giberélica, pela planta, como pode ser visto na figura-7 em que a GA<sub>1</sub> ativa é transformada em GA<sub>8</sub> inativa (PHINNEY, 1984).

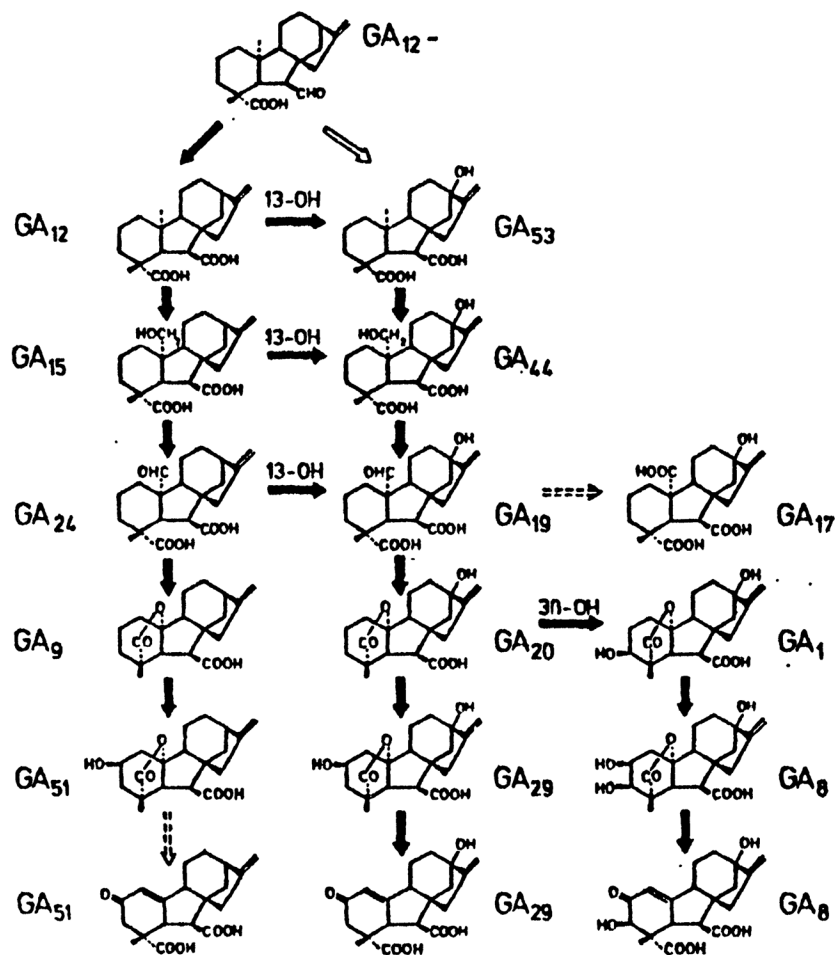


Figura 7 - Biossíntese de GAs depois de GA<sub>12</sub>-aldeído em sementes imaturas de *Pisum sativum*.



1.3.4 - Via posterior ao GA12-aldeído em *Gibberella fujikuroi*

Os resultados sumariados na figura-8 estão fundamentadas em estudos realizados com diversas cepas produtoras de GAS: ACC 917, GF<sub>1</sub><sup>a</sup> e REC 193 A e as mutantes B1-41a e R-9. O mutante R-9 está bloqueado para a 13 beta-hidroxilação (BEARDER et al., 1973) e assim não produz GA<sub>1</sub> nem GA<sub>3</sub>, enquanto o bloqueio no B1-41a está entre o ent-caurenal e o ácido caurenóico (BEARDER et al., 1974).

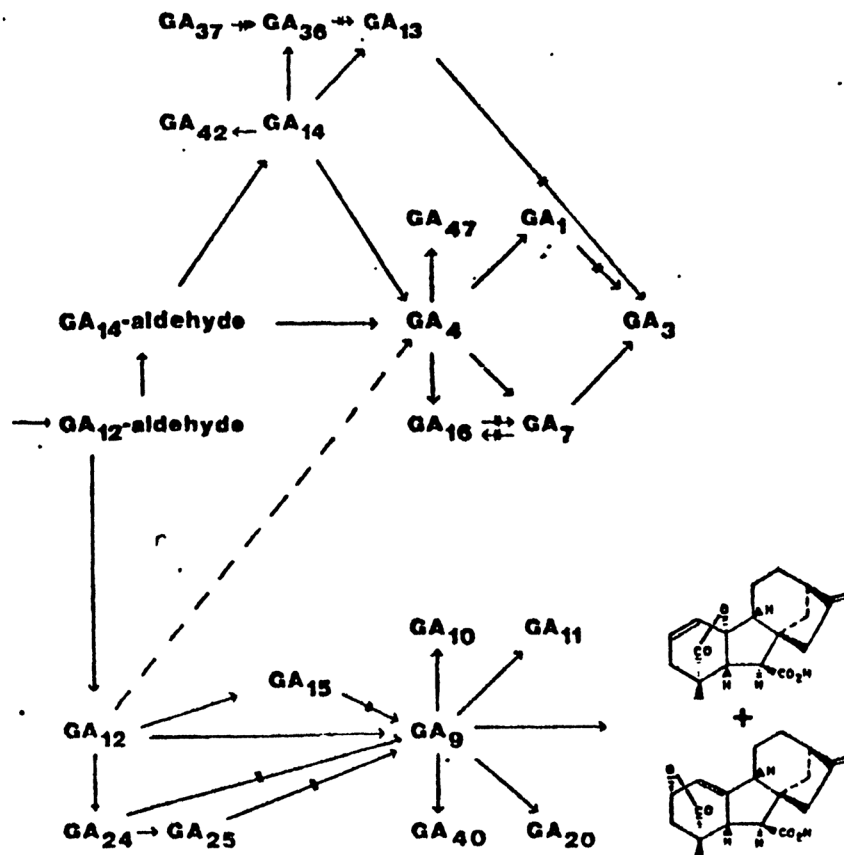


Figura 8 - Vias biossintéticas de GAS após GA12-aldeído estabelecidas para *Gibberella fujikuroi*. Duas vias principais originam-se do GA12-aldeído: uma via envolve a 3 beta-hidroxilação do GA12-aldeído a GA14-aldeído (via A). A outra via não apresenta a etapa de 3 beta-hidroxilação (via B).

Os estudos realizados com o mutante B1-41a foram de grande importância para o estabelecimento das transformações que ocorrem com o GA12-aldeído, pois serviram como base para estudos complementares e suplementares utilizando outras cepas e outros métodos (EVANS & HANSON, 1975).

Basicamente a partir do GA12-aldeído (figura-8) existem duas vias, sendo uma 3, beta-hidroxilada (PITEL et al., 1971) que vem como principal produto o GA<sub>3</sub> e outra que conduz a compostos não hidroxilados na posição 3. A via 3 beta-hidroxilada é a mais operante de forma que o GA<sub>3</sub> é a substância giberélica produzida em maior quantidade pelo fungo *Gibberella fujikuroi* (BEARDER, 1975).

#### **1.4 - Metabolismo de Substratos Inespecíficos**

O metabolismo de substâncias análogas às Giberelinas ou a seus precursores é de grande interesse por prover informações a respeito da especificidade enzima-substrato, as quais podem ajudar a esclarecer como se processa o controle metabólico na via de biossíntese de GAs; e por prover métodos mais fáceis para obtenção de giberelinas naturais e ainda para obtenção de substâncias semelhantes às giberelinas que tenham potencial biológico de interesse.

1.4.1 - Metabolismo do steviol por cepas de *Gibberella fujikuroi*

O primeiro exemplo do metabolismo de um análogo de um precursor de GA foi descrito por RUDAT et al. (1965). O [ $^{14}\text{C}$ ] steviol, análogo 13 beta-hidroxilado do ácido ent-caurenólico foi demonstrado ser metabolizado à substâncias giberélicas por cepas produtoras de GAS. BEARDER et al. (1975) estudou o metabolismo do steviol em culturas ressuspendidas do mutante B1-41a e estabeleceu as conversões mostradas na Figura-9, as quais são similares às conversões sofridas pelo ácido ent-caurenólico.

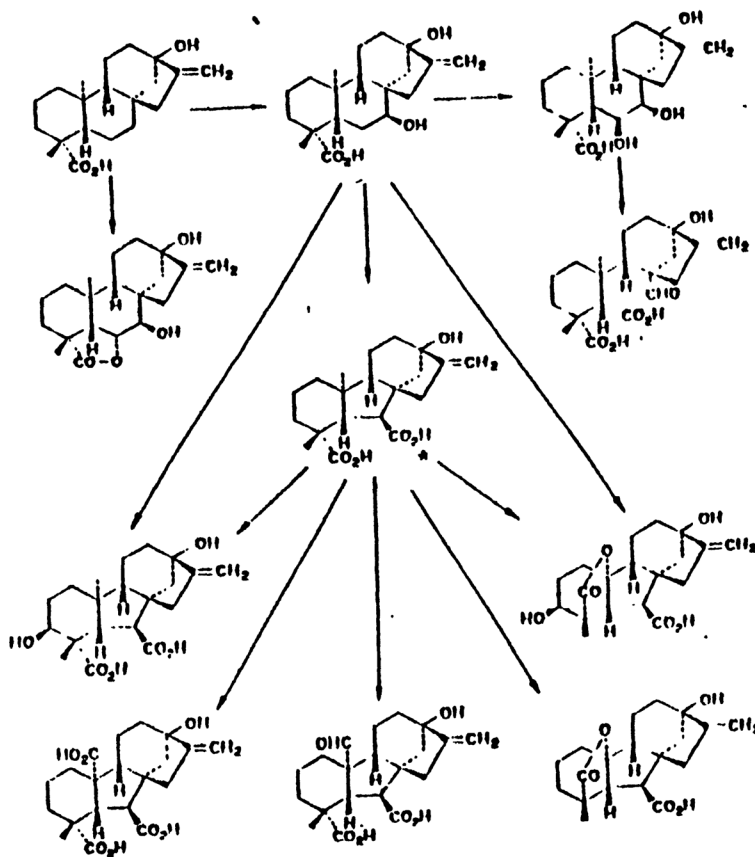


Figura 9 - Metabolismo do steviol por *Gibberella fujikuroi* B<sub>1</sub>-41a, (BEARDER, 1975).

MURUFUSHI et al. (1982) estudaram o metabolismo do steviol, utilizando cepas produtoras de GAS na presença de reguladores do crescimento de plantas (AMO 1618, CCC, Fosfon-D ), e obteve resultados que estão de acordo com aqueles obtidos por BEARDER et al. (1975).

#### 1.4.2 - Metabolismo do isoesteviol por cepas de *Gibberella fujikuroi*

BEARDER et al. (1976) demonstraram que o isoesteviol, que pode ser obtido por rearranjo ácido - catalisado dos anéis C/D do steviol (HANSON & WHITE, 1968) ou por hidrólise ácida do steviosídeo (MOSSETIG & NES, 1955) é rapidamente metabolizado à substâncias com anéis C/D rearranjados, análogas às Giberelinas A<sub>17</sub>, A<sub>19</sub>, A<sub>20</sub> e 13, beta-hidroxi-GA<sub>12</sub>-aldeído. Conclui-se portanto que o metabolismo do isoesteviol é semelhante ao metabolismo do steviol e do próprio ácido ent-caurenóico, excetuando que não ocorre 3, beta-hidroxilação, portanto, o rearranjo dos anéis C/D bloqueia a etapa de 3, beta-hidroxilação e conseqüentemente fica descartada a hipótese de obter giberelinas bioativas a partir do isoesteviol uma vez que a presença da hidroxila no carbono 3 é imprescindível à da expressão da atividade fitormonal pelos compostos giberélicos (REEVE & CROZIER, 1974).

## 1.5 - Objetivos

Isolar cepas de *Fusarium moniliforme* que produzam giberelinas, estudar o metabolismo do isoesteviol pelas mesmas e a possível atividade fitormonal do isoesteviol e dos produtos do metabolismo do isoesteviol.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - Materiais

#### 2.1.1 - Microrganismos

Neste trabalho foram avaliadas 16 cepas de *Fusarium moniliforme*, obtidas de diferentes hospedeiros na região de Maringá, que diferem principalmente quanto à capacidade de produzirem o ácido giberélico. Uma das cepas isoladas, obtida a partir de plantas de trigo infectadas, denominada de "cepa UEM", mostrou-se capaz de produzir o ácido giberélico e por isso foi escolhida para realização dos experimentos com a finalidade de estudar os efeitos de substratos inespecíficos sobre as vias de biossíntese do ácido giberélico.

#### 2.1.2 - Obtenção do isoesteviol - Testes do grau de pureza

O isoesteviol foi obtido de acordo com MOSETING & NESS (1955), a partir de steviosideo puro fornecido pela Ingá Stevia Industrial S.A. Portanto 10 g de steviosideo foram dissolvidos em 250 ml da solução de ácido sulfúrico a 10% e colocado sob fervura com refluxo de 2 horas. O isoesteviol insolúvel foi então recolhido por filtração em Buchener e recristalizado em etanol três vezes até obtenção de cristais

incolores com ponto de fusão 229-234 °C (literatura 231-233 °C) e  $[\alpha]_D = -79^\circ$  (C= 0,5g% etanol) (literatura  $[\alpha]_D = -79,3^\circ$ ). Foram obtidas cerca de 2 g de cristais puros.

### **2.1.3 - Reagentes**

O ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) utilizado como padrão foi adquirido da Merck. Todas as demais substâncias utilizadas foram do mais alto grau de pureza disponível.

### **2.1.4 - Sementes de arroz (*Oryza sativa* L) para biotestes**

As sementes das variedades normais IRGA 410 e IRGA 409 bem como as variedades anãs Koshihikari, Sasanishiki e Satononami foram obtidas junto ao IAPAR.

### **2.1.5 - Sementes de alface (*Lactuca sativa*) para biotestes**

As sementes de alface utilizadas foram da variedade *Grand rapids* de acordo com FRANKLAND & WAREING (1960) e *Hanson americana*.

## **2.2 - Métodos**

### **2.2.1 - Preparação dos meios de cultura para *Fusarium moniliforme***

Os experimentos foram conduzidos tanto em meio complexo (meio BD e BDA), como em meio sintético ICI (GEISSMAN et al., 1966) desenvolvido especificamente para a produção do ácido giberélico.

#### **2.2.1.1 - Meio de Cultura BDA (sólido)**

O meio de cultura BDA foi preparado conforme RUDDAT et al. (1963) descascando-se 200 g de batatas que foram cozidas em 800 ml de água destilada. Após filtração do caldo de batata foram adicionados 18 g de ágar-ágar e 15 g de dextrose. O volume foi completado para 1000 ml. Aqueceu-se a mistura em banho-maria até a completa dissolução do ágar e em seguida o líquido foi distribuído em placas de Petri, que foram autoclavadas a 120 °C durante 20 minutos. Após esfriar, o fungo foi inoculado com alça de platina e encubado durante 7 dias a 30 °C, a cultura estoque foi mantida em geladeira a 4 °C.



#### **2.2.1.2 - Cultura em meio BD**

a) Preparo da cultura-mãe em meio BD (inóculo):

O meio de cultura BD foi preparado da mesma maneira que o meio BDA, com excessão da adição do ágar-ágar. O inóculo foi preparado em um frasco Erlenmayer de 2000 ml contendo 500 ml do meio de cultura BD pela adição de discos da cultura do isolado UEM em meio BDA.

#### **2.2.1.3 - Cultura em meio sintético ICI**

A produção de giberelinas e/ou biotransformação de substratos inespecíficos em meio de cultura sintético (meio ICI) é normalmente um processo descontínuo; na primeira etapa realiza-se o desenvolvimento do micélio em um meio com disponibilidade de nitrogênio (meio ICI 10% N); na segunda etapa o micélio é separado por filtração e ressuspenso em meio sintético isento de nitrogênio (meio ICI 0% N) propicio à procução de giberelinas.

a) Meio de cultura ICI com 10% de nitrogênio

O meio ICI 10 % de N continha 10 % de nitrato de amônio do meio original, tendo a seguinte composição: 80 g de

glucose, 0,48 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 2 ml da solução A, contendo traços de elementos, sendo o volume completado para um litro com água destilada. A solução A apresentou a seguinte composição: 0.1 g de  $\text{FeSO}_4$ , 0.015 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.161 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0.01 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  completando-se o volume desta solução para 100 ml com água destilada.

Frascos Erlenmeyers contendo 500 ml de meio ICI 10 % N foram inoculados e encubados em câmara de temperatura controlada ( $29 \pm 1$  °C) sobre uma mesa rotatória a 100 rpm por 72 horas, após este período o micélio foi separado por filtração, em condições assépticas e ressuspenso em meio ICI 0% N contendo ou não o isoesteviol.

#### b) Meio ICI isento de nitrogênio

Devido as exigências de oxigênio nesta etapa (fase de produção) serem muito maiores que na anterior (fase de desenvolvimento do micélio) os frascos foram encubados sobre mesa rotatória a 200 rpm e cultivados por um período de 400 horas. Durante o cultivo, alíquotas foram removidas para determinação dos parâmetros metabólicos (item 2.2.2).

## **2.2.2 - Determinação dos parâmetros metabólicos**

### **2.2.2.1 - Determinação da massa micelial úmida**

A massa úmida foi determinada filtrando-se alíquotas dos meios de cultura e removendo-se o excesso de água das hifas pressionando-se manualmente contra papel absorvente e em seguida pesadas em balança analítica. Os filtrados foram utilizados para a determinação dos demais parâmetros.

### **2.2.2.2 - Determinação do teor de amido**

A determinação do teor de amido no meio de cultura foi feita pelo método do iodo, conforme JONES & VARNER (1967).

### **2.2.2.3 - Teor de carboidratos totais**

O teor de carboidratos totais foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico como descrito por DUBOIS et al. (1965).

### **2.2.2.4 - Teor de glucose**

As dosagens de glucose foram feitas pelo método da orto-toluidina conforme DUBOUVISKI (1962).

#### **2.2.2.5 - Teor de proteínas**

Os níveis de proteínas solúveis foram determinados pelo método do biureto tendo albumina bovina como padrão conforme GORNAL et al. (1962).

#### **2.2.3 - Extração dos produtos metabólicos**

O filtrado e lavado das culturas foram acidificados com HCl 1.0 N até um pH de 2,5. A solução assim ajustada foi extraída com acetato de etila três vezes. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi concentrada até secar (MADDOX & RICHERT, 1976). O resíduo foi pesado e redissolvido em etanol anidro. Os extratos assim elaborados foram utilizados nos experimentos de determinação de atividade giberélica e nas análises cromatográficas.

#### **2.2.4 - Determinação do efeito giberelínico**

O efeito giberelínico foi determinado através de bioensaios utilizando plântulas de alface e de arroz.

##### **2.2.4.1 - Bioteste do arroz**

O efeito giberelínico foi determinado qualitativamente sobre plântulas de arroz (AYTOUN et al., 1959)

germinadas em tubos de ensaio dotadas de dispositivo feito de película de plástico de modo a formar uma câmara úmida de germinação dentro de um tubo de vidro e de maneira que a plântula se projetasse verticalmente para fora do tubo permitindo medidas precisas do seu comprimento. A solução aquosa contendo os compostos a serem testados fica depositada no fundo do tubo e tem contato com a plântula por capilaridade através de fitas de papel de filtro. Para garantir a homogeneidade das plântulas testadas esse mesmo tipo de ensaio foi realizado com a germinação prévia das sementes de arroz em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecidos com água.

