

Julio César Stiirmer

**OBTENÇÃO DE DITERPENÓIDES TETRACÍCLICOS COM
POTENCIAL AÇÃO REGULADORA DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor. Programa de
Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA
2006

Dedicatória

DEUS

Te agradeço pela inteligência, por mostrar o caminho da sabedoria, que com humildade procurei entender um pouco que fizeste neste mundo.

Te agradeço pela companhia nas viagens, nos lugares e nas pessoas que conheci durante a realização deste trabalho.

Júlio César Stiirmer

Aos meus filhos,
Guilherme e Camila,
os quais serviram de motivação
para a realização deste trabalho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Leonilda, minha esposa,
companheira dedicada, a qual devo muito e,
com certeza, me ajudou a chegar até aqui.

Agradecimentos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. BRÁS HELENO DE OLIVEIRA, pela orientação segura, no qual encontrei uma pessoa extremamente justa e criteriosa nas suas decisões, profissional competente, deixando aqui, o meu reconhecimento pela sua pessoa.

Aos colegas de laboratório ALEXANDRE AUGUSTO DE OLIVEIRA, CESAR ARTUR MARTINS CHORNOBAL, ELISA PERES, CLAUDENIZE PONTES DA SILVA LEAL, DENISE ZELAK BASTOS, JANAINA PACKER, MAURICIO LACERDA BELEM, PATRICIA ZANCANELLA, os quais eu quero deixar aqui, os meus agradecimentos e destacar a importância deles na realização deste trabalho. Quero deixar aqui, o meu muito obrigado MESMO!

A Prof. Dr. JAÍSA FERNANDES SOARES, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Química da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

Ao Sr. MARCELINO CÂMARA, secretário da Pós-Graduação pela atenção e gentileza com que me atendeu em todos os meus pedidos.

AGRADEÇO . . .

A meus pais, DARCI e GEMA, pelas horas de amor e dedicação durante toda minha vida, por me proporcionarem educação, muitas vezes com sacrifício e que tornaram possível a realização de muitos dos meus sonhos, todo o meu carinho.

Aos meus AVÓS, já falecidos, minhas saudades, sou grato pelas orações, palavras sábias dentro da humildade de suas pessoas ...conselhos e carinho com que me acolhiam em suas casas, meu carinho eterno.

A toda a minha família, irmãos, cunhados, sobrinhos e sobrinhas, por terem sido partes fundamentais para minha caminhada até aqui.

Ao Prof. Dr. CARLOS CESAR STADLER pelo incentivo.

A UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.

A UTFPr – UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ.

CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

A todos que de uma forma ou outra colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

Lista de Abreviaturas e Siglas

δ : deslocamento químico

$\lambda_{\text{máx}}$: comprimento de onda (nm) de absorção máxima

AMPB: ácido metacloroperbenzóico

CCD: cromatografia em camada delgada

CCDC: cromatografia em camada delgada centrífuga

CDCl_3 : clorofórmio deuterado

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência com espectrômetro de massa.

CLV: cromatografia líquida à vácuo.

d: duplete

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

D:gal: D-galactose

D-glc: D-glucose

CLAE-FR: cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

GA_s : giberelinas

GA_3 : ácido giberélico

Hz: hertz

IV: infra vermelho

ICI: Imperial Chemistry Industry

m: multiplete

MeOD: metanol deuterado

MHz: megahertz

ppm : parte por milhão

q : quarteto

R_f : razão de frente

RMN ^{13}C : ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s: simpleto

t: tripleto

Sumário

<u>DEDICATÓRIA</u>	<u>I</u>
<u>AGRADECIMENTOS</u>	<u>IV</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</u>	<u>VI</u>
<u>SUMÁRIO</u>	<u>VII</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>IX</u>
<u>LISTA DE ESQUEMAS</u>	<u>XI</u>
<u>LISTA DE GRÁFICOS</u>	<u>XII</u>
<u>1 RESUMO</u>	<u>XIII</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>XIV</u>
<u>2 INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
2.1 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	1
2.2 GIBERELINAS	2
2.3 ESTEVIOL E SEU DERIVADOS	5
2.4 CONVERSÃO DO ESTEVIOL EM GIBERELINAS	7
2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS	9
2.6 LIPOSSOMAS	10
2.7 BIOENSAIOS PARA REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	12
2.7.1 TESTE DE HIPOCÓTILO DA ALFACE	13
2.7.2 TESTE DA ALEURONA DA CEVADA	14
2.8 OBJETIVOS	17
<u>3 MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>19</u>
3.1 PREPARAÇÃO DO ESTEVIOL (2)	19
3.2 PREPARAÇÃO DO ISOESTEVIOL (8)	20
3.3 PREPARAÇÃO DA OXIMA DO ISOESTEVIOL (9)	20
3.4 PREPARAÇÃO DO 16,17 A-EPOXIESTEVIOL (4)	21

3.5	PREPARAÇÃO DO 17-HIDROXIISOESTEVIOL (5)	21
3.6	PREPARAÇÃO DA OXIMA DO 17-HIDROXIISOESTEVIOL (6)	22
3.7	PREPARAÇÃO DO ÁCIDO ENT-16,17-DIHDROXIBAIERAN-19-ÓICO (7)	22
3.8	BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEVIOL	23
3.9	TESTE DO HIPOCÓTILO (VILLALOBOS <i>ET AL</i>, 1994)	25
3.10	TESTE DA ALEURONA	25