#### 2.2.4.2 - Bioteste do hipocótilo do alface

O efeito giberelínico foi determinado qualitativamente sobre plântulas de alface da variedade *Grand rapids* (FRANKLAND & WAREING, 1960). As sementes foram germinadas em estufa com temperatura controlada ( $25 \pm 1$  °C), dentro de placas de Petri forradas com papel filtro umedecidos com água, sendo as placas embrulhadas em papel opaco. Após 24 horas de cultivo na ausência de luz, as sementes germinadas eram selecionadas e separadas em grupos de cinco plântulas, sendo que cada grupo era transferido para um copo plástico forrado com papel filtro umedecido com água. A cada copo um volume de 2 ml da solução a ser testada era adicionada, e os mesmos foram encubados em estufa com temperatura controlada

( $25 \pm 1$  °C) por 48 horas. As medições do comprimento do hipocótilo foram realizadas sobre uma placa de vidro, na qual as plântulas eram colocadas em posição correta com a ajuda de um pincel.

#### **2.2.5 - Análises cromatográficas**

Os padrões e extratos foram analisados qualitativamente na variação de sua composição com relação ao consumo e/ou produção de giberelinas do meio de cultura através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia em camada delgada (TLC).

##### **2.2.5.1 - Análises do isoesteviol (HPLC)**

Na determinação do isoesteviol através de cromatografia líquida de alta resolução (ALVAREZ & KUSOMOTO, 1986) foi utilizada uma Coluna Licrosorb - RP. - 18 (ODS) com partículas de 10  $\mu$ m tendo como solvente a mistura metanol:água (65:35) com fluxo de 1,5 ml/min e pressão de 150 atm. A leitura foi feita com detector de ultravioleta no comprimento de onda de 210 nm. O cromatógrafo foi o modelo CG-420.

#### **2.2.5.2 - Análise do ácido giberélico (HPLC)**

Na determinação do ácido giberélico através de cromatografia líquida de alta resolução (- LIN & HEFTMANN, 1981) foi utilizada uma Coluna Licrosorb Si 60 com partículas de 10  $\mu$ m tendo como sistema de solvente a mistura n-hexano:etanol:ácido acético (93:7:005) com fluxo de 1 ml/min e pressão de 100 atm, a leitura foi feita no detector de ultravioleta no comprimento de onda de 207 nm. O cromatógrafo foi o modelo CG-420.

#### **2.2.5.3 - Cromatografia em camada delgada (TLC)**

A cromatografia em camada delgada para as gibberelinas foi realizada em placas de Sílica Gel G-60 com 0,5 mm de espessura em base de alumínio. O sistema de solventes foi de acetato de etila:clorofórmio:ácido acético (15:5:1). Os cromatogramas foram revelados pela carbonização em chapa quente após pulverização da mistura de ácido sulfúrico:metanol a 5,0 % (CAVELL et al., 1967).

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Padrão de Isoesteviol - Caracterização cromatográfica

##### 3.1.1. Em HPLC

O isoesteviol purificado, utilizado nos experimentos foi obtido por hidrólise ácida do steviosídeo e apresentou o perfil cromatográfico mostrado na figura-10 quando analisado em HPLC conforme ALVAREZ & KUSUMOTO (1987). O isoesteviol apresentou um tempo de retenção de 7,2 minutos em seu pico principal. Os demais picos observados provavelmente são resultantes de derivados salinos parciais do isoesteviol, pois no eluente utilizado no sistema está contido 5 mMolar de NaOH para ajuste de pH 9,0.

##### 3.1.2 - Em GLC

A pureza do isoesteviol, caracterizada pelo pico distinto do cromatograma foi confirmada por análises em GLC do seu derivado silylado conforme é mostrado na figura-11.



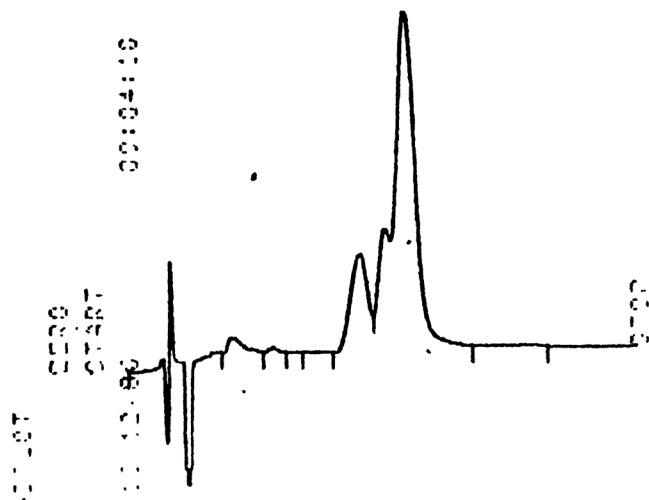


Figura 10- Cromatograma em HPLC do isoesteviol padrão. O cromatograma foi feito com uma coluna Lichrosorb RP-18 (um) de 25x0,4 cm como fase fixa e metanol: NaOH 0.005 M (65:35) como fase móvel, à temperatura de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pressão de 100 atm e detecção ao UV a 210 nm. Isoesteviol padrão na concentração de 0,5 mg/ml.

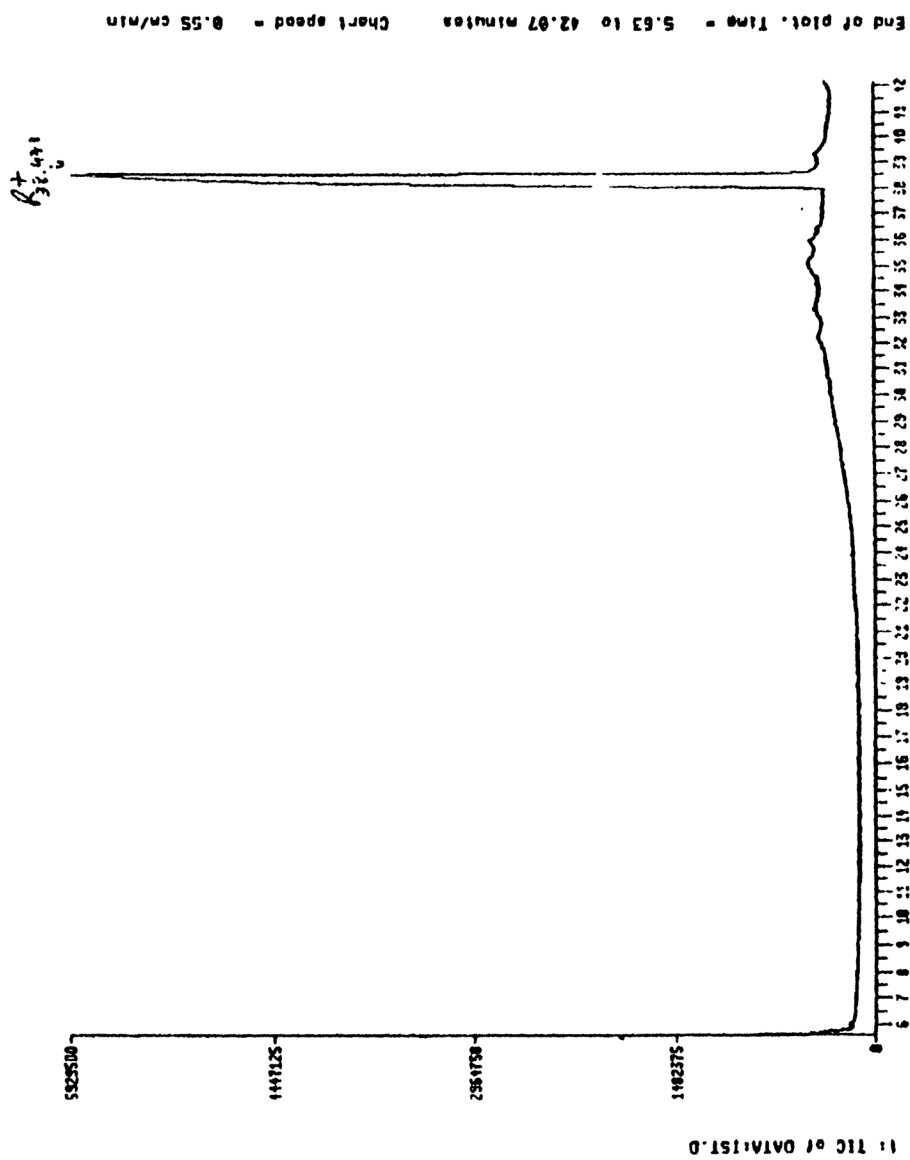


Figura 11 Análise em GLC (cap.)-MS da amostra de isoesteviol per-sililado (piridina-BSTFA 2:1, 70 °C, 30')

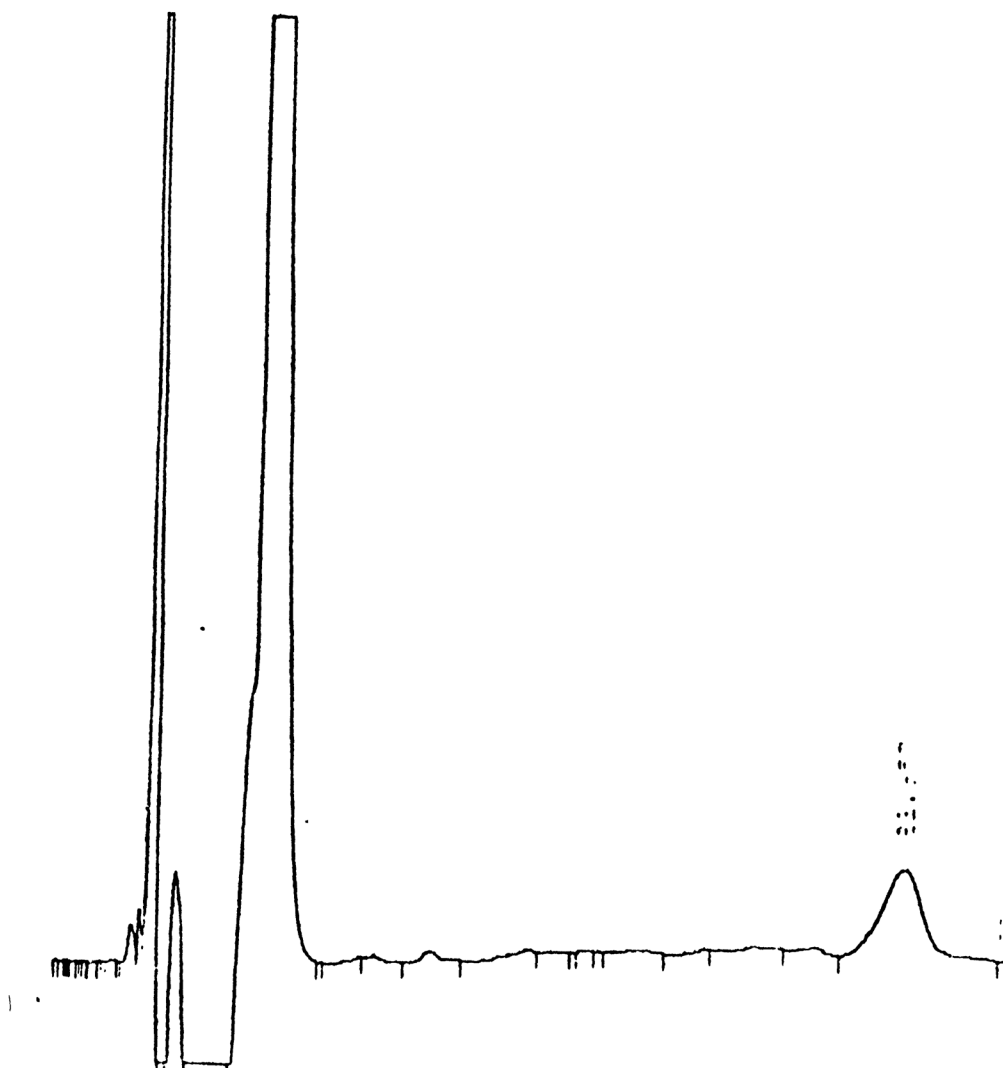


Figura 12- Perfil cromatográfico em HPLC do ácido giberélico padrão. O cromatograma foi feito com uma coluna Licrosorb Si-60 (10  $\mu$ m) como fase fixa e uma mistura de n-hexano:etanol:ácido acético na proporção de 97:7:0.05 como fase móvel, à temperatura de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pressão de 150 atm e detecção ao UV a 207 nm. O ácido giberélico padrão estava na concentração de 0,5 mg/ml.

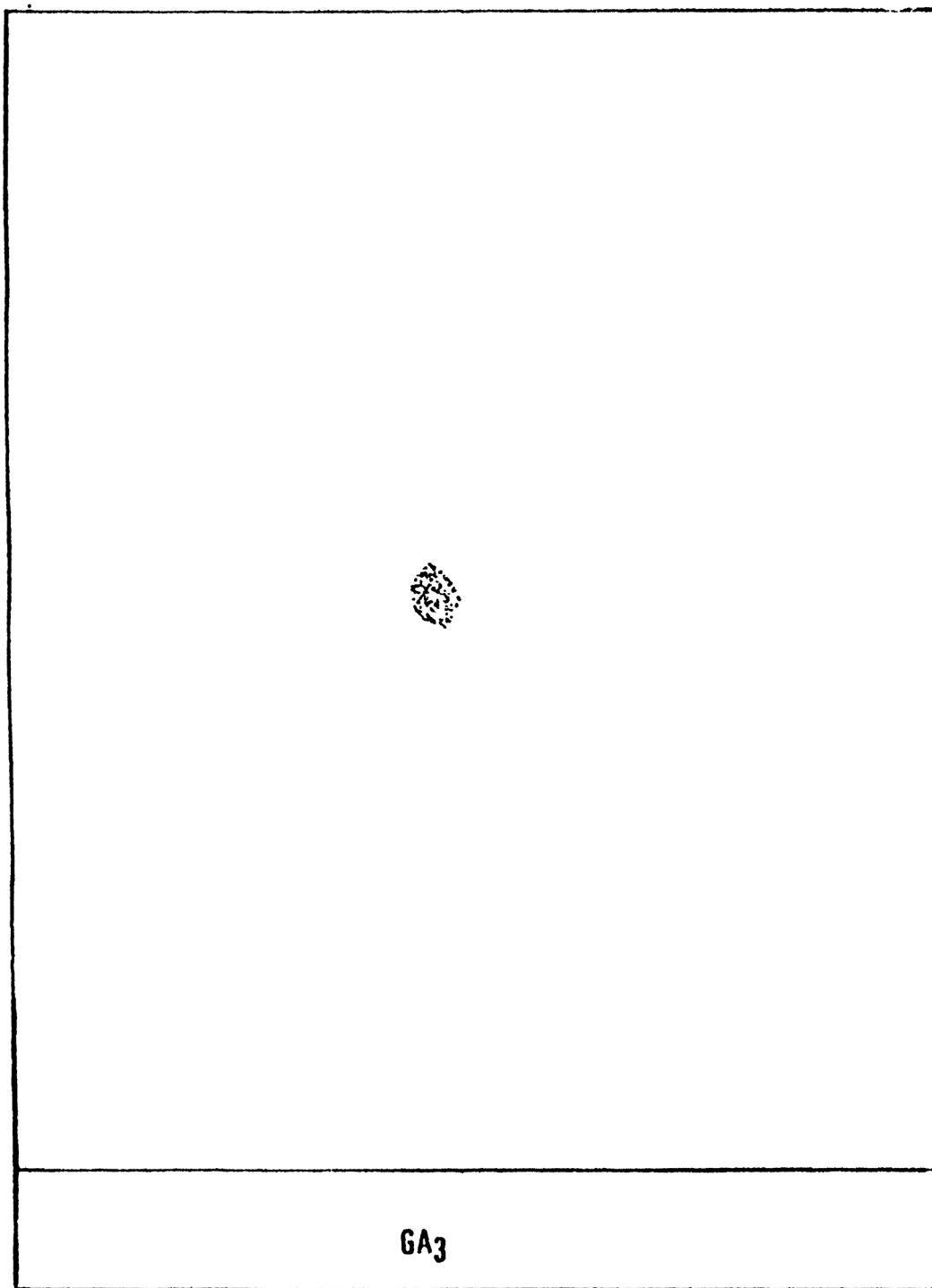


Figura 13- Cromatografia em camada delgada do ácido giberélico padrão. Uma cromatolha de Silica Gel com espessura de 0,25 mm foi utilizada para o cromatograma. O solvente foi uma mistura de acetato de etila:clorotormio:ácido acético na proporção de 15:5:1. Após a corrida o cromatograma foi revelado com ácido sulfúrico a 10% em etanol.

### **3.2 - Padrão de GA<sub>3</sub> - Caracterização cromatográfica**

#### **3.2.1 - Em HPLC**

O ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), principal componente estudado nos meios de cultura, foi analisado por HPLC conforme o perfil cromatográfico apresentado na figura-12. A GA<sub>3</sub> teve um tempo de retenção prolongado de 23 minutos apresentando um pico único.

#### **3.2.2 - Em TLC**

A figura-13 mostra o cromatograma em TLC da GA<sub>3</sub> padrão onde o R<sub>f</sub> da mancha única é de 0,49.

Ficou, portanto caracterizado que tanto o isoesteviol quanto a GA<sub>3</sub> obtidos, apresentam um grau de pureza satisfatórios para servirem de padrão cromatográfico no monitoramento dos experimentos que se seguem.

### **3.3 - Biotestes para determinação do efeito giberélico**

#### **3.3.1 - Padronização do Bioteste com plântulas de Arroz**

O ritmo de crescimento de plântulas de arroz tem sido usado para monitoramento qualitativo e quantitativo da pesquisa de fitormônios giberélicos, os quais, em

concentrações adequadas, estimulam o alongamento linear vertical das plântulas, servindo como parâmetro de aferimento do efeito giberélico (BAILISS & HILL, 1971).

Os experimentos com plântulas de arroz, conforme descrito em Material e Métodos, com o objetivo de se obter a faixa de concentração em que o ácido giberélico estimula o crescimento, foram realizados nas concentrações de 0,5 a 20 ug/ml.

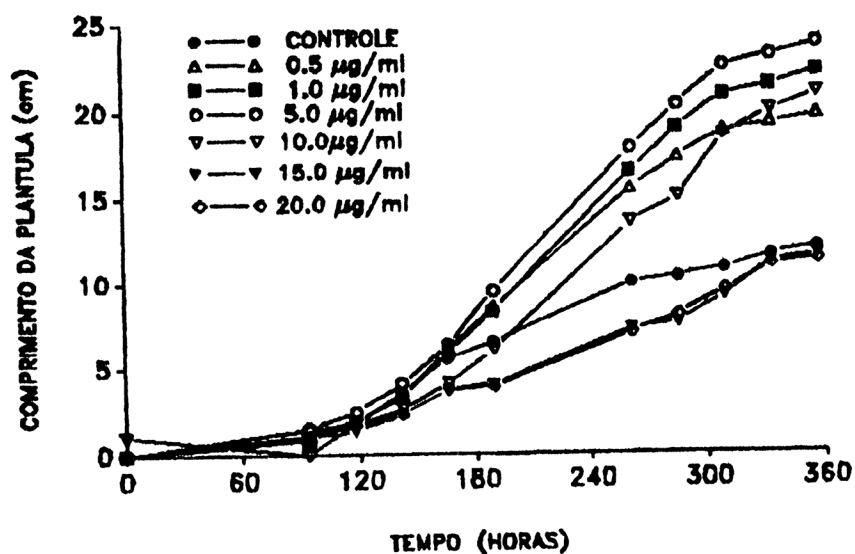


Figura 14- Medida do comprimento de plântulas de arroz da variedade IRGA 410 tratadas com água destilada (controle) (●—●) e ácido giberélico nas concentrações de: 0,5 ug/ml (▲—▲), 1,0 ug/ml (■—■), 5 ug/ml (○—○), 10 ug/ml (▼—▼), 15 ug/ml (▽—▽) e 20 ug/ml (◊—◊).

Observa-se pelo experimento demonstrado na figura-14, que o ácido giberélico na faixa de 0,5 a 10 ug/ml estimulou o crescimento de plântulas de arroz da variedade IRGA 410 e, que a melhor resposta foi obtida pelo GA<sub>3</sub> na

concentração de 5,0 ug/ml. Nas concentrações de 15 e 20 ug/ml o efeito hormonal não pôde ser detectado. AYTOUN et al. (1959) utilizando a variedade de arroz *Rossi precoce* demonstraram o efeito hormonal da GA<sub>3</sub> na faixa de 0,1 a 10 ug/ml; portanto a sensibilidade do bioteste do arroz depende da variedade de arroz empregada. Variedades de arroz anão podem acusar a presença do GA<sub>3</sub> na concentração de 10<sup>-4</sup> uM (CROZIER et al., 1970).

Conclui-se, portanto, que o bioteste do arroz realizado sob as condições experimentais descritas no item 2.2.4 pode ser empregado para detectar a presença da GA<sub>3</sub> nos extratos obtidos de culturas de *Fusarium moniliforme* que produzem o ácido giberélico, desde que as amostras testadas apresentem a GA<sub>3</sub> na faixa de 0,5 a 10 ug/ml.

### 3.3.2 - Padronização do bioteste com hipocótilo de alface

Da mesma forma que as plântulas de arroz, o ritmo de crescimento do hipocótilo de alface serve como parâmetro de monitoramento do efeito giberélico sobre as plantas. Este bioteste complementa o bioteste do arroz, como sendo uma contraprova do efeito giberélico em outra espécie vegetal (BAILISS & HILL, 1971).

O ácido giberélico padrão foi testado quanto à sua capacidade de estimular o crescimento do hipocótilo do alface através do bioensaio do alface (FRANKLAND & WAREING,

1960), de acordo com o descrito em Material e Métodos. Observa-se pelo Quadro-I que o ácido giberélico estimulou o crescimento em todas as concentrações testadas, pois o comprimento do hipocótilo das plântulas tratadas com GA<sub>3</sub> (em todas as concentrações) é significativamente maior ao nível de 5%, pelo teste de Tukey, em todas as concentrações em relação ao comprimento do hipocótilo das plântulas não tratadas. O comprimento do hipocótilo de plântulas tratadas nas várias concentrações não diferem significativamente entre si. Os valores mostrados no Quadro-I estão de acordo com os resultados obtidos por BRIAN et al. (1964) que utilizando plantas da variedade *Grand rapids* obtiveram o comprimento médio de 4,3 mm para o hipocótilo das plântulas não tratadas e valores de 8 a 12 mm para hipocótilo das plântulas tratadas com ácido giberélico.

**Quadro-I** - Efeito do ácido giberélico padrão na faixa de 0,5 a 20 ug/ml sobre o comprimento do hipocótilo de plântulas de alface da variedade *Grand rapids* germinadas na ausência de luz.

		Concentração de GA <sub>3</sub> (ug/ml)						
		Controle	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	20,0
ch (mm) **		4,5a*	9,1b	8,5b	8,6b	9,4b	9,5b	9,0b

\* Os números seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

\*\* Comprimento do Hipocótilo (ch em mm).

De acordo com os resultados, obtidos sob nossas



condições experimentais, verifica-se que o bioensaio do alface se constitui num recurso qualitativo para a determinação do efeito giberélico mais rápido e mais abrangente que o bioensaio do arroz, uma vez que no bioensaio do alface todas as plântulas tratadas com GA<sub>3</sub> na faixa de concentração de 0,5 a 20 ug/ml apresentam o comprimento do hipocótilo significativamente maior ao nível de 5% pelo teste de Tukey, que o comprimento do hipocótilo das plântulas do controle num período de 48 horas, enquanto que no bioensaio do arroz as plântulas foram cultivadas por um período de 15 dias e as plântulas tratadas nas concentrações de 15 e 20 ug/ml não apresentaram comprimento significativamente maior, ao nível de 5%, em relação ao controle.

### **3.4 - Caracterização metabólica do isolado UEM**

#### **3.4.1 - Influência do Inóculo no Crescimento Micelial**

A cultura de *Fusarium moniliforme*, isolado a partir de plantas de trigo infectadas da região de Maringá foi denominada de isolado UEM.

A cultura do isolado UEM em meio BD (meio líquido) obtida a partir de cultura em meio BDA (meio sólido), serviu de inóculo em todos os experimentos e foi denominada de "cultura mãe".

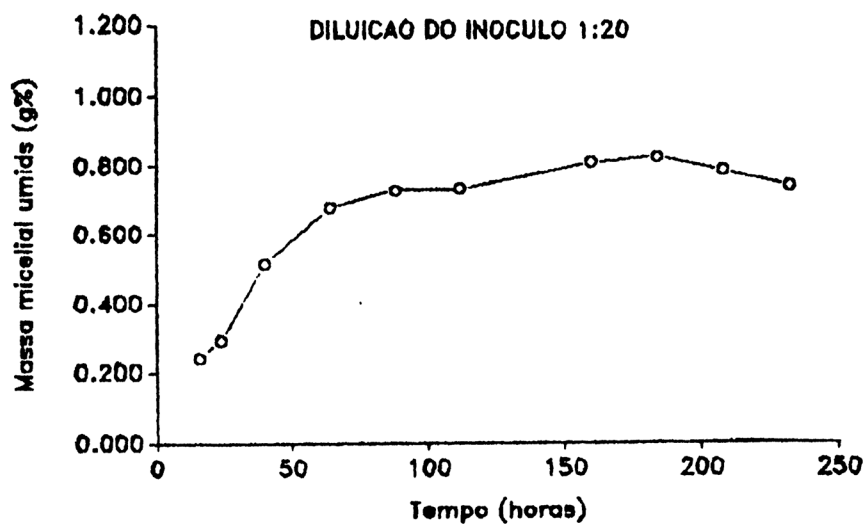
Com a finalidade de avaliar-se a influência do

inóculo no desenvolvimento micelial, frascos Erlenmeyers contendo 1.200 ml de meio BD foram inoculados com diferentes volumes da "cultura-mãe", obtendo-se cultivos com inóculos nas seguintes diluições: 1:20, 1:100, 1:200, 1:1000.

Os frascos com diferentes diluições foram incubados sob agitação (150 rpm) em câmara de temperatura controlada ( $29 \pm 1$  °C) por um período de 250 horas, sendo que periodicamente foram coletadas alíquotas (20 ml) de suspensão de hifas de cada Erlenmayer para determinação da massa úmida.

As curvas de crescimento do fungo (isolado UEM) obtidas de cultivos com diferentes diluições do inóculo (fig. 15 e 16), demonstram claramente que na cultura com diluição 1:1000 a massa micelial máxima é atingida em 100 horas de cultivo, enquanto que nas culturas com diluições 1:20, 1:100 e 1:200 a massa micelial máxima é atingida em torno de 60 horas de cultivo. Todos os cultivos estabilizaram-se com massa micelial úmida em torno de 0.8 g% entre 60 e 100 horas. Desta forma, a concentração do inóculo não exerceu influência no valor da massa micelial máxima atingida pela cultura do isolado UEM em meio BD.

A fase balanceada foi definida por BORROW et al. (1961) como o período no qual o fungo cresce exponencialmente em presença de todos os nutrientes, sendo que giberelinas raramente são produzidas nessa fase. O término da fase balanceada é indicada pela desaceleração na velocidade de crescimento. Desta forma, a figura-17 mostra que a velocidade máxima de crescimento do cultivo com diluição do inóculo



II

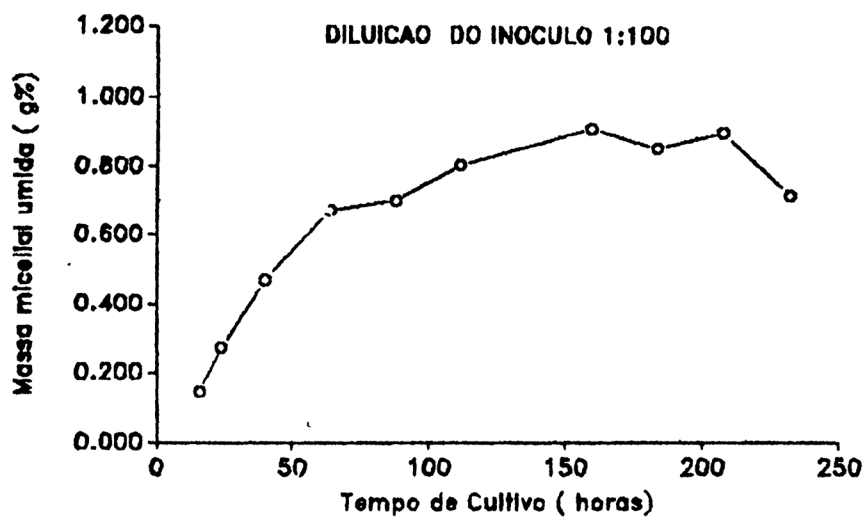
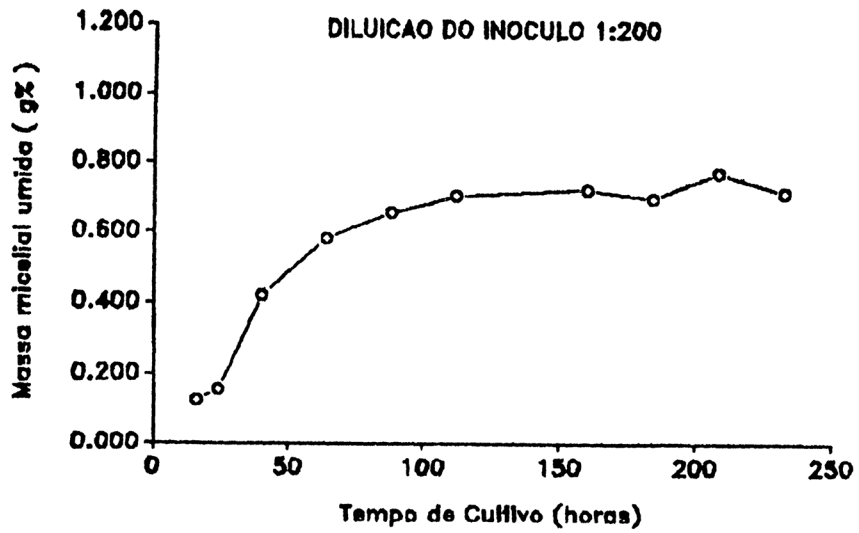


Figura 15- Curvas de crescimento do isolado UEM em meio BD sob agitação de 150 rpm em 'shake' de bandeja reciprocante e com temperatura controlada ( $29 \pm 1$  °C). Curva com inoculo na diluição de 1:20 (I) e curva de crescimento com inóculo na diluição de 1:100 (II).



II

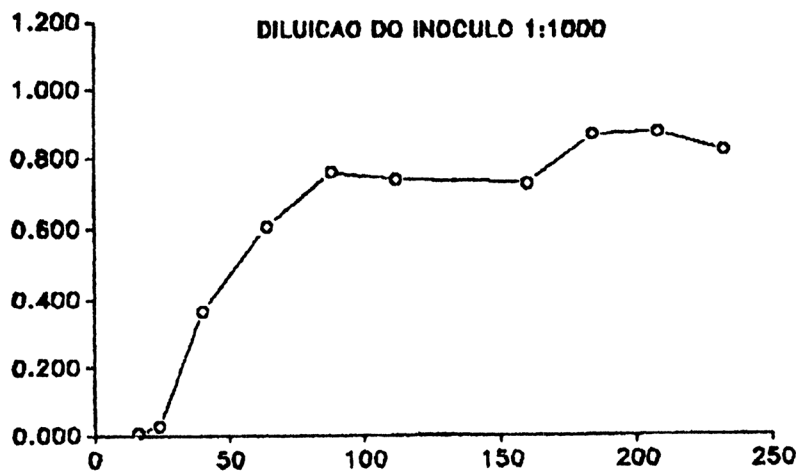


Figura 16- Curvas de crescimento do isolado UEM em meio BD sob agitação de 150 rpm em "shake" de bandeja recíproca e com temperatura controlada ( $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Curva de crescimento com inóculo na diluição de 1:200 (I) e curva de crescimento com inóculo na diluição de 1:1000 (II).

1:1000 foi 0,11 g/hora, sendo atingida após 43 horas de cultivo, enquanto que nas demais diluições (1:20, 1:100 e 1:200) a velocidade máxima de crescimento foi de 0,13 g/hora, sendo atingida em apenas 25 horas. A queda na velocidade de crescimento que se inicia entre 25 e 43 horas de cultivo, conforme concentração de inóculo utilizada, pode ser um indício do término da fase balanceada em consequência da exaustão de algum nutriente do meio, o que pode fazer com que o isolado UEM inicie a produção de metabólitos secundários entre 25 e 43 horas de cultivo, dependendo da quantidade de inóculo utilizado.

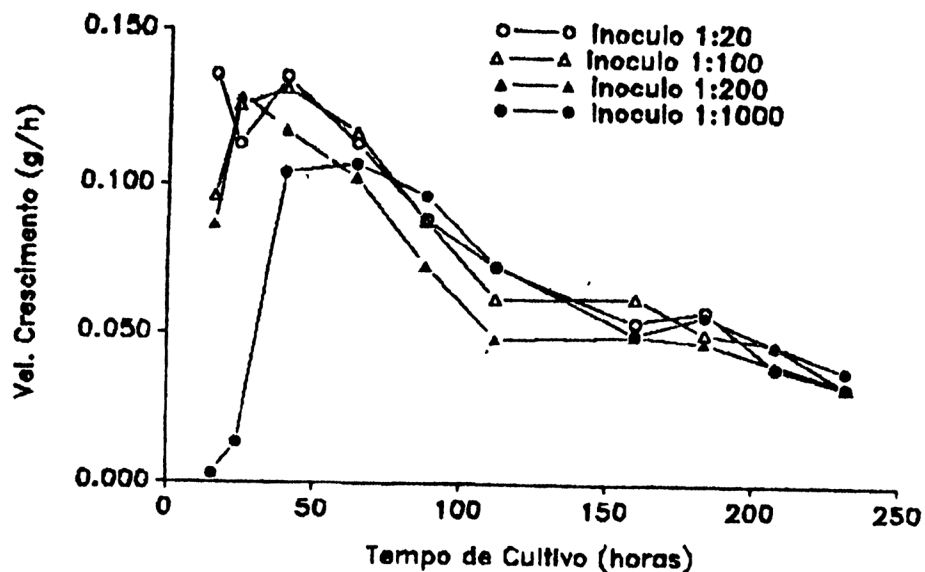


Figura 17- Curvas demonstrando a velocidade de crescimento dos cultivos do isolado UEM em meio BD estando o inóculo em diferentes diluições: 1:20 (o—o), 1:100 (▲—▲), 1:200 (▲—▲) e 1:1000 (●—●).

Com a finalidade de avaliar-se a disponibilidade de nutrientes no cultivo, realizou-se o experimento descrito adiante em que os teores de glucose, carboidratos totais e proteínas solúveis no meio de cultura foram determinados.

#### **3.4.2 - Cultivo do isolado UEM em meio BD - Parâmetros metabólicos**

O isolado UEM foi cultivado em meio BD por 360 horas e teve os seus principais parâmetros metabólicos determinados. A massa micelial cresceu exponencialmente até 28 horas de cultivo, após este período a razão de crescimento diminuiu até se tornar praticamente constante. A mudança de coloração do meio de cultura, de bege para rosado característico, coincidiu com o decréscimo da razão de crescimento do fungo, em torno de 36 horas de cultivo; de acordo com BORROW et al. (1961), isto significa que o nitrogênio se tornou um nutriente limitante da razão de crescimento, o que provoca um desvio no metabolismo do microrganismo, passando a funcionar de forma mais intensa o metabolismo secundário, que leva à produção de bikaverinas e giberelinas. Pela figura 18 observa-se que entre 30 e 40 horas ocorreu um decréscimo acentuado dos níveis de proteínas solúveis do meio de cultura, como no meio BD o nitrogênio é obtido a partir de proteínas celulares, podemos inferir que o

nitrogênio se tornou limitante nesse período, o que de acordo com as observações de BORROW et al. (1961).

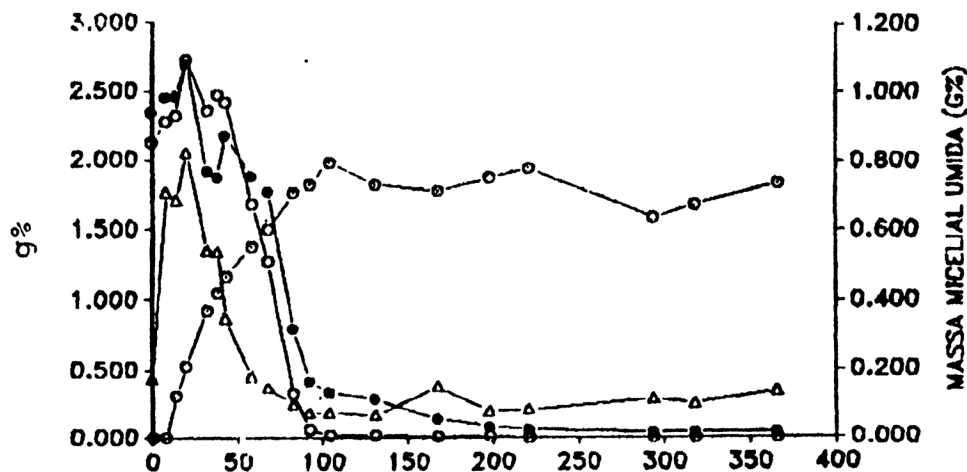


Figura 18- Determinação dos parâmetros metabólicos do cultivo do isolado UEM em meio BD. Curva de crescimento - massa micelial úmida em g% (  $\circ$ — $\circ$  ), proteínas solúveis em g% (  $\Delta$ — $\Delta$  ), carboidratos totais em g% (  $\bullet$ — $\bullet$  ) e glicose em g% (  $\circ$ — $\circ$  ).

No meio BD a fonte de carbono é constituída por amido da batata e por glicose, de forma que, para acompanhar o consumo de carboidratos pelo fungo, alíquotas do meio de cultura foram removidas periodicamente e tiveram os teores de glicose e carboidratos totais determinados. O amido foi também monitorizado neste experimento.

Observa-se pelo experimento da figura-18 que a glucose tornou-se limitante após 100 horas de cultivo, enquanto que o amido (figura-19) pode ser detectado até aproximadamente 200 horas de cultivo. Se o nitrogênio é exaurido entre 30 e 50 horas e a fonte de carbono perdura até 200 horas de cultivo, o meio BD apresenta características favoráveis para a produção do ácido giberélico (BORROW et al., 1961). Após 360 horas o cultivo foi interrompido e extraído de acordo com a técnica descrita no item 2.2.3.