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **27**

4.1	OBTENÇÃO DO ESTEVIOL (2)	27
4.2	OBTENÇÃO DO ISOESTEVIOL (8)	29
4.3	OBTENÇÃO DA OXIMA DO ISOESTEVIOL (9)	31
4.4	OBTENÇÃO DO 16,17 A-EPÓXIDO DO ESTEVIOL (4)	33
4.5	OBTENÇÃO DO 17-HIDROXIISOESTEVIOL (5)	35
4.6	OBTENÇÃO DA OXIMA DO 17-HIDROXIISOESTEVIOL (6)	37
4.7	OBTENÇÃO DO ÁCIDO ENT-16,17-DIHDROXIBAIERAN-19-ÓICO (7)	40
4.8	BIOTRANSFORMAÇÕES	43
4.8.1	OBTENÇÃO DO 7-HIDROXIESTEVIOL (3)	43
4.8.2	ANÁLISE QUANTITATIVA DO 7-HIDROXIESTEVIOL	47
4.8.3	CALIBRAÇÃO EXTERNA DO 7-HIDROXIESTEVIOL	47
4.8.4	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DO 7-HIDROXIESTEVIOL	48
4.8.5	INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS NA PRODUÇÃO DE 7-HIDROXIESTEVIOL	49
4.8.6	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DO 7-HIDROXIESTEVIOL	50
4.9	TESTE DO HIPOCÓTILO	51
4.10	TESTE DA ALEURONA	54
4.11	CONCLUSÕES	57

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **59**

5 ANEXOS **69**

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas de representantes das cinco principais classes de hormônios vegetais.....	1
Figura 2: Biossíntese de giberelinas em <i>Gibberella fujikuroi</i>	3
Figura 3: Estrutura do esteviol e seus glicosídeos	6
Figura 4: Obtenção de giberelinas a partir do <i>ent</i> -caureno	8
Figura 5: Características estruturais dos lipossomas.....	11
Figura 6: Método de preparação de lipossomas do tipo MLV	12
Figura 7: Etapas de germinação e formação do hipocótilo	14
Figura 8: Estruturas da amilose e amilopectina	15
Figura 9: Semente cevada	16
Figura 10: Produto de oxidação do esteviosídeo com periodato de sódio	27
Figura 11: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster do esteviol (2).....	28
Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do esteviol (2)	29
Figura 13: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do isoesteviol (8).....	30
Figura 14: Espectro no IV ácido da oxima do isoesteviol (9).....	32
Figura 15: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do	34
Figura 16: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do	36
Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 17-hidroxi-isoesteviol (5).....	36
Figura 18: Espectro no IV ácido da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6).....	38
Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6).....	39
Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT-135 (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)	39
Figura 21: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido <i>ent</i> -16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7).....	41
Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido <i>ent</i> -16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7).....	42
Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT-135 (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido <i>ent</i> -16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7).....	42
Figura 24: Espectro no IV do ácido 7-hidroxiesteviol (3)	44
Figura 25: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do	45
Figura 26: Espectro RMN ^{13}C (100MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do	46
Figura 27: Espectro RMN ^{13}C -DEPT-135 (100MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3).....	46
Figura 28: Curva de calibração para o 7-hidroxiesteviol	48
Figura 29: Curva padrão D-glicose ($R^2 = 0,99896$)	55
Figura 30: Espectro no IV do esteviol (2).....	69
Figura 31: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do esteviol (2)	70

Figura 32: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do esteviol (2)	71
Figura 33: Espectro no IV do 7-hidroxiesteviol (3)	72
Figura 34: Espectro de RMN ^1H (200MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)	73
Figura 35: Espectro RMN ^{13}C (100MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)	74
Figura 36: Espectro RMN ^{13}C -DEPT -135 (100MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)	75
Figura 37: Espectro no IV do 16,17 α -epoxiesteviol (4)	76
Figura 38: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 16,17 α -epoxiesteviol (4)	77
Figura 39: Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 16,17 α -epoxiesteviol (4)	78
Figura 40: Espectro no IV ácido 17-hidroxi-isoesteviol (5)	79
Figura 41: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 17-hidroxi-isoesteviol (5)	80
Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 17-hidroxi-isoesteviol (5)	81
Figura 43: Espectro no IV ácido da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)	82
Figura 44: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)	83
Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)	84
Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)	85
Figura 47: Espectro no IV do ácido ent-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7)	86
Figura 48: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido ent-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7)	87
Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido ent-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7)	88
Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido ent-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7)	89
Figura 51: Espectro no IV do isoesteviol (8)	90
Figura 52: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do isoesteviol (8)	91
Figura 53: Espectro de RMN ^{13}C (200MHz e 50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do isoesteviol (8)	92
Figura 54: Espectro no IV ácido da oxima do isoesteviol(9)	93
Figura 55: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do isoesteviol (9)	94
Figura 56: Espectro RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do isoesteviol (9)	95

Lista de Esquemas

Esquema 1: Compostos a serem preparados.....	18
Esquema 2: Preparação do esteviol.....	27
Esquema 3: Preparação do isoesteviol.....	29
Esquema 4: Preparação da oxima do isoesteviol.....	31
Esquema 5: Preparação do 16,17 α -epoxi-esteviol.....	33
Esquema 6 : Preparação do 17-hidroxiisoesteviol.....	35
Esquema 7: Preparação da oxima do 17-hidroxiisoesteviol.....	38
Esquema 8: Preparação do ácido <i>ent</i> -16,17-diidroxibaierano-19-óico.....	40
Esquema 9: Preparação do 7-hidroxiesteviol.....	44

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Influência da temperatura na produção do 7-hidroxi-esteviol	49
Gráfico 2: Influência da utilização de lipossomas na produção do 7-hidroxiesteviol. ..	50
Gráfico 3: Cinética de produção 7-hidroxiesteviol	51
Gráfico 4: Teste aleurona dos compostos obtidos.....	55

Resumo

O trabalho descreve a preparação e avaliação de potenciais reguladores de crescimento vegetal. O esteviosídeo, um glicosídeo do esteviol extraído da *Stevia rebaudiana*, foi utilizado como material de partida. A partir desta substância foram obtidos o ácido 13-hidroxi-*ent*-cauer-16-en-19-óico (esteviol), ácido 13-hidroxi-*ent*-caur-16,17-epoxi-19-óico (esteviol epóxido), ácido 17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico, ácido 16-cetobaieran-19-óico (isoesteviol), ácido 16-hidroxiiminobaieran-19-óico (isoesteviol oxima), ácido 17-hidroxi-16-hidroxiiminobaieran-19-óico e ácido 16,17-diidroxiobaieran-19-óico foram obtidos através de transformações químicas. Estes dois últimos são inéditos. Outro derivado, o ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicauer-15-en-19-óico, foi obtido pela biotransformação do esteviol pelo fungo *Gibberella fujikuroi*. A cinética da biotransformação foi determinada e tentativas foram feitas para aumento do rendimento através de encapsulamento prévio do esteviol em lipossomas. Para determinar a atividade reguladora de crescimento vegetal, os compostos foram submetidos aos bioensaios do hipocótilo de alface e teste da aleurona. Os melhores resultados no teste do hipocótilo foram obtidos com o ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicauer-15-en-19-óico enquanto que no bioensaio da aleurona o ácido 16-hidroxiiminobaieran-19-óico foi a substância mais potente. Os resultados mostraram, portanto, que a modificação estrutural do esteviol produziu derivados com propriedades reguladoras de crescimento vegetal superiores às da substância de partida, esteviol.

Palavra-chave: steviol, *stevia rebaudiana*, *Gibberella fujikuroi*, biotransformation

Abstract

This work describes the preparation of tetracyclic diterpenoids and determination of their plant growth regulator properties. Stevioside, a glycoside of steviol, was used as starting material and the derivatives 13-hydroxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid (steviol), 13-hydroxy, *ent*-kaur-16,17-epoxi-19-oic acid (steviol epoxide), 17-hydroxy-16-ketobayeran-19-oic acid, 16-ketobayeran-19-oic acid (isosteviol), 16-hydroxyiminobayeran-19-oic acid (isosteviol oxime), 16,17-dihydroxybayeran-19-oic acid and 17-hydroxy-16-hydroxyiminobayeran-19-oic acid were obtained by simple chemical procedures. The last two have not been found in the literature. Another derivative, *ent*-7 α ,13-dihydroxycaur-15-en-19-oic acid, was obtained by biotransformation of steviol by *Gibberella fujikuroi*. The kinetics of the biotransformation was determined and attempts were made in order to increase yields by encapsulation of steviol in liposomes. In order to determine the plant growth regulator activity the compounds were submitted to the lettuce hypocotyl and barley aleurone bioassays. The best results in the hypocotyle assay was obtained with *ent*-7 α ,13-dihydroxycaur-15-en-19-oic acid whilst in the aleurone bioassay the 16-hydroxyiminobayeran-19-oic acid was the most potent compound. The results showed, therefore, that the structural modification of steviol produced derivatives with improved plant growth regulator properties relative to the parent compound, steviol.

Key Words: steviol, *Stevia rebaudiana*, *Gibberella Fujikuroi*, biotransformation

2 Introdução

A atividade agrícola, para manter seus altos níveis de produtividade, utiliza várias técnicas relacionadas aos cultivos e ao manejo de pragas. Um aspecto importante em várias culturas é o do controle do crescimento vegetal. Para isto são utilizadas substâncias naturais ou sintéticas chamadas de reguladores de crescimento vegetal.

2.1 Reguladores de crescimento vegetal

Reguladores de crescimento vegetal são compostos endógenos ou exógenos que alteram a taxa de crescimento vegetativo de plantas. Estes compostos atuam em vários mecanismos fisiológicos e, por isso, tem importantes aplicações na agricultura (LUCKWILL, 1981). Eles atuam na divisão celular, na diferenciação dos tecidos e órgãos das plantas. Dentre estes reguladores estão os hormônios de crescimento vegetal.