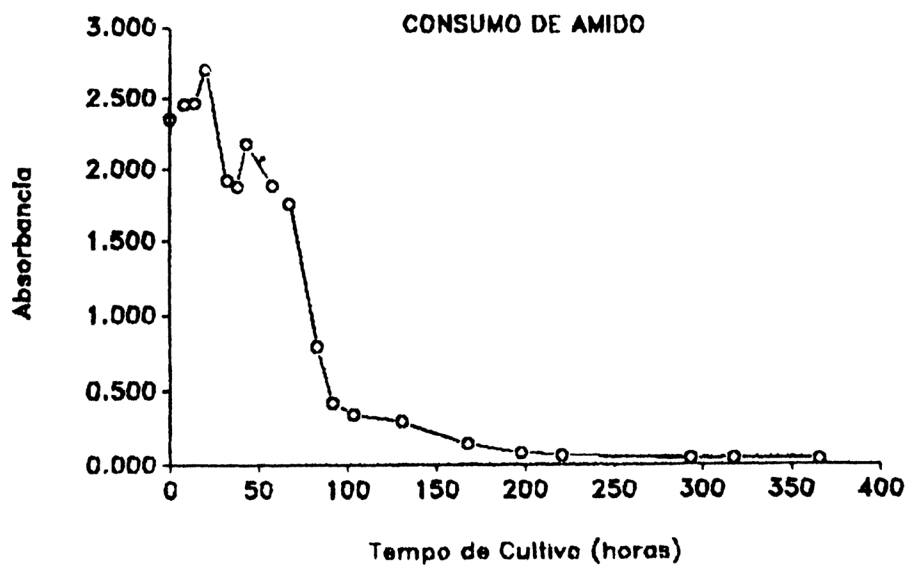


Figura 19- Consumo de amido pelo cultivo do isolado UEM em meio BD. Absorbância do filtrado do cultivo em 620 nm.



### 3.4.3 - Determinação da presença de $GA_3$ no meio de cultura

#### 3.4.3.1 - Em TLC

soluções alcoólicas do ácido giberélico padrão e dos extratos da cultura do isolado UEM após 120, 210 e 360 horas de cultivo na concentração de 1 mg/ml foram cromatografadas em placas de sílica, com a aplicação de 10  $\mu$ l da solução do ácido giberélico e 40  $\mu$ l das soluções dos demais extratos (extratos após 120, 210 e 360 horas). O sistema foi o mesmo utilizado no experimento padrão da figura-13 (vide item 3.2.2).

Como se observa no Quadro-II, todos os extratos apresentam mancha cromatográfica com Rf correspondente ao ácido giberélico ( $GA_3$ ).

A placa ainda quente foi observada sob luz ultravioleta, sendo constatada a emissão de fluorescência azulada na mancha cromatográfica corresponde ao  $GA_3$  padrão (RF = 0,49) e em todas as manchas com o mesmo Rf do ácido giberélico nos extratos das culturas. No sistema de solventes adotado, o ácido giberélico ( $GA_3$ ) não é separado da  $GA_1$  (CAVELL et al., 1967) e ambas apresentam fluorescência azulada quando observadas sob luz ultravioleta (MACMILLAN & SUTER, 1963); e como a  $GA_1$  também é uma giberelina produzida por cepas produtoras de ácido giberélico, não é possível afirmar, com base neste experimento, se a mancha cromatográfica nos extratos com RF = 0,49 são correspondentes

à GA<sub>3</sub> ou à GA<sub>1</sub>; provavelmente seja correspondente a uma mistura das duas substâncias.

Substância	Rf das manchas				
	I	II	III	IV	V
GA <sub>3</sub>	0.49				
Ext. Cultura 120 horas	0.49	0.60	0.64	0.77	0.84
Ext. Cultura 210 horas	0.49	0.61	0.64	0.78	0.84
Ext. Cultura 360 horas	0.49	0.61	0.64	0.76	0.85

**Quadro-II-** Cromatografia em camada delgada do ácido giberélico padrão e dos extratos do cultivo do `isolado UEM` após 120, 210 e 360 horas de cultivo. O sistema é o mesmo da figura-13.

#### 3.4.3.2 - Em HPLC

Como pôde ser observado pelo item anterior, o extrato do isolado UEM cultivado em meio BD apresenta mancha cromatográfica com o mesmo Rf do ácido giberélico padrão. Com a finalidade de confirmar a presença do ácido giberélico no extrato, o mesmo foi analisado também em cromatografia líquida de alta resolução.

O ácido giberélico padrão como pode ser observado na figura 20 apresenta um pico com um tempo de retenção igual a 22,95 minutos. No cromatograma do extrato do isolado UEM, figura-20, também se observa um pico de igual tempo de retenção, o que confirma os dados obtidos em TLC. No cromato

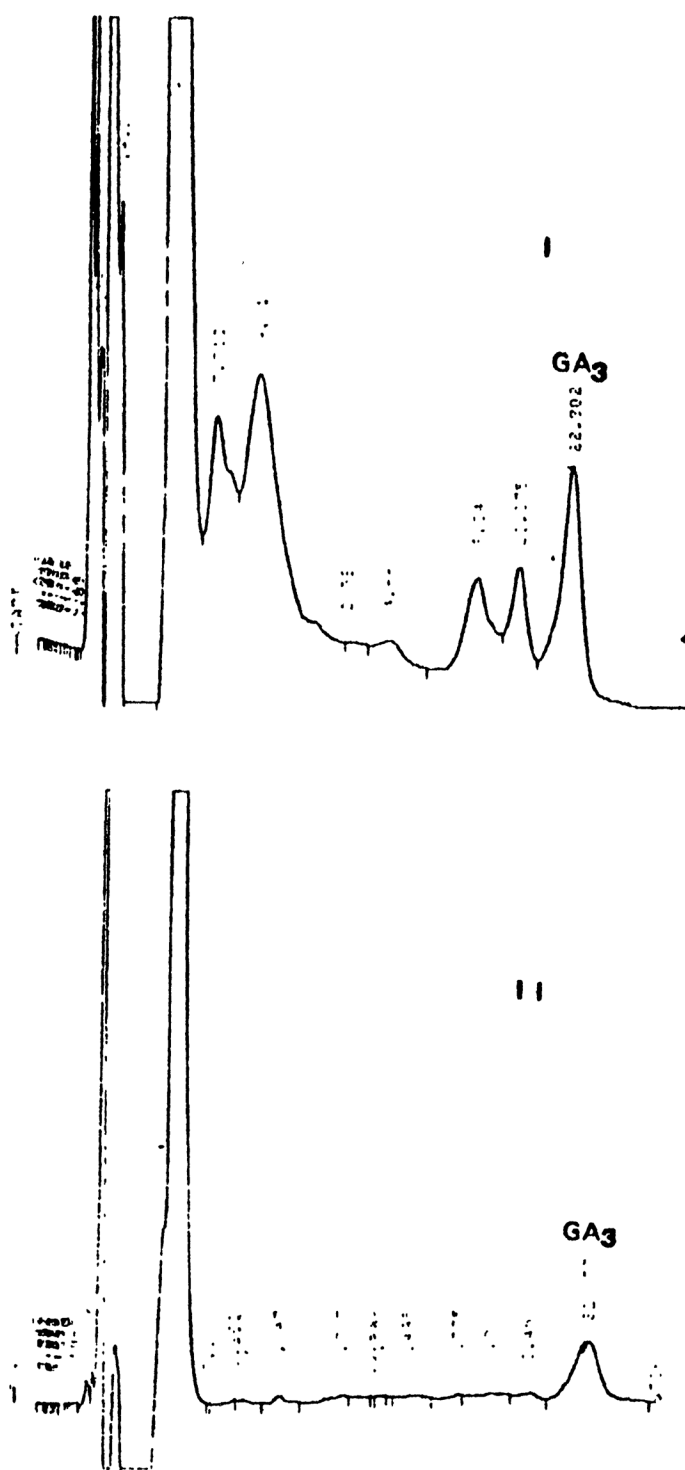


Figura 20- Perfil cromatográfico em HPLC do extrato do cultivo do isolado UEM em meio BD (I). Perfil cromatográfico do ácido giberélico padrão (II). O sistema utilizado foi o mesmo da figura-12.

grama da figura 20 observa-se também um pico com tempo de retenção igual a 20,075, que de acordo com a literatura (LIN & HEFTMANN, 1981) deve ser correspondente ao GA<sub>1</sub>; portanto, a mancha cromatográfica com RF = 0,49 determinada no extrato no ítem anterior, seria mesmo correspondente a uma mistura de GA<sub>3</sub> com a GA<sub>1</sub>. Os outros picos provavelmente correspondem a substâncias precursoras do ácido giberélico.

#### **3.4.4 - Bioteste do arroz com extratos da cultura do isolado UEM**

Os resultados das análises cromatográficas no ítem 3.4.3, demonstram que o extrato do isolado UEM, obtido após 360 horas de cultivo é constituído por uma mistura de substâncias, entre as quais se encontram provavelmente os ácidos giberélicos GA<sub>3</sub> e GA<sub>1</sub>. Tendo em vista estes resultados, testamos o extrato na concentração de 5,0 ug/ml, como ficou estabelecido no ítem 3.3, e também nas concentrações de 20 e 50 ug/ml, uma vez que provavelmente o extrato seja constituído de uma mistura de GAS (vide figura-20 e Quadro-II) as quais podem apresentar potência diferenciada em relação à capacidade de estimular o crescimento de plântulas de arroz (CROZIER et al., 1970). Observou-se (figura-21) que o extrato do isolado UEM promoveu o alongamento de plântulas de arroz em todas as concentrações testadas (5,0, 20 e 50 ug/ml), estes resultados confirmam a presença de giberelinas ativas no extrato do isolado UEM cultivado em meio BD.

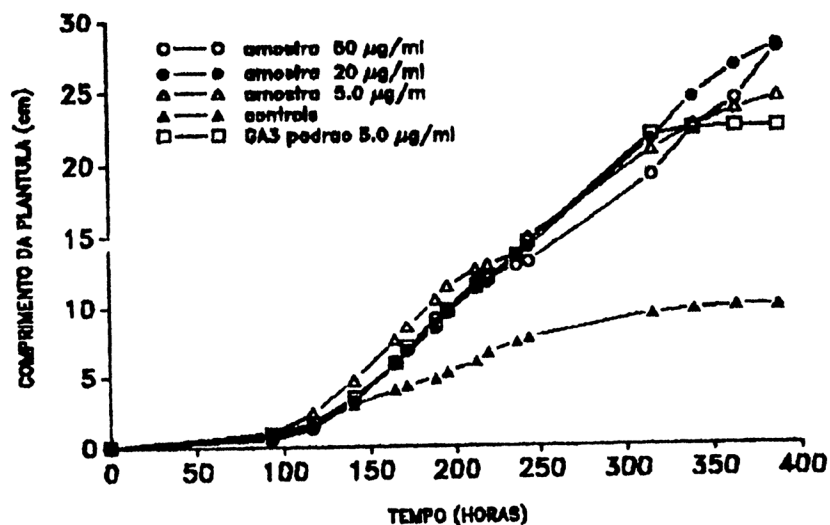


Figura 21- Efeito do extrato da cultura do isolado UEM após 360 horas de cultivo sobre o comprimento de plântulas de arroz: extrato na concentração de 5,0 ug/ml ( $\Delta$ — $\Delta$ ), extrato na concentração de 20 ug/ml ( $\bullet$ — $\bullet$ ), extrato na concentração de 50 ug/ml ( $\circ$ — $\circ$ ), controle-tratamento com água destilada ( $\triangle$ — $\triangle$ ) e tratamento com GA<sub>3</sub> padrão na concentração de 5,0 ug/ml ( $\square$ — $\square$ ).

### 3.4.5 - Bioteste do hipocótilo do alface com extratos da cultura do isolado UEM

soluções preparadas a partir do extrato do "isolado UEM" após 360 horas de cultivo nas concentrações de 5,0, 20,0 e 50,0 ug/ml foram bioensaiadas de acordo com o descrito no item 2.2.4. Observou-se que todas as Soluções testadas foram hábeis em estimular o crescimento do hipocótilo do alface (Quadro-III), pois o comprimento do hipocótilo das plântulas tratadas com Soluções do extrato do

isolado UEM é significativamente maior ao nível de 5%, pelo teste de Tukey, em todas as concentrações (5,0, 20,0 e 50,0 ug/ml) em relação ao comprimento do hipocótilo das plântulas do controle e das plântulas tratadas com GA<sub>3</sub> padrão. Isto pode significar que o extrato contenha alguma giberelina que induz uma resposta melhor que o GA<sub>3</sub> no bioensaio do hipocótilo do alface.

**Quadro-III** - Efeito do extrato da cultura do isolado UEM após 360 horas de cultivo sobre o comprimento do hipocótilo de plântulas de alface da variedade *Grand rapids* germinadas na ausência de luz (as medidas foram efetuadas após 48 horas de tratamento).

	Tratamento ug/ml				
	Amostra 5,0	Amostra 20,0	Amostra 50,0	Controle H <sub>2</sub> O dest.	GA <sub>3</sub> Padrão 5,0
ch (mm) **	14,2 b*	13,0 b	14,7 b	4,5a	9,0 c

\* Os números seguidos de mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%.

\*\* Comprimento do hipocótilo das plântulas de alface após 48 horas de tratamento.

Esta giberelina poderia ser a GA<sub>7</sub>, uma vez que a GA<sub>7</sub> é um dos intermediários da via de biossíntese do ácido giberélico em cultura de *Fusarium moniliforme* (PITEL et al., 1971) e de acordo com CROZIER et al. (1970) é mais potente que o GA<sub>3</sub> em relação à resposta induzida no bioensaio do hipocótilo do alface e apresenta potência equivalente ao GA<sub>3</sub> no bioensaio do arroz. O comprimento do hipocótilo de

plântulas tratadas nas várias concentrações não diferem significativamente entre si.

Os resultados dos bioensaios (plântulas de arroz e hipocótilo de alface), confirmam os resultados das análises cromatográficas, itens 3.4.3, portanto o isolado UEM produz giberelinas em meio de cultura BD quando cultivado sob as condições experimentais descritas.

### **3.5 - Influência do isoesteviol como substrato inespecífico sobre parâmetros metabólicos do isolado UEM**

#### **3.5.1 - Cultivo do isolado UEM em presença de isoesteviol**

Ficou demonstrado pelos experimentos descritos, que o isolado UEM produz ácido giberélico quando cultivado em meio BD sob as condições descritas.

De acordo com a literatura (GIANFAGNA et al., 1982; BEARDER et al., 1974; BAKKER et al., 1974; DIAZ et al., 1984; FRAGA et al., 1987) o sistema enzimático que atua na via para a produção de giberelinas apresenta baixa especificidade, sendo capaz de metabolizar substâncias semelhantes aos precursores caurenóides das giberelinas em substâncias semelhantes às giberelinas.

Com a finalidade de verificar se o isolado UEM metaboliza o isoesteviol, o isolado foi cultivado na presença de isoesteviol na concentração de 1,0 mg/ml. Seis frascos

Erlenmeyers de 2000 ml contendo 240 ml de meio BD foram utilizados nesse primeiro experimento visando estudar o metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM. Em três frascos foram adicionados 8,3 ml de uma solução aquosa de isoesteviol a 3% e aos frascos utilizados como controle adicionou-se 10 ml de água destilada. Os meios foram autoclavados e após esfriarem, cada frasco recebeu, sob condições estéreis, 2,5 ml de um cultivo do isolado UEM em meio BD de 48 horas de idade. Os frascos foram incubados em câmara com mesa rotatória de temperatura controlada ( $29 \pm 1$  °C), a 150 rpm, sendo que alíquotas de 20 ml foram coletadas periodicamente para determinação do provável consumo do isoesteviol e produção de ácido giberélico.

### **3.5.2 - Consumo do isoesteviol no cultivo do isolado UEM**

Volumes de 10 ml do meio de cultivo do isolado UEM, em presença de isoesteviol no tempo zero, foram extraídos com metanol e os extratos obtidos foram ressuspensos em água destilada para um volume final de 20 ml, de tal forma a se obter uma solução de 0,5 mg/ml, considerando-se que o isoesteviol estivesse dissolvido de forma homogênea no meio de cultura e que a extração com metanol tenha sido eficiente.

A figura-22 mostra o perfil cromatográfico do isoesteviol no tempo zero de cultivo, como seria de se esperar, este perfil é similar ao do padrão do isoesteviol



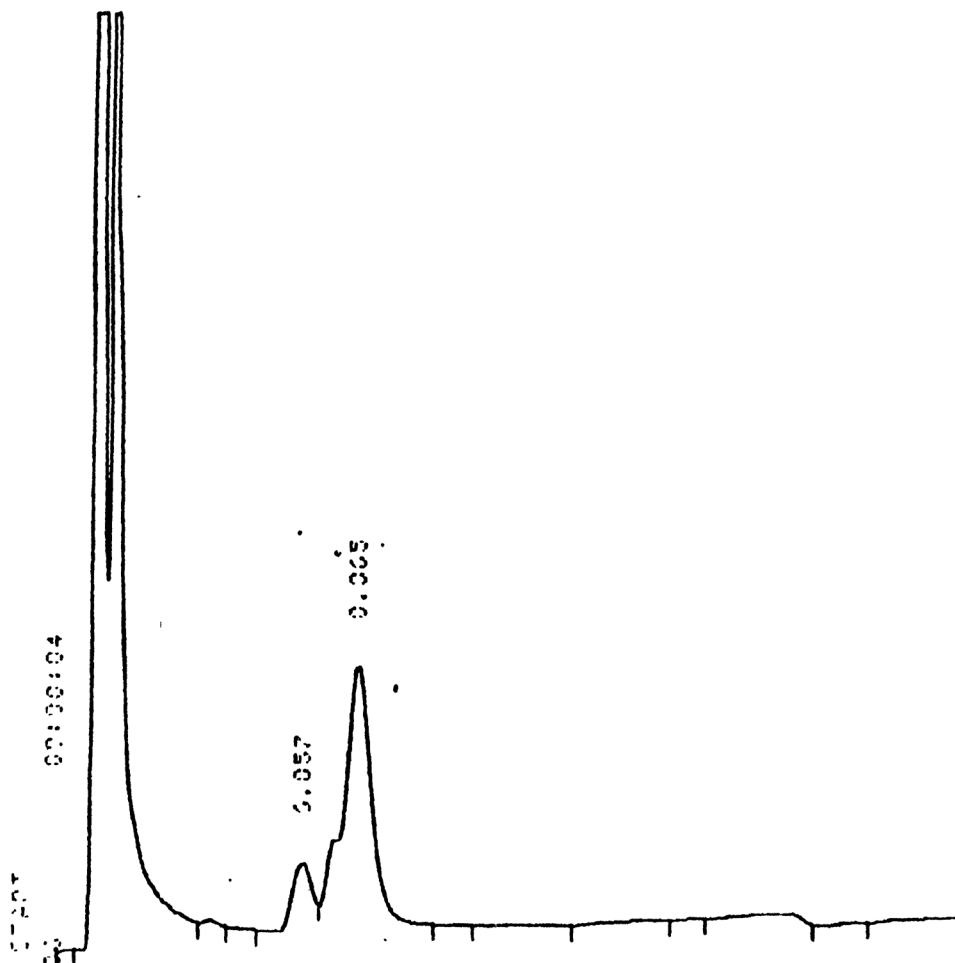


Figura 22- Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM em presença de isoesteviol na concentração de 1 mg/ml. O cromatograma foi feito com uma coluna Lichrosorb RP-18 (um) de 25x0,4 cm como fase fixa e metanol:NaOH 0.005 M (65:35) como fase móvel, à temperatura de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pressão de 100 atm e detecção ao UV a 210 nm. A amostra analisada foi um extrato da cultura obtido no tempo zero. O extrato referente a 10 ml de cultivo teve o seu volume completado para 20 ml.