Existem cinco tipos principais de hormônios vegetais: as auxinas (IAA), citocininas, gás etileno, ácido abscísico (ABA) e giberelinas (GAs) (KENDE e ZEEVAART, 1997). Suas propriedades fisiológicas são bastante diversas bem como suas estruturas químicas (Fig. 1).

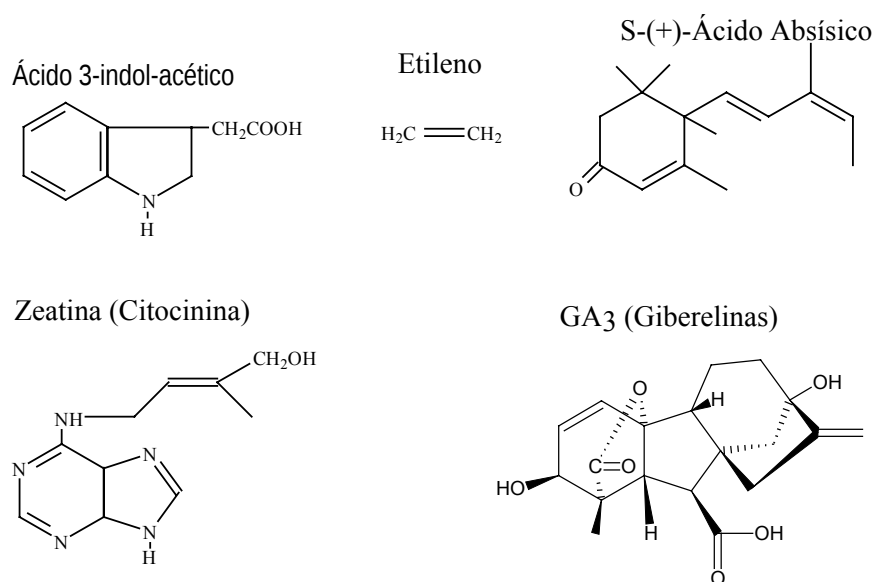


Figura 1: Estruturas de representantes das cinco principais classes de hormônios vegetais

O emprego de fitorreguladores como técnica agronômica para se otimizar as produções em várias culturas tem crescido muito nos últimos anos. WEAVER (1972) descreve que os órgãos vegetais de uma planta são alterados morfológicamente pela aplicação de fitorreguladores, de modo que o crescimento e desenvolvimento das plantas são promovidos, inibidos, influenciando ou modificando os processos fisiológicos de modo a controlar a atividade meristemática (TAIZ & ZEIGLER, 2004). Uma das classes mais utilizadas de reguladores são as giberelinas.

2.2 Giberelinas

As giberelinas (GAs) são hormônios vegetais que regulam o crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo a germinação de sementes, crescimento do caule, indução do florescimento e maturação de frutos. Atualmente, existem identificadas em torno de 136 GAs em plantas, fungos e bactérias. (Mac MILLAN, 2002). Apesar de serem metabólitos secundários de plantas as primeiras giberelinas foram isoladas do fungo fitopatogênico *Gibberella fujikuroi*. O primeiro relato descrevia substâncias isoladas deste fungo que promoviam a elongação do caule nas plantas de arroz. (YABUTA e SUMIKI, 1938). A partir desses trabalhos iniciais foi possível isolar e caracterizar o ácido giberélico que é hoje das giberelinas comerciais a mais importante.

A biossíntese das giberelinas em fungos pode ser dividida em três etapas (Fig. 2). Na primeira, o *ent*-caureno é sintetizado a partir do pirofosfato de isopentila e pirofosfato de dimetilalila, via pirofosfato de geranilgeranila (GGPP). Na segunda etapa o *ent*-caureno é convertido a GA₁₂ pelo citocromo P-450. Na etapa final, após a contração do anel B, há uma bifurcação no caminho biossintético, podendo ser seguido pela via da 3β-hidroxilação e da não 3β-hidroxilação, onde um conjunto de enzimas atua de forma seriada, formando a ponte γ-lactônica entre os carbonos 19 e 10 dando origem às várias giberelinas (BEARDER, 1975). Em plantas, o número de interconversões que as GAs podem sofrer varia com as espécies e órgãos da planta. Isto está relacionado, em grande parte, com reações de hidroxilação (MacMILLAN, 1997).