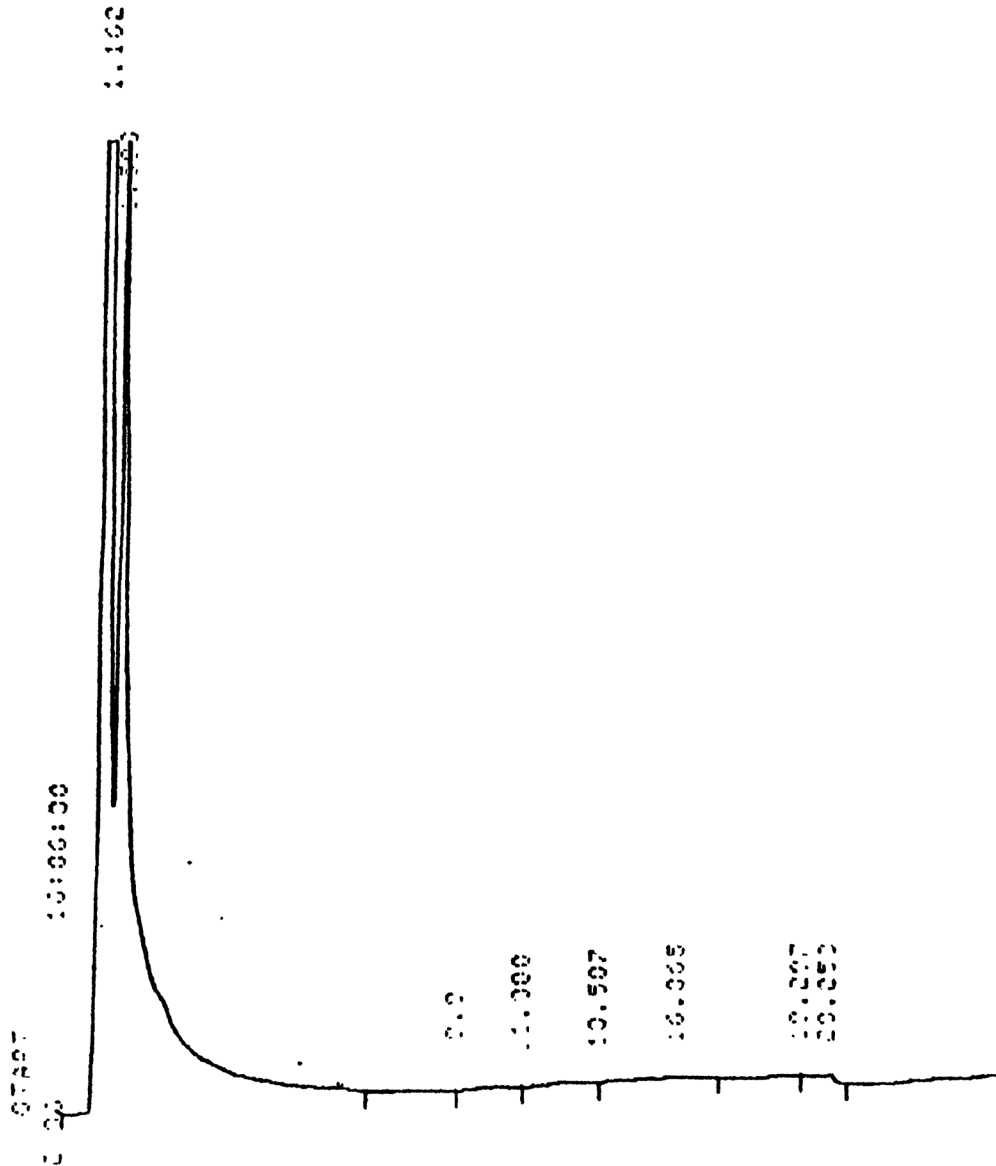


Figura 23- Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM cultivado em meio BD na ausência de isoesteviol (controle) obtido no tempo zero. O cromatograma foi feito com uma coluna Lichrosorb RP-18 (um) de 25x0,4 cm como fase fi-xa e metanol:NaOH 0.005 M (65:35) como fase móvel, à temperatura de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pressão de 100 atm e detecção ao UV a 210 nm.

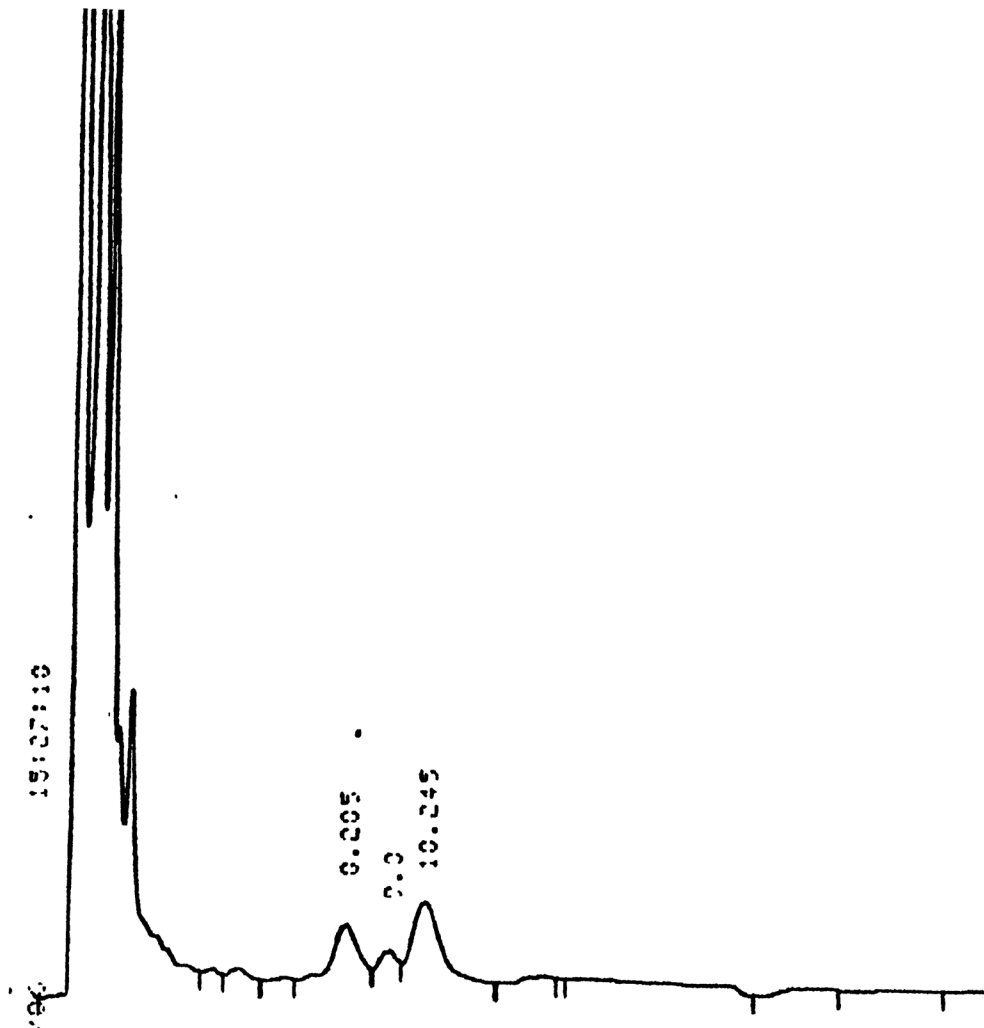


Figura 24- Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do isolado UEM em presença de isoesteviol na concentração de 1 mg/ml. O cromatograma foi feito com uma coluna Lichrosorb RP-18 (um) de 25x0,4 cm como fase fixa e metanol:NaOH 0.005 M (65:35) como fase móvel, a temperatura de 29 ± 2°C, pressão de 100 atm e detecção ao UV a 210 nm. A amostra analisada foi um extrato obtido a partir de 10 ml do cultivo, e ressuspensão em um mesmo volume de metanol após 43 horas de cultivo.

(figura-10). Embora não tenha sido possível detectar o isoesteviol num único pico, como seria desejável, o consumo do isoesteviol no meio de cultura BD pelo isolado UEM, pôde ser acompanhado satisfatoriamente nessas condições, uma vez que no cromatograma obtido no extrato do controle (figura 23) não se observou nenhuma substância com tempo de retenção que pudesse interferir na interpretação dos dados relativos ao consumo do isoesteviol, obtidos nos cromatogramas mostrados nas figuras 22 e 24.

Após 43 horas de cultivo, uma alíquota de 10 ml foi coletada, extraída e analisada de acordo com o procedimento adotado para amostras analisadas no tempo zero.

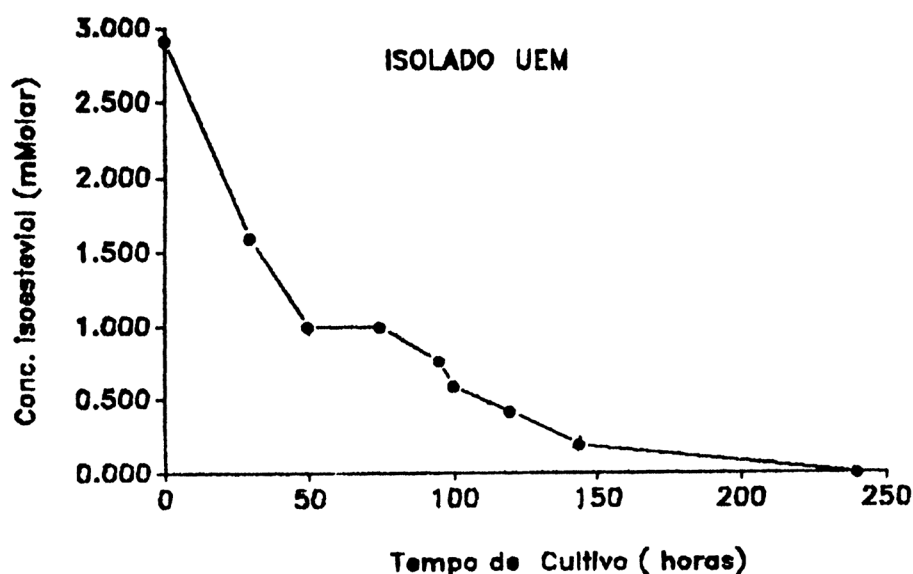


Figura 25- Curva demonstrando a cinética do metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM cultivado em meio BD. A concentração de isoesteviol foi determinada através da análise em HPLC nas mesmas condições das figuras-22, 23 e 24.

A curva apresentada na figura-25 demonstra que mais de 66% do isoesteviol, foi metabolizado em apenas 43 horas de cultivo. Após 150 horas o isoesteviol não pode mais ser detectado no meio de cultura, sendo que o consumo do isoesteviol entre 50 e 150 horas foi bastante lento (figura-25) em relação ao consumo do isoesteviol observado nas primeiras 50 horas do cultivo.

De acordo com BEARDER et al. (1976) a cepa mutante B<sub>1</sub>-41a apresenta a mesma via para a biossíntese de GAs que opera na maioria das cepas de *Fusarium moniliforme* que produzem o ácido giberélico; com exceção, que no mutante B<sub>1</sub>-41a não ocorre a metabolização do caurenol a ácido caurenóico. Com relação ao isoesteviol, se comparado aos precursores caurenóides das giberelinas, seria considerado um análogo do ácido caurenóico. Dessa forma, é bem provável que as substâncias obtidas a partir do isoesteviol, por uma cepa que tenha a capacidade de produzir o ácido giberélico como é o caso do isolado UEM, sejam similares às substâncias obtidas a partir do isoesteviol pela cepa mutante B<sub>1</sub>-41a. Os autores acima referidos, utilizando a cepa mutante B<sub>1</sub>-41a demonstraram que o isoesteviol na concentração 0,2 mg/ml é metabolizado em apenas 24 horas de cultivo a substâncias correspondentes às giberelinas, porém com o sistema de anéis C/D rearranjados (iso-GA<sub>17</sub>, iso-GA<sub>20</sub> e 13-hidróxi GA<sub>12</sub>). Assim sendo, é provável que essas substâncias estejam presentes no extrato do cultivo do isolado UEM realizado na presença de isoesteviol na concentração de 1,0 mg/ml.

Infelizmente as condições de análise do isoesteviol em HPLC não foram propícias para a determinação da presença do ácido giberélico no meio de cultura. Também não foi possível detectar o aparecimento de nenhum outro pico através deste sistema de análise que por comparação com o cromatograma do controle pudesse nos indicar a presença de produtos do metabolismo do isoesteviol.

Na tentativa, pois, de se determinar as variações metabólicas induzidas pelo isoesteviol outras técnicas analíticas foram adotadas e são descritas a seguir.

### **3.5.3 - Análise em TLC dos extratos dos cultivos realizados em presença de isoesteviol**

Para análise em TLC, alíquotas de 10 ml do meio de cultura foram coletadas em várias fases do cultivo do isolado UEM. As alíquotas foram extraídas de acordo com a técnica descrita no item 2.2.3. Os extratos foram então analisados em cromatografia de camada delgada com a finalidade de detectar a presença do ácido giberélico e/ou dos produtos do metabolismo do isoesteviol. Os resultados obtidos são mostrados no Quadro-IV. Observa-se nos extratos do controle, substâncias com comportamento cromatográfico diferente do comportamento das substâncias nos extratos do cultivo realizado em presença de isoesteviol na concentração de 1 mg/ml (3 mMolar). O extrato obtido a partir do controle após 147 horas de cultivo apresentou mancha

cromatográfica (Rf=0,52) referente ao ácido giberélico padrão (RF = 0.51), enquanto que nos extratos dos cultivos realizados em presença de isoesteviol nos tempos 147, 210 e 221 horas não foi detectada nenhuma mancha com Rf correspondente ao ácido giberélico. A mancha cromatográfica com RF = 0.35 deve ser referente a um produto do metabolismo do isoesteviol, uma vez que não foi detectada nos extratos do controle.

**Quadro-IV**

Substâncias	Rf das manchas				
	I	II	III	IV	V
GA <sub>3</sub> padrão	0.51				
Isoesteviol Padrão	0.90				
Ext. Cultura Controle	0.52	0.62	0.66	0.79	0.85
Ext. Cultura 0 horas	0.91				
Ext. Cultura 147 horas	0.35	0.58	0.69	0.78	0.90
Ext. Cultura 210 horas	0.35	0.59	0.70	0.76	0.89
Ext. Cultura 221 horas	0.34	0.59	0.70	0.76	0.87

**Quadro-IV** - Cromatografia em camada delgada do isoesteviol padrão, do ácido giberélico padrão e dos extratos da cultura do isolado UEM cultivado em presença de isoesteviol e na ausência de isoesteviol (cultura controle). As condições foram as mesmas aplicadas à análise do padrão de GA<sub>3</sub> (figura-13).

Portanto os resultados indicam que o isolado UEM em presença do isoesteviol na concentração de 1 mg/ml não produz ácido giberélico. O extrato foi submetido a análise em HPLC para efeito de confirmação, como relatado a seguir.

#### **3.5.4. Determinação de giberelinas através de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).**

Vários extratos do isolado UEM cultivados em meio BD na presença de isoesteviol, foram analisados em cromatografia de camada delgada (ítem 3.5.3) e não apresentaram mancha cromatográfica referente ao ácido giberélico, indicando que o isoesteviol na concentração de 1 mg/ml (3.0 mMolar) exerce uma espécie de inibição na produção de ácido giberélico. Com a finalidade de confirmar os dados obtidos através de TLC, foi realizada a análise do extrato após 250 horas de cultivo em cromatografia líquida de alta resolução, de acordo com o descrito no ítem 2.2.5. Observou-se que o ácido giberélico padrão, na concentração de 50 ug/ml, apresentou tempo de retenção igual a 24,1 (figura-26) enquanto que o cromatograma (figura 27) do extrato do isolado UEM após 250 horas de cultivo não apresenta nenhum pico com esse tempo de retenção, portanto esse resultado parece confirmar a ausência de ácido giberélico no extrato do isolado UEM, cultivado em presença de isoesteviol na concentração de 1,0 mg/ml.



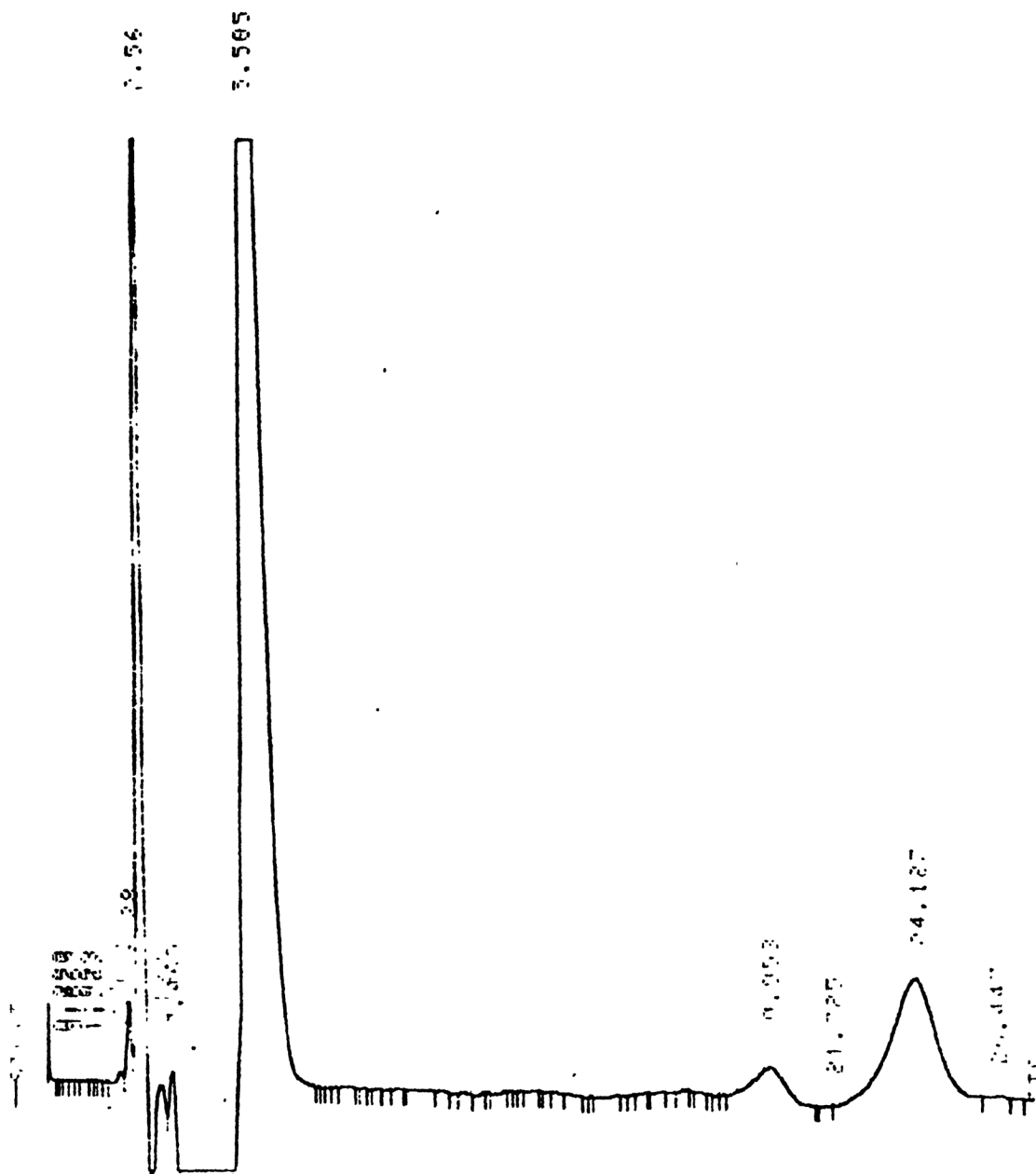


Figura 26- Cromatograma em HPLC do ácido giberélico padrão. O cromatograma foi feito com uma coluna Licrosorb Si-60 (um) como fase fixa e uma mistura n-hexano:etanol:ácido acético na proporção de 97:7:0.05 como fase móvel, à temperatura de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pressão de 150 atm e detecção ao UV a 207 nm. O ácido giberélico padrão estava na concentração de 0,5 mg/ml.