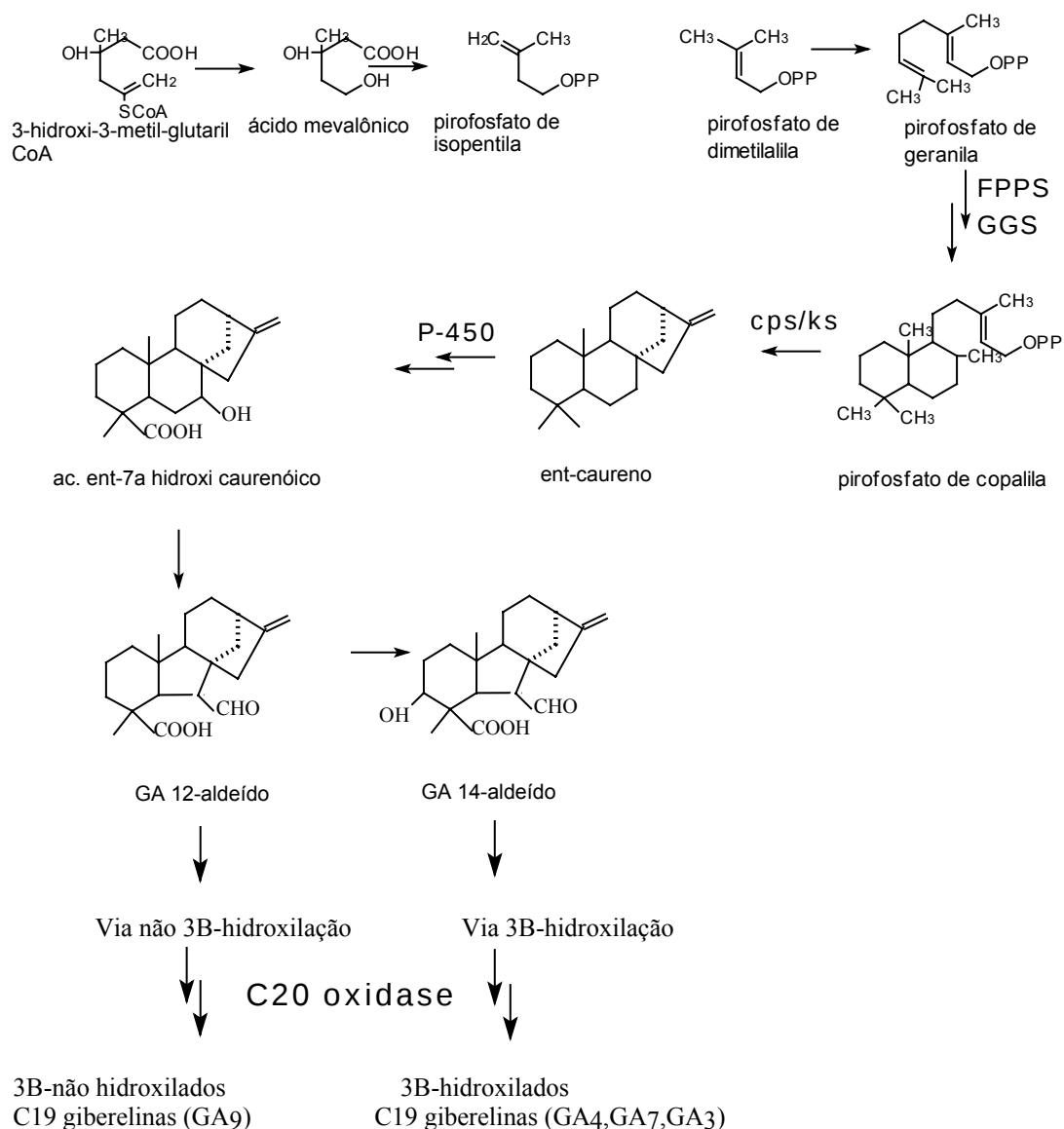


Figura 2: Biossíntese de giberelinas em *Gibberella fujikuroi*
 (FPPS=farnesil difosfato sintase; GGS=geranilgeranil sintase;
 CPS/KS=copalildifosfato sintase/ent-caureno sintase; P-450=P450 monooxigenases.
 TUDZYNSKI e HOLTER, 1998).

As giberelinas são utilizadas em várias culturas. A produção de mudas por enxerto em sistemas comerciais tem sido realizada com sucesso (ZIMMERMAN e FORDHAM, 1985; PEREIRA *et al.* 2001; MACIEL *et al.*, 2002). Além de provocar uma elevada taxa de multiplicação, a micropropagação possibilita rápida propagação do vegetal e sua manutenção para produção para qualquer época do ano (MULLINS, 2001). Após

aclimatização as plantas apresentam estagnação do crescimento vegetativo, que pode ser caracterizado por um tipo de dormência (RIBAS e ZANETTE, 1992). O período de dormência de frutíferas de clima temperado constitui um fator de defesa às condições ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento da planta (PASQUAL e PETRI, 1985). Para a superação do período de dormência das mudas, diversos autores relatam que a aplicação de giberelinas é eficaz, pois promovem o crescimento das plantas, em especial o alongamento dos entrenós (HOWARD e OEL, 1981; METIVIER, 1985; PONCHIA e GARDMAM, 1983).

O estabelecimento de metodologias para análise de sementes florestais desempenha papel fundamental na pesquisa científica e em outras atividades (VEIRA e GUSMÃO, 2006). O conhecimento dos principais processos envolvidos na germinação de sementes de espécies nativas é de vital importância para a preservação e multiplicação de espécies ameaçadas e das demais em programas de reflorestamento (SMIRDELE e SOUZA, 2003). O ácido giberélico atua na promoção da germinação de sementes, sendo isto comprovado em várias espécies (ARAGÃO *et al*, 2003; PASSOS *et al*, 2004; SCALON *et al*, 2004). Sementes tratadas com uma concentração adequada de ácido giberélico possuem uma germinação mais homogênea e em maior quantidade (FERREIRA *et al*, 2002; STENZEL *et al*, 2003).