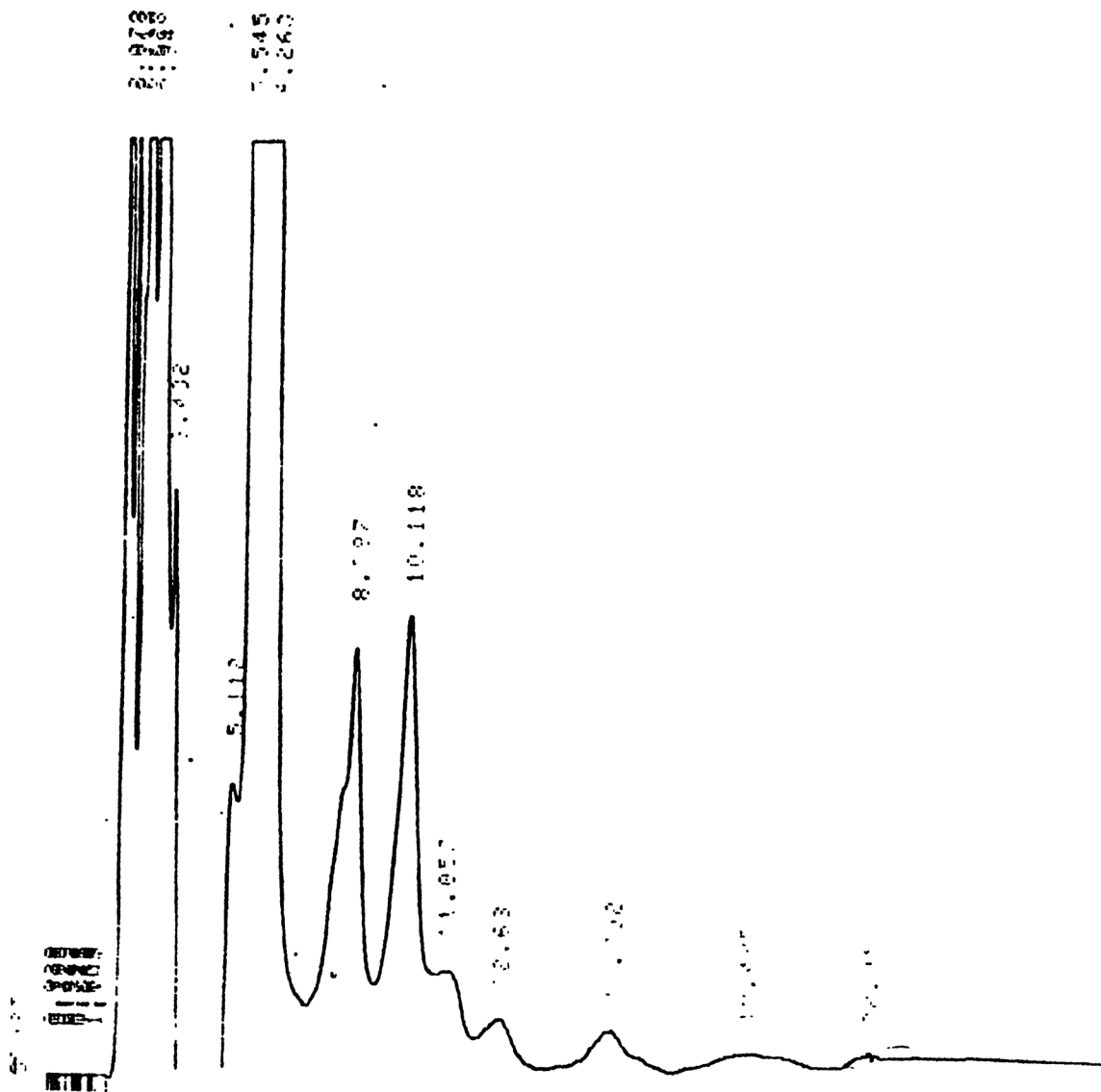


Figura 27- Cromatograma em HPLC do extrato do cultivo do isolado UEM incubado em presença de isoesteviol na concentração de 1 mg/ml após 250 horas de cultivo. O cromatograma foi feito com uma coluna Licrosorb Si-60 (10  $\mu$ m) como fase fixa e uma mistura de n-hexano:etanol:ácido acético na proporção de 97:7:0.05 como fase móvel, à temperatura de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , pressão de 150 atm e detecção ao UV a 207 nm. A amostra analisada estava na concentração de 5 mg/ml.

O isoesteviol inibiu claramente a produção de ácido giberélico na cultura do isolado UEM. Este efeito de inibição não pôde ser detectado por BEARDER et al. (1976), uma vez que os mesmos empregaram a cepa B<sub>1</sub>-41a, a qual está bloqueada para a biossíntese de giberelinas entre o caurenol e ácido caurenólico (BEARDER et al., 1974). Uma das explicações para a inibição seria de que o isoesteviol compete com o seu análogo e intermediário natural da via de biossíntese de giberelinas, o ácido caurenólico; uma vez que o isoesteviol estava presente no meio de cultura numa concentração relativamente alta, 1 g/l; enquanto cepas com excelente rendimento em relação à produção de ácido giberélico, apresentam em torno de 40 mg/l de ácido caurenólico no seu meio de cultura. Estrapolando-se este valor de 40 mg/ml de ácido caurenólico para o meio de cultivo do isolado UEM, em presença de isoesteviol, na concentração de 1 g/l, admite-se a possibilidade de que a biossíntese de giberelinas a partir do ácido caurenólico tenha sido bastante afetada. Isto foi provavelmente devido à competição estabelecida entre o ácido caurenólico e o seu análogo isoesteviol. O fato de que 0,7 mg/ml ter sido metabolizado pelo isolado UEM em apenas 43 horas de cultivo, reforça a hipótese de que a inibição, em parte, tenha sido provocada pela competição entre o isoesteviol e o ácido caurenólico. Considerando-se como válida a hipótese apresentada, questiona-se que giberelinas poderiam ter sido produzidas após a completa metabolização do isoesteviol, o que ocorreu

em torno de 150 horas de cultivo, como por ser observado pelo experimento mostrado na figura 25; porém não foi constatada a presença de ácido giberélico no extrato obtido após 250 horas de cultivo, como pode ser então observado pelos resultados apresentados no Quadro IV e na figura-27. A inibição que persiste após a completa metabolização do isoesteviol, poderia, em parte, ser explicada pela grande quantidade de iso-giberelinas que teriam sido obtidas a partir do isoesteviol no meio de cultura, as quais exerceriam efeito semelhante ao ácido giberélico que, quando adicionado exogenamente à cultura de *Gibberella fujikuroi*, inibe a sua própria biossíntese (DOCKERILL & HANSON , 1981).

#### **3.5.5. Bioteste do arroz**

Os resultados das análises cromatográficas TLC e HPLC apresentados nos itens 3.5.3 e 3.5.4 demonstram que na cultura do isolado UEM em presença de isoesteviol na concentração de 3.0 mMolar não ocorreu a produção de ácido giberélico. Ficou demonstrado ainda que o isoesteviol foi metabolizado neste cultivo. Com a finalidade de verificar se o produto do metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM apresenta ou não propriedade similar à das giberelinas, qual seja, estimular o crescimento de plântulas de arroz, foi realizado um bioensaio conforme descrito no item 2.2.4 com Soluções em concentrações que foram hábeis em estimular o

crescimento de plântulas de arroz no experimento apresentado no item 3.4.4, ou seja, nas concentrações de 5,0, 20,0 e 50,0 ug/ml. Foram realizados testes estatísticos com os dados, referentes ao comprimento das plântulas, obtidos após 90, 120 e 169 horas de tratamento. Os resultados (Quadro-V) mostraram que o extrato da cultura do isolado UEM cultivado na presença de isoesteviol não estimulou o crescimento de plântulas de arroz nas concentrações testadas (5,0, 20,0 e 50,0 ug/ml).

**Quadro-V** - Comprimento das plântulas de arroz após 90, 120 e 169 horas de tratamento com ácido giberélico padrão (5,0 ug/ml), água destilada (controle) e extrato do meio de cultura do isolado UEM em presença de isoesteviol: amostra de 5,0 ug/ml, amostra de 20 ug/ml e amostra de 50 ug/ml.

Tempo de Cultivo	Tratamento ug/ml				
	Amostras do extrato			Controle	GA <sub>3</sub> Padrão
	5,0	20,0	50,0	H <sub>2</sub> O dest.	5,0
90	8,9 a*	8,7 a	7,5 b	8,4 a	14,0 c
120	12,1 d	12,4 d	10,1 e	12,9 d	17,0 f
169	14,1 g	14,4 g	14,6 g	14,0 g	21,0 h

\* Nos diferentes tempos os números seguidos de mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%.

\*\* O termo amostra se refere à solução do extrato do cultivo do isolado UEM em presença de isoesteviol 3 mMolar após 250 horas de cultivo.

Pode-se considerar, que não tendo sido detectado a presença de ácido giberélico por HPLC e TLC nos extratos e não havendo atividade giberélica sobre o bioteste do arroz é possível que os produtos metabólicos do isoesteviol sejam os descritos por BEARDER et al. (1976); as quais não apresentam a hidroxila em C-3, atributo estrutural indispensável às substâncias giberélicas que exercem o efeito promotor do crescimento de plântulas.

Importante se faz citar, o fato de que o comprimento das plântulas de arroz após 90 e 120 horas de tratamento com o extrato na concentração de 50 ug/ml foram significativamente menor ao nível de 5%, pelo teste de Tukey, em relação ao controle. Após 169 horas de tratamento a diferença não foi significativa ao nível de 5%. Portanto, o produto do metabolismo do isolado UEM exerceu um efeito de inibição sobre o crescimento de plântulas de arroz. Isto significa provavelmente, que o produto do metabolismo do isoesteviol, inibiu a produção endógena de giberelinas nas plântulas de arroz da mesma forma que foi capaz de inibir a produção endógena de ácido giberélico na cultura do isolado UEM, mesmo depois de 150 horas de cultivo, quando todo o isoesteviol já havia sido metabolizado (figura 25). Este resultado parece portanto, reforçar a hipótese de que houve, a partir do isoesteviol, a produção de substâncias análogas às giberelinas, as quais não exerceriam efeito giberélico pelos motivos já discutidos. No entanto a analogia estrutural

dos anéis A e B dessas substâncias com os anéis A e B das giberelinas naturais permitiriam às mesmas exercerem papel regulatório sobre a biossíntese das giberelinas, da mesma forma que o ácido giberélico e outras GAS de final de via regulam a sua própria biossíntese como proposto por DOCKERILL & HANSON, (1981). Enfim, as substâncias análogas às giberelinas, produzidas pelo metabolismo do isoesteviol, simulariam uma condição metabólica de superprodução de giberelinas, o que efetivamente levaria a uma redução ou inibição da atividade da via responsável pela biossíntese de GAS tanto em plantas como em fungos.

Alguns compostos, que inibem a produção endógena de GAS, são empregados como reguladores do crescimento de plantas na agricultura (HANSON, 1983), podendo apresentar entre outras, a vantagem de melhorar a produção de cereais e frutas (GRAEBE, 1987). Portanto, o metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM pode ter resultado num produto com potencial para desempenhar a função de regulador do crescimento de plantas. WADA et al. (1979) já propuseram tal técnica com o iso-caurenóico. Em outras palavras o metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM, teria produzido substâncias anti-giberélicas.

### 3.6 - Bioteste Demonstrando o Efeito do Isoesteviol sobre a Ação do ácido Giberélico

Embora os dados relativos às análises cromatográficas HPLC e TLC e ao bioensaio apresentados no item 3.5 tenham indicado a ausência de ácido giberélico no extrato do cultivo do isolado UEM, em presença de isoesteviol, questionou-se que uma quantidade de ácido giberélico, insuficiente para ser detectada pelos métodos cromatográficos adotados sob nossas condições experimentais, poderiam estar presentes no extrato. Neste caso, os resultados negativos nos bioensaios do arroz poderiam ser consequência de algum tipo de interação entre o ácido giberélico e o isoesteviol ou ainda, entre o ácido giberélico e os produtos do metabolismo do isoesteviol, resultando na perda da atividade fitormonal da GA<sub>3</sub>.

Com a finalidade de verificar se o isoesteviol ou o produto do metabolismo do isoesteviol inibem a ação hormonal do ácido giberélico, bioensaios com plântulas de alface foram realizados. As seguintes Soluções foram ensaiadas: Solução A, contendo 10,0 ug/ml de GA<sub>3</sub> e 10,0 ug/ml de isoesteviol; Solução B, contendo 10,0 ug/ml de ácido giberélico e 10,0 ug/ml dos produtos do metabolismo do isoesteviol; ácido giberélico na concentração de 10,0 ug/ml; isoesteviol na concentração de 10,0 ug/ml; produtos do metabolismo do isoesteviol na concentração de 10,0 ug/ml e controle.

Como pode ser visto pelos experimentos mostrados



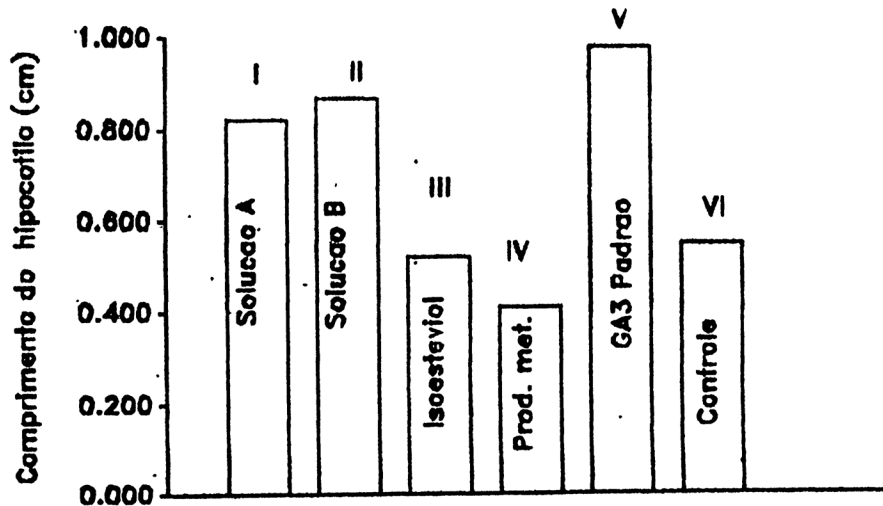


Figura 28- Efeito do ácido giberélico (10 ug/ml) sobre plântulas de alfaca na presença de isoesteviol (10 ug/ml) e do produto do metabolismo do isoesteviol (10 ug/ml) pelo isolado UEM em meio BD. Isoesteviol (10 ug/ml), produto do metabolismo (10 ug/ml) e controle-água destilada. Solução A: contendo 10 ug/ml de GA<sub>3</sub> + 10 ug/ml de isoesteviol (I); Solução B: contendo 10 ug/ml de GA<sub>3</sub> + 10 ug/ml do produto do metabolismo do isoesteviol (II); Isoesteviol na concentração de 10 ug/ml (III); Produto do metabolismo do isoesteviol na concentração de ug/ml (IV), Solução de ácido giberélico na concentração de 10 ug/ml (V) e Água destilada (controle) (VI).

na figura-28, o isoesteviol ou o seu produto de metabolismo não inibem ação hormonal do ácido giberélico, devido a algum tipo de interação entre o ácido giberélico e o isoesteviol ou entre o ácido giberélico e o produto do metabolismo do isoesteviol cujo resultado seria um composto inativo; uma vez que o ácido giberélico foi capaz de estimular o crescimento do hipocótilo de alface na presença do isoesteviol (solução A), e também na presença do produto do metabolismo do isoesteviol (solução B). O interessante é que as plântulas tratadas com o produto do metabolismo do isoesteviol na concentração de 10 ug/ml na ausência de GA<sub>3</sub> foram significativamente menores do que as plântulas do controle ao nível de 5% pelo teste de Tukey. Isto confirma que o produto do metabolismo do isoesteviol atua de forma semelhante a alguns controladores do crescimento (GRAEBE, 1987), ou seja, inibem a produção de GAs pelas plantas. As plântulas tratadas com isoesteviol na concentração de 10 ug/ml não foram significativamente diferentes em relação ao controle a nível de 5% pelo teste de Tukey.

A experiência da figura-29 demonstra que o ácido giberélico na concentração de 5.0 ug/ml é capaz de acelerar o crescimento de plântulas de arroz tratadas com isoesteviol na concentração de 100 ug/ml, deve-se realçar que neste experimento o GA<sub>3</sub> está na razão de 1/20 em relação ao isoesteviol e ainda assim a GA<sub>3</sub> exerce o seu efeito hormonal, o que demonstra definitivamente que o isoesteviol não inibe a ação hormonal do ácido giberélico.

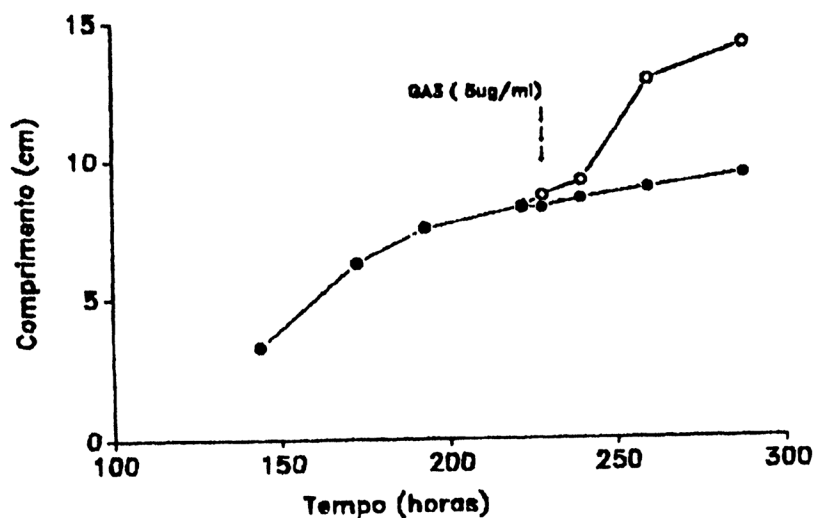


Figura 29- Efeito do ácido giberélico em plântulas de arroz tratadas com isoesteviol. As plântulas de arroz cultivadas em presença de uma solução de isoesteviol na concentração de 100 µg/ml (●—●). Após 225 horas receberam tratamento com uma solução de ácido giberélico na concentração de 5.0 µg (○—○).

Na figura-30 mostra um experimento onde a  $GA_3$ , na concentração de 5,0 µg/ml, também é capaz de acelerar a razão de crescimento de plântulas de arroz tratadas com solução dos produtos do metabolismo do isoesteviol na concentração de 100 µg/ml.

Conclui-se, portanto, que o produto do metabolismo do isoesteviol não inibe a ação hormonal do  $GA_3$ , mas sim a produção endógena de GAs pela planta. Portanto, trata-se de uma substância ou substâncias com potencial para atuarem como reguladores de crescimento de plantas. Entretanto, a caracterização dessas substâncias como reguladores de crescimento exige estudos mais detalhados e

aprofundados que escapam ao escopo deste trabalho. Estudos sobre a composição do extrato, faixa de concentração em que os mesmos provocam a inibição e principalmente se a inibição do crescimento de plantas ocorre sem que sejam afetadas adversamente outras funções (GRAEBE, 1987).

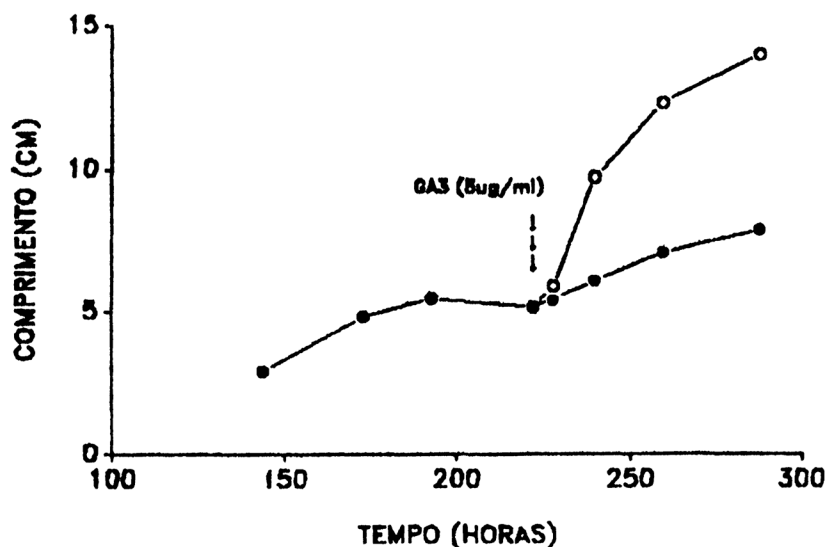


Figura 30- Efeito do ácido giberélico sobre plântulas de arroz tratadas com o produto do metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM. As plântulas de arroz foram cultivadas em presença de uma solução do produto do metabolismo do isoesteviol na concentração de 100 ug/ml (●—●). Após 225 horas as plântulas receberam tratamento com uma solução de 5,0 ug/ml (○—○).

### **3.7 - Determinação da faixa de concentrações de isoesteviol determinantes da inibição**

#### **3.7.1 - Cultivo do isolado UEM em meio sintético ICI**

Como foi constatado no ítem 3.5, o isoesteviol na concentração de 1 g/l (3.0 mMolar provoca inibição da produção de ácido giberélico no cultivo do isolado UEM realizado em meio BD. Com a finalidade de determinar-se a faixa de concentração na qual o isoesteviol provoca inibição da produção endógena de ácido giberélico pelo isolado UEM, o mesmo foi cultivado por um período de 48 horas em meio sintético ICI a 10% de Nitrogênio para desenvolvimento do micélio (GEISSMAN et al., 1966). Após este período, o micélio foi filtrado em condições ascéticas e ressuspenso em meio ICI isento de Nitrogênio contendo isoesteviol em diferentes concentrações (10, 20, 40, 200, 400 e 1000 mg/l). Após 7 dias, o cultivo foi interrompido e extraído de acordo com o descrito no ítem 2.2.3; e os extratos obtidos analisados através de cromatografia em camada delgada (TLC) e de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

### 3.7.2 - Análise em TLC dos extratos dos cultivos do isolado UEM em meio sintético ICI

Os dados referentes à cromatografia em camada delgada, como pode ser observado pelo Quadro VI, demonstram que nos cultivos do isolado UEM em meio sintético ICI, na ausência de isoesteviol (controle) e também em presença de isoesteviol em concentrações abaixo de 400 mg/l (1,2 mM), ocorreu a produção de ácido giberélico, uma vez que os extratos desses cultivos apresentaram mancha cromatográfica referentes ao ácido giberélico padrão ( $R_f = 0,58$ ). Além disso, as manchas emitiram fluorescência azulada quando examinadas sob luz ultravioleta (MACMILLAN & SUTER, 1963), o que caracteriza o ácido giberélico. Nos extratos dos cultivos com isoesteviol nas concentrações de 400 mg/l e 1000 mg/l (1,2 e 3,0 mMolar) não se observou a presença de manchas cromatográficas correspondentes ao ácido giberélico padrão. A mancha cromatográfica com  $R_f = 0,98$  corresponde ao isoesteviol e evidenciada em todos os extratos obtidos após 7 dias de cultivo do isolado UEM em meio sintético isento de Nitrogênio, parece indicar que o isoesteviol não teria sido totalmente metabolizado. Entretanto, o fato da mancha com  $R_f = 0,98$  também ter sido evidenciada no extrato do controle, o qual não apresenta isoesteviol, nos faz supor que esta seja correspondente a um intermediário da via de Biossíntese do ácido giberélico; o suspeito natural, devido a similaridade estrutural com o isoesteviol, seria o ácido caurenóico.

**Quadro-VI** - Cromatografia em camada delgada dos extratos na concentração de 1 mg/ml dos cultivos do ``isolado UEM`` em meio sintético ICI, na ausência de isoesteviol (controle) e na presença de isoesteviol nas seguintes concentrações: 0,03, 0,06, 0,12, 0,60, 1,2 e 3,0 nMolar. Também foram cromatografados o ácido giberélico padrão (1 mg/ml) e o isoesteviol padrão (1 mg/ml). Sistema: idêntico ao do Quadro-II.

Substância	Rf das manchas				
	I	II	III	IV	V
GA3 (1)		0.59			
GA3 (2)		0.58			
0.03m M	0.50	0.59	0.66	0.80	0.98
0.06m M	0.48	0.58	0.70	0.80	0.98
0.12m M	0.48	0.58	0.70	0.80	
0.60m M	0.48	0.57	0.68	0.80	
1.20m M	0.42	0.64	0.78	0.82	0.98
3.00m M	0.41	0.64	0.77	0.84	0.98
Isoesteviol					0.98
Controle	0.48	0.59	0.66	0.80	0.98

### 3.7.3 - Determinação do teor de GA<sub>3</sub> através de HPLC

Os extratos obtidos após 7 dias de cultivo em meio ICI sintético, tiveram a concentração de GA<sub>3</sub> determinada através da técnica de cromatografia líquida de alta performance. Como pode ser visto pela figura-13, em concentrações abaixo de 400 mg/l (1,2 mMolar) o isolado UEM produziu ácido giberélico; enquanto que nos extratos dos cultivos realizados em presença de isoesteviol nas concentrações de 400 mg/l (1,2 mMolar) e 1000 mg/l (3,0 mMolar), não foi determinada a presença de ácido giberélico. Observa-se pela figura-13, que nos controle e nos cultivos incubados em presença de isoesteviol nas concentrações de 10 e 20 mg/ml (0,03 e 0,06 mMolar) a quantidade de ácido giberélico produzida foi em torno de 100 mg/l; no cultivo realizado em presença de isoesteviol na concentração de 40 mg/ml (0,12 mMolar) foi detectado 85,4 mg/l, portanto, houve uma redução de 14% em relação ao controle. No cultivo realizado em presença de isoesteviol na concentração de 200 mg/l, a quantidade de ácido giberélico detectada foi de 75,3 mg/l, sendo que a redução na produção do ácido giberélico foi da ordem de 25%. Não foi detectado a presença de ácido giberélico nos extratos obtidos dos cultivos realizados em presença de isoesteviol nas concentrações de 400 mg/l e 1000 mg/l. Conclui-se, portanto, que o isoesteviol na faixa de 40 mg/l a 200 mg/l (0.12 a 0.60 mMolar) provoca inibição parcial da produção de ácido giberélico pelo isolado UEM e que nas



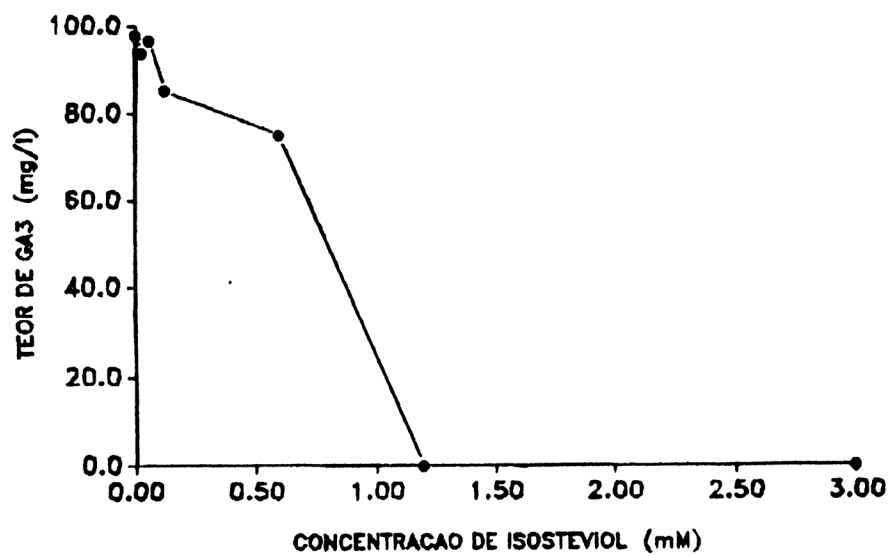


Figura 31- Efeito do isoesteviol na faixa de concentração de 0.03 - 3 mMolar sobre a produção de ácido giberélico pelo isolado UEM cultivado em meio sintético ICI. O teor de ácido giberélico em mg/l foi determinado através de cromatografia líquida de alta resolução. As condições de análise foram idênticas às apresentadas na figura-26.

concentrações de 400 mg/l e 1000 mg/l (1,2 e 3,0 mMolar) suprime totalmente a produção de ácido giberélico pelo isolado UEM. O fato de concentrações crescentes do isoesteviol no meio de cultura levarem a um aumento do grau de inibição, como pode ser visto pela figura 31, reforça a hipótese de que o isoesteviol compete com o seu análogo, o ácido caurenólico.

#### **3.7.4 - Determinação do ácido caurenólico**

A hipótese de que o isoesteviol poderia estar competindo com o ácido caurenólico, intermediário obrigatório na via de biossíntese do ácido giberélico, fez com que buscássemos quantificar o teor de ácido caurenólico nos cultivos realizados na ausência do isoesteviol (cultivo controle) e nos cultivos realizados em presença de isoesteviol utilizando a cromatografia líquida de alta resolução de acordo com o descrito no item 2.2.5. Os extratos do controle e do cultivo do isolado UEM em presença de isoesteviol na concentração de 1 g/l (3,0 mMolar) foram analisados (figuras 32, 33 e 34).

Observa-se pela figura 32, que o cromatograma do ácido caurenólico padrão na concentração de 1 mg/ml apresenta um pico com tempo de retenção igual a 50,50 minutos. No extrato do controle (figura 33) foi possível detectar a presença de um pico de retenção igual a 50,33 minutos; porém no extrato do cultivo realizado em presença de isoesteviol na

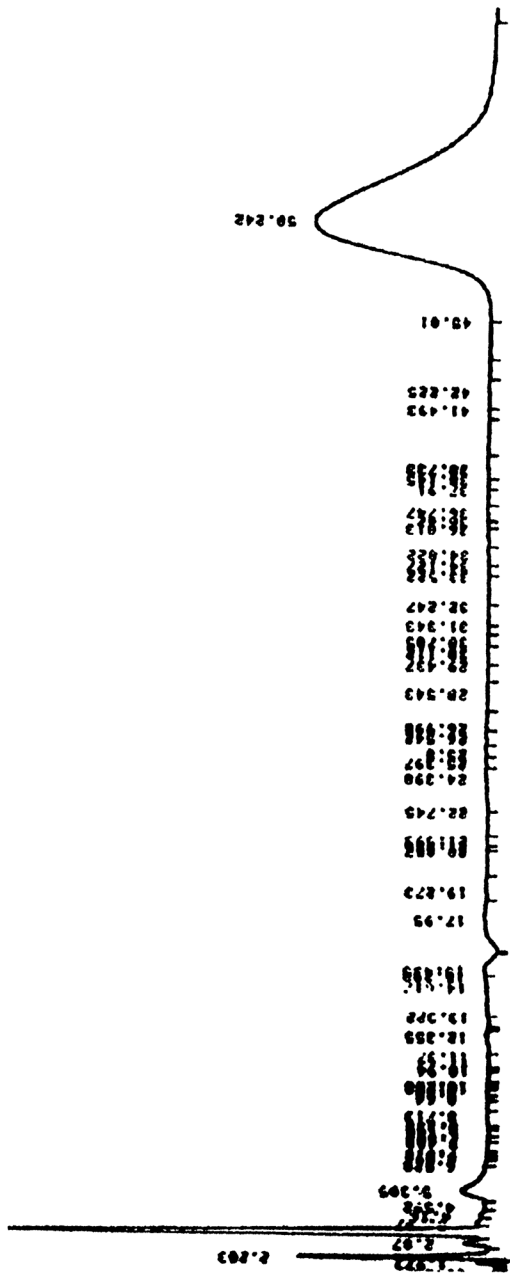


Figura 32 - Cromatograma em HPLC do ácido caurenóico padrão. O cromatograma foi feito com uma coluna Licrosorb RP-18 (10 um) de 25x0,4 cm como fase fixa e uma mistura de metanol:água na proporção de 80:20 como fase móvel, à temperatura de 29 ± 2°C, pressão de 200 atm e detector ao UV 210 nm. O ácido caurenóico estava na concentração de 0,5 mg/ml.

α  
6

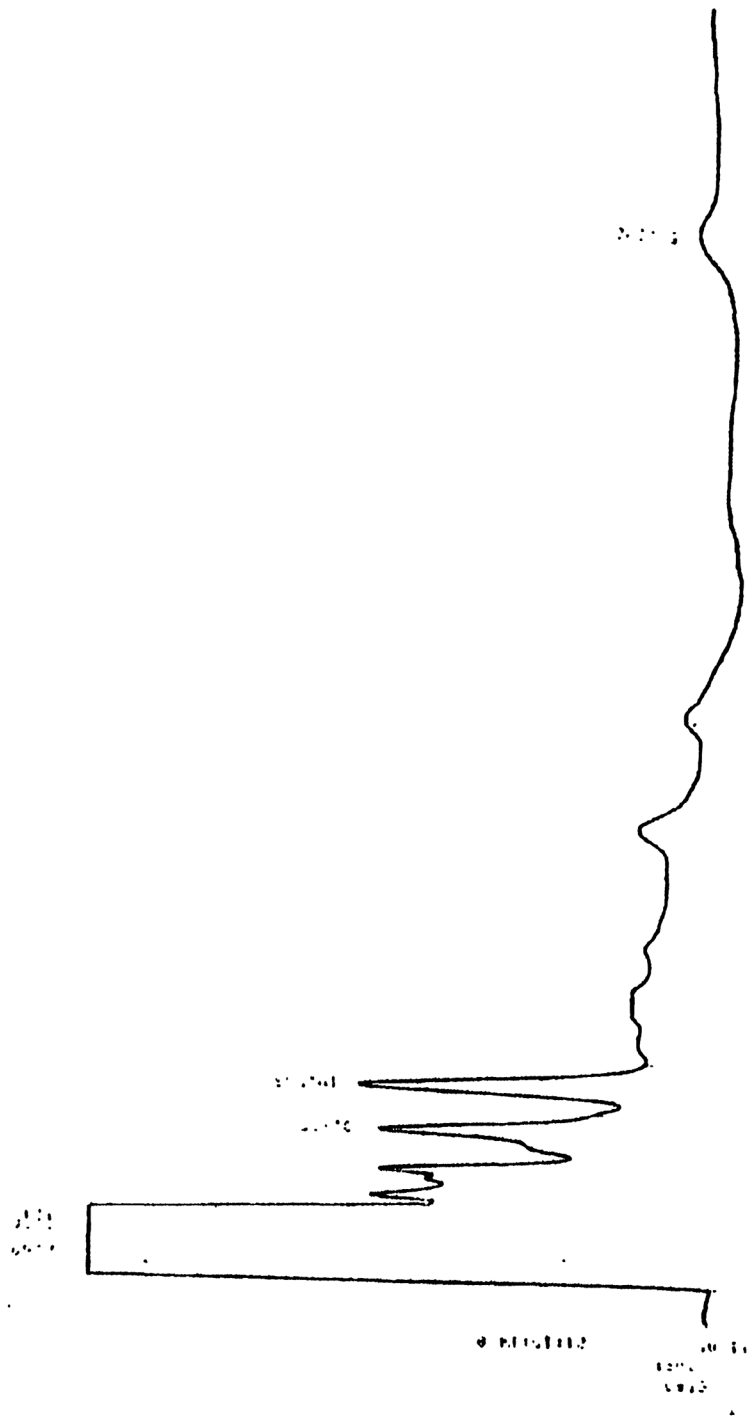


Figura 33 - Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do "isolado UEM" cultivado na ausência de isoesteviol (cultura controle) por um período de 7 dias. O cromatograma foi feito com uma coluna Licrosorb RP-18 (10  $\mu$ m) de 25x0,4 cm como fase fixa e uma mistura de metanol:água na proporção de 80:20 como fase móvel, à temperatura de 29  $\pm$  2 $^{\circ}$ C, pressão de 200 atm e detector ao UV 210 nm. A solução aquosa do extrato estava na concentração de 5 mg/ml.