Reguladores de crescimento vegetal têm sido utilizados por vários autores na fruticultura como forma de melhorar a germinação e promover o crescimento de plantas jovens (HORE e SEN, 1993). As giberelinas influenciaram positivamente as sementes de maracujá doce no estudo do efeito da temperatura de armazenamento e desenvolvimento inicial de mudas (ALVES *et al*, 2006). O ácido giberélico atrasa a senescência em citrus, por retardar a degradação da clorofila nas cascas e formação de carotenóides amarelos em laranjas (METIVIER, 1986). Os frutos tratados com ácido giberélico mantêm a coloração verde por mais tempo (CHITARRA e CHITARRA, 1990). Diferenças na coloração de laranjas foram melhoradas com a aplicação de ácido giberélico (FACHINELLO *et al*, 1994). Melhoria na calda da laranja Hamlin, aumento da espessura da casca, menor queda de frutos, retardo de colheita por noventa dias além da época normal de colheita foram obtidos com a aplicação de 60 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (SILVA *et al*, 1998).

As giberelinas são utilizadas para uniformizar a germinação da cevada (*Hordeum vulgare*), sendo esta etapa muito importante para a produção do malte, pois os grãos devem apresentar características adequadas para a indústria cervejeira (FILHO, 2000).

Na viticultura, o uso de giberelinas visa, principalmente, o aumento do tamanho e a fixação dos bagos, a descompactação dos cachos e a eliminação de sementes (PIRES *et al*, 1986). Entretanto, para RETAMALES *et al*, (1995), é importante uma busca alternativa para o uso do ácido giberélico, pois a sua utilização apresenta alguns efeitos indesejáveis, como redução de fertilidade das gemas, degrana dos cachos pós-colheita e maior suscetibilidade dos frutos a podridão.

Apesar dos efeitos benéficos na agricultura, o uso de giberelinas é restrito a um número relativamente pequeno de culturas. Isto se deve ao alto custo destas substâncias. Elas são obtidas por processos fermentativos utilizando microorganismos e estes processos têm um custo intrínseco alto. Por esta razão existe interesse na procura de substâncias que tenham propriedades semelhantes às das giberelinas mas de custo de obtenção mais baixo. Dentre estes compostos alguns da classe dos diterpenóides tetracíclicos, como o esteviol, tem mostrado potencial para uso como reguladores de crescimento vegetal.

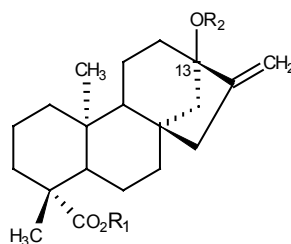
2.3 Esteviol e seu derivados

Os derivados do esteviosídeo possuem estrutura química similar a das giberelinas, sendo esperado que a obtenção de derivados possam produzir efeitos similares aos das giberelinas. Estudos mostram que diterpenos glicosilados, derivados do esteviosídeo, induzem atividades fisiológicas favoráveis como: promoção do crescimento, aceleração do florescimento, quebra da dormência, estimulação da germinação e aumento da produção de frutos. Estes compostos tem a vantagem de serem solúveis em água enquanto que as giberelinas são poucos solúveis (IWAMURA *et al*, 1984).

Diterpenos tetracíclicos com esqueleto caureno, baierano e atisirano, foram submetidos a bioensaios do hipocótilo de sementes de alface, ervilha, arroz, cevada e sementes de pepino demonstrando, em alguns casos, atividades superior à do ácido giberélico. Estas respostas são atribuídas e relacionadas à concentração e a grupamentos orgânicos existentes no carbonos 3, 7, 19, 15 e 16 (VILLALOBOS *et al*, 1994).

Estudo de derivados do esteviosídeo, esteviol e isoesteviol em relação à germinação e crescimento de raízes da *Triticum vulgare*, *Lens culinaris medicus*, *Trifolium spp.*, *Lycopersicon esculenium* e *Casicum annuum* demonstraram diferentes respostas. Diferenças nas estruturas e fisiologia de diferentes sementes podem refletir em diferentes respostas para um mesmo composto. Estudos mostraram que o esteviol possui fraca ação reguladora de crescimento vegetal e inibe a elongação das raízes de trigo (HERSHENHORN *et al*, 1997).

A *Stevia rebaudiana* é uma planta da família Asteraceae, nativa de certas regiões da América do sul (Paraguai e Brasil). O esteviosídeo, o principal componente adoçante das folhas da planta, é um glicosídeo do esteviol(1), e outros glicosídeos estão presentes nas folhas da planta (Fig. 3), representando 4 a 20 % das mesmas (GEUNS, 2003). Os outros ocorrem em concentrações mais baixas: esteviolbiosídeo (2), rebaudiosídeo A (4), B (5), C (6), D (7), E (8), F (9) e dulcosídeo A (10) (KENNELY, 2002).