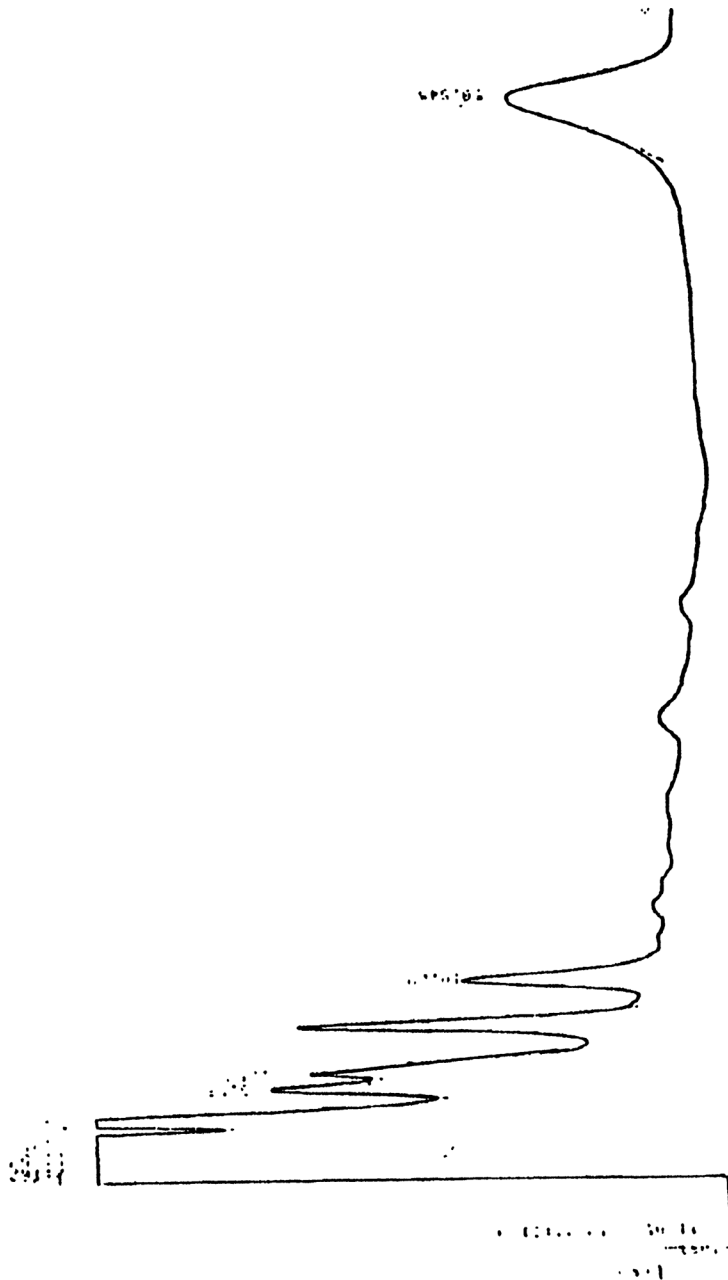


Figura 34 - Cromatograma em HPLC do extrato da cultura do "isolado UEM" cultivado na presença de isoesteviol na concentração de 3 mMolar por um período de 7 dias. O cromatograma foi feito com uma coluna Licrosorb RP-18 (10  $\mu$ m) de 25x0,4 cm como fase fixa e uma mistura de metanol:água na proporção de 80:20 como fase móvel, à temperatura de 29  $\pm$  2 $^{\circ}$ C, pressão de 200 atm e detector ao UV 210 nm.

concentração de 1 mg/ml, figura 34, observou-se um pico com tempo de retenção igual a 50,50 minutos, com área bastante superior à área com mesmo tempo de retenção detectada no extrato do controle. Considerando-se que a substância com tempo de retenção equivalente ao ácido caurenóico padrão detectada tanto no extrato do controle como no extrato do cultivo realizado em presença de isoesteviol seja de fato o ácido caurenóico, a hipótese de que a produção endógena de ácido giberélico no cultivo do isolado UEM, em presença de isoesteviol, na concentração de 1 g/l, seria causada em parte pela competição que se estabelece entre o isoesteviol e ácido caurenóico estaria reforçada; uma vez que a concentração de ácido caurenóico presente no extrato do cultivo realizado em presença de isoesteviol, figura 34, é muito superior que a concentração de ácido caurenóico no extrato controle (figura 33).

#### **3.7.5 - Bioteste do hipocótilo do alface**

Os extratos do controle e dos cultivos realizados em concentrações abaixo de 1,2 mMolar foram hábeis em estimular o crescimento do hipocótilo de plântulas do alface, enquanto que extratos dos cultivos realizados em presença de isoesteviol 1,2 e 3,0 mMolar não demonstraram atividade giberélica. Todos os extratos foram testados na concentração 10 ug/ml como pode ser observado pelo Quadro-VII. O comprimento do hipocótilo das plântulas de alface, tratadas

**Quadro-VII** - Efeito dos cultivos do isolado UEM, cultivados em meio sintético ICI na presença de isoesteviol na faixa de 0.03 mMolar a 3,0 mMolar, sobre o comprimento do hipocótilo de plântulas de alface da variedade Grand rapts germinadas no escuro.

Tratamento (10 ug/ml)	comprimento do hipocótilo do alface (mm)
GA <sub>3</sub> padrão	11.3 b*
Isoesteviol padrão	5.0 c
Extrato de cultura 0.03 mM	14.7 a
Extrato de cultura 0.06 mM	14.3 a
Extrato de cultura 0.12 mM	13.7 a
Extrato de cultura 0.60 mM	15.1 a
Extrato de cultura 1.20 mM	4.1 d
Extrato de cultura 3.00 mM	3.9 d
Extrato da cultura controle	14.4 a
Controle (água destilada)	5.2 c

\* Os números seguidos da mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5%.

com extrato do cultivo realizado na ausência de isoesteviol e com os extratos dos cultivos realizados em presença de isoesteviol em concentrações abaixo de 1,2 mMolar, foi significativamente maior ao nível de 5% em relação ao comprimento das plântulas do controle e das plântulas tratadas com isoesteviol na concentração de 10 ug/ml. Enquanto que o comprimento do hipocótilo das plântulas de alface tratadas com extratos dos cultivos realizados em presença de isoesteviol 1,2 mMolar e 3,0 mMolar foi significativamente menor em relação ao controle, pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Estes dados confirmam os resultados das análises cromatográficas apresentadas nos itens 3.7.1 e 3.7.2, ou seja, o ácido giberélico foi produzido no cultivo controle (ausência de isoesteviol) e nos cultivos realizados em presença de isoesteviol na faixa de 10 a 200 mg/l (0.03 mMolar a 0.60 mMolar), uma vez que os extratos desses cultivos foram hábeis em estimular o crescimento do hipocótilo de plântulas de alface; e não foi produzido nos cultivos do isolado UEM em presença de isoesteviol nas concentrações de 400 mg/l e 1000 mg/l (1,2 mMolar e 3,0 mMolar).

O fato dos extratos obtidos a partir de cultivos realizados em presença de isoesteviol nas concentrações de 400 mg/l e 1000 mg/l, inibirem o crescimento do hipocótilo das plântulas de alface na concentração de 10 ug/ml demonstra



que o produto do metabolismo do isoesteviol exerce forte controle sobre a via de biossíntese de giberelinas em plantas e em fungos. Este controle, como já foi discutido no item 3.5.4, seria devido à formação de substâncias análogas às GAS, as quais não exerceriam efeito promotor do crescimento de plântulas devido ao rearranjo dos anéis C/D (BRIAN et al., 1967; RUDDAT et al., 1963), mas controlariam a produção de giberelinas naturais da mesma forma que o ácido giberélico controla a sua própria biossíntese (DOCKERILL & HANSON, 1981).

#### 4 - Conclusões

1. O isolado UEM, obtido a partir de plantas de trigo infectadas da região de Maringá produz ácido giberélico quando cultivado em meio BD e em meio sintético ICI.
2. Os extratos das culturas do isolado UEM, tanto em meio BD como em meio sintético, apresentam atividade giberélica nos bioensaios do arroz e do hipocótilo do alface.
3. O isolado UEM metaboliza completamente 1 g/l de isoesteviol em meio BD num período de 150 horas.
4. O produto do metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM, não apresenta atividade giberelínica, ou seja, não estimula o crescimento de plântulas de arroz e nem o crescimento do hipocótilo do alface.
5. O produto do metabolismo do isoesteviol pelo isolado UEM exerce efeito de inibição do crescimento sobre plântulas de arroz e sobre o crescimento do hipocótilo do alface.
6. Não ocorre interação entre o ácido giberélico e o isoesteviol ou entre o ácido giberélico e o produto do metabolismo do isoesteviol, tendo como resultado a perda da atividade giberélica.
7. O isolado UEM produz ácido giberélico quando cultivado em meio sintético ICI na presença de isoesteviol na faixa de 0.03 mMolar a 0.60 mMolar e não o produz quando cultivado em presença de isoesteviol nas concentrações de 1,2 e 3,0 mMolar.

8. O ácido caurenóico, intermediário obrigatória na via de biossíntese do ácido giberélico, se acumula nas culturas em presença de isoesteviol na concentração de 3.0 mMolar.

## 5- BIBLIOGRAFIA

01. ALVAREZ, M. & KUSOMOTO, I. T. Análise quantitativa dos glicosídeos edulcorantes da *Stevia rebaudiana* e dos seus produtos de hidrólise através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC). **Arq. Biol. Tecnol.**, **30** (2): 337-348, 1987.
02. AYTOUN, R. S. C.; DUNN, A. T. & SEILER, D. A. L. A biological assay for gibberellic acid with rice seedlings. **Analyst**, **84**: 216-221, 1959.
03. BAILISS, K. W. & HILL, T. A. Biological assays for gibberellins. **Botan Rev.**, **37**: 437-475, 1971.
04. BAKKER, H. J.; COOK, I. F.; JEFFERIES, P. R. & KNOX, J. R. Gibberelin metabolites from ent-kaurea-2,16-dien-19-ol and its succinate in *Gibberella fujikuroi*. **Tetrahedron**, **30**: 3631-3640, 1974.
05. BEARDER, J. R.; MACMILLAN, J. & WELS, C. M. The metabolism of steviol to 13-hidroxyated ent-Gibberellanes and ent- Kaurenes. **Phytochemistry**, **14**: 1741-1748, 1975.
06. BEARDER, J. R. in vivo diterpenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: the pathway after ent-kaurene. In: **The Biochemistry and Physiology of Gibberellins**. Vol. 1, (A. CROZIER, ed), Praeger, USA, p. 251-387, 1983.

07. BEARDER, J. R.; FRYFMAN, V. M.; GASKIN, P.; MACMILLAN, J.; WELLS, C. M. & PHINNEY, B. O. Fungal products. Part XVI. Conversion of isoesteviol and steviol acetate into gibberellin analogues by mutant B<sub>1</sub>-41a of *Gibberella fujikuroi* and the preparation of H gibberellin A20. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2: 173-178, 1976.
08. BEARDER, J. R.; MACMILLAN, J.; WELLS, C. M.; CHAFFEY, M. B. & PHINNEY, B. O. Position of the metabolic block for Gibberellin biosynthesis in mutant B<sub>1</sub>-41a of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 13: 911-917, 1974.
09. BEARDER, J. R.; MACMILLAN, J. & PHINNEY, B. O. Conversion of gibberellin A<sub>1</sub> into gibberellin A<sub>3</sub> by mutant R-9 of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 12: 2655-2659, 1973.
10. BEARDER, J. R.; MACMILLAN, J. & PHINNEY, B. O. Fungal products. Part XIV. Metabolic pathways from ent-Kaurenoic acid to the fungal gibberellins in mutant B<sub>1</sub>-41a of *Gibberella fujikuroi*. *J. C. S. Perkin Trans.*, 1: 721-726, 1975.
11. BORROW, A.; JEFFERYS, E. G.; KESSEL, R. H. J.; LLOYD, E. C.; LLOYD, P.B. & NIXON, I. S. The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 7: 227-277, 1961.
12. BRIAN, P. W.; HEMMING, H. G.; LOWE, D. Comparative potency of nine gibberellins. *Ann. Botany*, 28: 369-

389, 1964.

13. BRIAN, P. W.; GROVE, J. F. & MULHOLLAND, T. P. C. Relationships between structure and growth promoting activity of the gibberellins and allied compounds, in for test systems. **Phytochemistry**, 6: 1475-1499, 1967.
14. BU'LOCK, J. D. Mycotoxins as secondary metabolites. In **The biosynthesis of mycotoxins, a study in secondary metabolism**, ed. P.S. Steyn, p. 1-16, 1980. New York, London: Academic Press.
15. BU'LOCK, J. D. Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **Transactions of the British Mycological Society**, 62: 377-389, 1974.
16. CAVELL, B. D.; MacMILLAN, J.; PRYCE, R. J. & SHEPARD, A. C. Thin-layer and gas-liquid chromatography of the gibberellins; direct identification of the gibberellins in a crude plant extract by gas-liquid chromatography. **Phytochemistry**, 6: 867-874, 1967.
17. COOLBAUGH, R. C. Early stages of gibberellin biosynthesis. In: **The Biochemistry and Physiology of Gibberellins**. Vol. 1 (A. CROZIER, ed.), Praeger, USA, p. 53-58, 1983.
18. CURTIS, P. J. & CROSS, P. E. Gibberellic acid a new metabolite from the filtrates of *Gibberella fujikuroi*. **Chem. Ind.**, p. 1066-1068, 1954.
19. DIAZ, C. E.; FRAGA, B. M.; GONZALEZ, A. G.; GONZALEZ, P.; HANSON, J. R. & HERNANDEZ, M. G. The

- microbiological transformation of some trachylobane diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* **23**: 2813-2816, 1984.
20. DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMINTON, S. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colourimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. chem.*, **28**: (6): 250-256, 1956.
  21. DOCKERILL, B. & HANSON, J. R. The effect of exogenous gibberelic acid on gibberellin biosynthesis by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **20** (12): 2679-2681, 1981.
  22. DUBOUVSKI, K. M. An o-touluidine method for body fluid glucose determination. *Clin. Chem.*, **8** (3): 215-235, 1962.
  23. EVANS, R. & HANSON, J. R. Studies in terpenoid biosynthesis. Part XIII The biosynthetic relationship of the gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *J. C. C. Perkin Trans*, **1**: 663-666, 1975.
  24. EVANS, R. & HANSON, J. R. The formation of (-) Kaurene in a cell-free system from *Gibberella fujikuroi*. *J. C. S. Perkin Trans.*, **1**: 2382-2385, 1972.
  25. FRAGA, B. M.; HERNANDEZ, M. G.; RODRIGUEZ, M. D.; DIAZ, C. E.; GONZALEZ, P. & HANSON, J. R. Transformation of ent-Kaur-15-enes by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, **26**: 1931-1934, 1987.
  26. FRANKLAND, B. & WAREING, P. F. Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth of lettuce seedlings.

- Nature**, 185: 255-256, 1960.
27. GEISSMAN, T. A.; VERBISCAR, A. J.; PHINNEY, B. O. & GRAGG, G. Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-Kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, 5: 933-947, 1966.
  28. GIANFAGNA, T. ZEEVAART, J. A. D. & LUSK, W. J. Synthesis of [<sup>2</sup>H] gibberellins from steviol using the fungus *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, 22: 427-430, 1983.
  29. GORNAL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, 17: 751-766, 1949.
  30. GRAEBE, J. E. Gibberelin biosynthesis and control. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, 38: 419-465, 1987.
  31. HANSON, J. R. & WHITE, A. F. The biosynthesis of steviol. **Phytochemistry**, 7: 595-597, 1968.
  32. HANSON, J. R. Aspects of diterpenoid and Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **Biochem. Soc. Trans.**, 11: 522-528, 1983.
  33. HANSON, J. R. & WHITE, A. F. The oxidative modification of the Kaurenoid ring B during Gibberellin biosynthesis. **Chem Comm.**, 410-411, 1969.
  34. HANSON, J. R.; WHITE, A. F. Studies in terpenoid biosynthesis. Part IV. Biosynthesis of the kaurenolides and gibberellic acid. **J. Chem. Soc.**, p. 981-987, 1969.



35. HEDDEN, P. ``In vivo`` metabolism of gibberellins. In:  
**The Biochemistry and Physiology of Gibberellins.**  
Vol. 1, (A, CROZIER, ed), Praeger, USA, p. 99-149,  
1983.
36. KUROSAWA, E. Experimental studies on the nature of the  
substance excreted by the ``Bakanae`` fungus.  
**Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa, 16:** 213-227, 1926.
37. LANG, A. Gibberellins: structure and metabolism. **Ann.**  
**Rev. Plant Physiol., 21:** 537-571, 1970.
38. LIN, J. -T & HEFTEMANN, E. Adsorption and reserved-  
phase partition high-performance liquid  
chromatography of Gibberellins. **Journal of**  
**Chromatography, 213 (03):** 507-510, 1981.
39. MADDOX, I. S. & RICHERT, S. H. Production of gibberelic  
acid using a dairy waste as the basal medium. **Applied**  
**and Environ. Microbiol., 33:** 201-202, 1977.
40. MacMILLAN, J. & SUTER, P. S. Thin layer chromatography  
of the gibberellins. **Nature, 197:** 790, 1963.
41. McCRINDLE, R. & OVERTON, K. H. The diterpenoids,  
sesterpenoids and triterpenoids. In **Rood's chemistry**  
**of compounds, vol. 2, (S. COFFEY, ed.),** Elsevier,  
Amsterdam, p. 369-482, 1969.
42. MOORE, T. C. Biochemistry and physiology of plant  
hormones Springer-verlag, New York, p. 90-142, 1979.
43. MOSETTIG, E. & NES, W. R. Stevioside II. The structure  
of the aglucon. **J. Org. Chem., 20:** 884-899, 1955.
44. MUROFUSHI, N.; SHIGEMATSU, Y.; NAGURA, S. & TAKAHASHI,

- N. Metabolism of steviol and its derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Agric. Biol. Chem.**, **46** (09): 2305-2311, 1982.
45. PALEG, L. Physiological effects of Gibberellins. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, **16**: 291-322, 1965.
46. PHINNEY, B. O. Gibberellin A1, dwarfism and the control of shoot elongation in higher. In: **The Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones**. (A. CROZIER & J. R. HILLMAN, eds), Society for Experimental Biology Seminar Series, vol. 23, Cambridge University Press, p. 17-41, 1984.
47. PHINNEY, B. O.; WEST, C. A.; RITZEL, M. & NEELY, P. M. Evidence for "Gibberellin-like" substances from flowering plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **43**: 398-404, 1957.
48. PITEL, D. W.; VINING, L. C. & ARSENAULT, G. P. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. The sequence after gibberellin A4. **Can. J. Biochem.**, **49**: 194-200, 1971.
49. RADLEY, M. Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. **Nature**, **178**: 1070-1071, 1956.
50. REEVE, D. R. & CROZIER, A. An assesement of Gibberellin struture-activity relationships. **J. Exp. Bot.**, **25**: 431-445, 1974.
51. ROWE, J. W. The commum and systematic nomenclature of cyclic diterpenes, 3<sup>rd</sup> revision, Forest Products

- Laboratory, U. S. Department of Agriculture,  
Madison, Wisconsin, 1968.
52. RUDDAT, M.; LANG, A. & MOSETTIG, E. Gibberellin activity of steviol, a plant terpenoid. **Naturwissens Chaften, 50**: 23, 1963.
  53. RUDDAT, M.; HEFTMANN, E. & LANG, A. Conversion of steviol to a gibberellin-like compound by *Fusarium moniliforme*. **Archives of Biochemistry and Biophysics 11**: 187-190, 1965.
  54. RUZICKA, L. The isoprene rule and biogenesis of terpenic compounds. **Experientia, 9**: 357-396, 1953.
  55. STODOLA, F. H.; RAPER, K. B.; FENNEL, D. I.; CONWAY, H. F.; SOHNS, U. E.; LANG FORD, C. T. & JACKSON, R. W. The microbiological production of gibberellin A and X. **Arh. Biochem. Biophys., 54**: 240-245, 1955.
  56. STUART, N. W. & CATHEY, H. M. Applied aspects of the Gibberellins. **Ann. Rev. Plant. Physiol., 12**: 369-394, 1961.
  57. TAKAHASHI, N. Chemistry of plant hormones. CRC Press, Boca Raton, p. 57-151, 1986.
  58. TAKAHASHI, N. & MACMILLAN, J. Proposed procedure for the allocation of trivial names to the Gibberellins. **Nature, 217**: 170-171, 1968.
  59. TAKAHASHI, N.; KITAMURA, H.; KAWARADA, A. SETA, Y.; TAKAI, M.; TAMURA, S. & SUMIK, Y. Biochemical studies on ``Bakanae`` fungus. XXXIV. Isolation of gibberellins and their properties. **Bull. Agric.**

**Chem. Soc. Jpn., 19: 267-277, 1955.**

60. WADA, K.; IMAI, T. & SHIBATA, K. Microbial productions of unnatural gibberellins from (-)-Kaurene derivatives in *Gibberella fujikuroi*. **Agric. Biol. Chem., 43 (5): 1157-1158, 1979.**
61. WEST, C.R. & PHINNEY, B. O. Properties of gibberellin-like factors from extracts of higher plants. **Plan. Physiol., 31(Suppl.), 20, 1956.**
62. WOOD Jr., H. B.; ALLERTON, R.; DIEHL, H. W. & FLETCHER, H. C. Stevioside. I. The structure of the glucose of the moieties. **J. Org. Chem., 20: 873-875, 1955.**