	Composto	R ₁	R ₂
1	Esteviol	H	H
2	Esteviolbiosídeo	H	β- Glc- β- Glc (2→1)
3	Esteviosídeo	B- Glc	β- Glc- β- Glc (2→1)
4	Rebaudiosídeo A	B- Glc	β- Glc- β- Glc (2→1) β- Glc (3→1)
5	Rebaudiosídeo B	H	β- Glc- β- Glc (2→1) β- Glc (3→1)
6	Rebaudiosídeo C (Dulcosídeo B)	B- Glc	β- Glc- β- Rha (2→1) β- Glc (3→1)
7	Rebaudiosídeo D	β- Glc- β- Glc (2→1)	β- Glc- β- Glc (2→1) β- Glc (3→1)
8	Rebaudiosídeo E	β- Glc- β- Glc (2→1)	β- Glc- β- Glc (2→1)
9	Rebaudiosídeo F	B- Glc	β- Glc- β- Xyl (2→1) β- Glc (3→1)
10	Dulcosídeo A	B- Glc	β- Glc- α- Rha (2→1)

Figura 3: Estrutura do esteviol e seus glicosídeos
(GEUNS, 2003)

A primeira etapa da biossíntese do esteviol, que leva à formação do esqueleto *ent*-caureno, é semelhante à da biossíntese do GA₃. Posteriormente, o *ent*-caureno sofre hidroxilação no carbono 13 e oxidação do carbono 19. Em seguida, estas duas posições sofrem glicosilações promovidas por Gtases a partir da UDP-glicose. Duas glucosiltransferases foram identificadas na glucolisação do esteviol em folhas de *S. rebaudiana*, a GTase I e GTase II (Shibata *et al*, 1995). Os genes que codificam a copalilfosfato sintase (CPS) e a caureno sintase (KS) são geralmente presentes em cópias únicas na maioria das espécies de plantas e sua expressão é normalmente baixa. O oposto ocorre nas folhas de stevia. A “over expression” conduz a uma separação na biossíntese do esteviol e das GAs. Os resultados sugerem que a CPS e KS participam da biossíntese dos glicosídeos do esteviol e que a estévia desenvolveu um caminho metabólico secundário para regular a biossíntese de hormônios (RICHMANN *et al*, 1999).

Devido à importância econômica de adoçantes naturais, estudos da formação da unidade isoprênica aplicada na formação do esqueleto do esteviol tem sido investigados. Estudos feitos através da glicose com carbono marcado, revelam que estas unidades podem ser sintetizadas via mevalonato (MVA) ou do fosfato de metileritrol (MEP) (TOTTE *et al*, 2000).

2.4 Conversão do esteviol em giberelinas

A atividade reguladora de crescimento do esteviol pode ser explicada pela sua transformação em giberelinas (RUDDAT *et al*. 1965). Forma-se primeiro o ácido 7 α ,13-diidroxicaurenóico, precursor de outros compostos com esqueleto giberelano tais como GA₁₉ (BEARDER *et al*, 1975), GA₁ e GA₁₈ (MUROFUSHI *et al*, 1982), GA₅₃ (GIANFAGNA, 1983), conforme mostrado no esquema da figura 4.

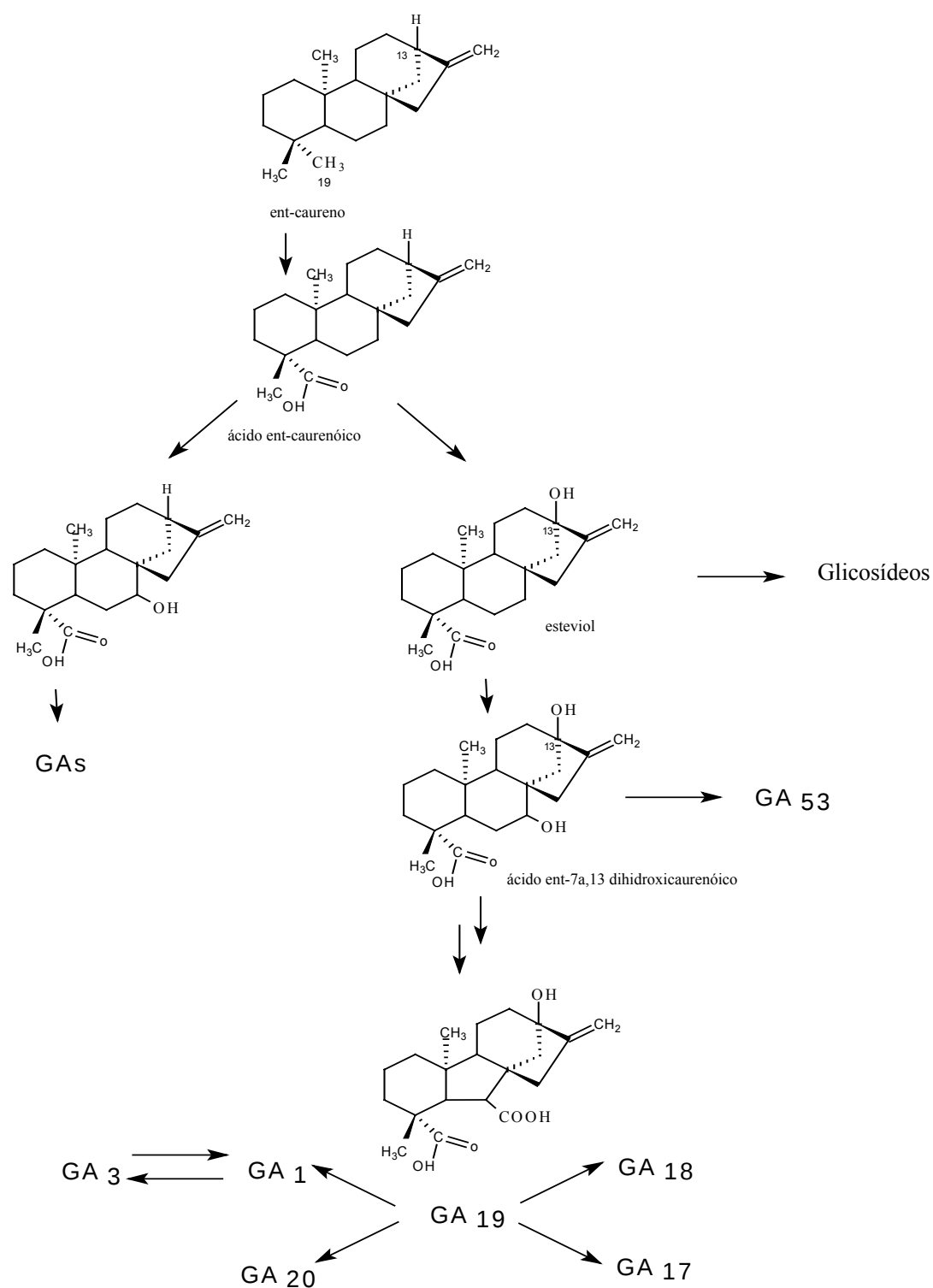


Figura 4: Obtenção de giberelinas a partir do *ent*-caureno

A modificação estrutural do esteviol, portanto, poderia levar a derivados com potencial bioatividade. Além de procedimentos químicos, que poderiam fazer alterações

funcionais, outra forma de modificar quimicamente o esteviol seria através da técnica de biotransformações. Esta técnica possui algumas vantagens importantes em relação à modificação química. Uma das principais é de funcionalizar posições não ativadas da molécula.

2.5 Biotransformação de compostos orgânicos

Biotransformações, transformações biológicas ou bioconversões são transformações químicas em substâncias de interesse através do uso de microorganismos ou enzimas (HOLLAND, 1981; SEBEK, 1983; SERVI, 1992). A biotransformação de compostos orgânicos é uma alternativa à síntese orgânica clássica. Uma das vantagens desta metodologia é a possibilidade da obtenção de derivados difíceis de serem obtidos por reações químicas comuns. Além disso, as biotransformações são consideradas competitivas economicamente e ecológicamente em relação aos métodos de síntese clássica (HUISMAN *et al*, 2002). A seletividade e condições mais suaves de reação podem fazer o processo de biotransformação superior ou similar aos métodos químicos (THOMAS *et al*, 2002). A hidroxilação de carbonos não-ativados pelos métodos clássicos, por exemplo, é muito difícil e a hidroxilação por fungos tem sido empregada com sucesso em muitos casos (VAN BEILEN *et al*, 2003).

Nos últimos anos, um aumento do número de livros e artigos de revisão tem descrito processos de biotransformação industrial e discutido como a tecnologia pode ser aplicada em escala de níveis de produção. Na última década o número de processos de biotransformação e sua utilização em escala industrial tem aumentado muito e a expectativa é que estes números aumentem rapidamente nos próximos anos (CHEETHAM, 2002; MANZONI, 2002; LIESE *et al*, 2000).

Uma “análise das biotransformações industriais” mostra que elas conduzem a compostos naturais e seus derivados, não existindo uma classe de compostos predominante. Carboidratos e ácidos graxos são na maioria utilizados no setor de alimentos, e outros tipos de compostos naturais são na maioria utilizados nos setores de farmácia e agronomia (STRAATHOF, 2002).

Apesar das vantagens da técnica de biotransformações, uma das dificuldades é a geralmente baixa solubilidade em água dos compostos orgânicos. As reações com microorganismos ou enzimas isoladas são geralmente feitas em meio aquoso. A baixa solubilidade do substrato pode dificultar seu contato com a enzima que o vai transformar. Alguns procedimentos têm sido propostos para contornar esta dificuldade, tais como a realização de reações microbianas e/ou enzimáticas em meio orgânicos. Outra alternativa seria o encapsulamento do substrato em lipossomas e administração do composto orgânico encapsulado ao microorganismo de interesse.

2.6 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (Fig. 5). Eles têm sido usados recentemente em uma grande variedade de produtos farmacêuticos. Uma grande vantagem dos lipossomas, com relação a outros sistemas transportadores de medicamentos, é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídeos pertencentes a famílias de lipídeos naturais. Além disto são altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos químicos, farmacêuticos e farmacológicos (FRÉZARD *et al*, 2005).

A partir do início da década de 80, foi adotada uma nomenclatura para os lipossomas baseada no seu número de bicamadas lipídicas (lamelas) e tamanho (SZOKA, 1980). Assim, para os lipossomas de preparação imediata, utilizados em todos os primeiros estudos, ficou consagrado o nome de “vesículas multilamelares” ou “MLV”. Estas vesículas são constituídas por várias bicamadas lipídicas, aproximadamente concêntricas, podendo seu diâmetro variar entre 400 e 3.500 nm.

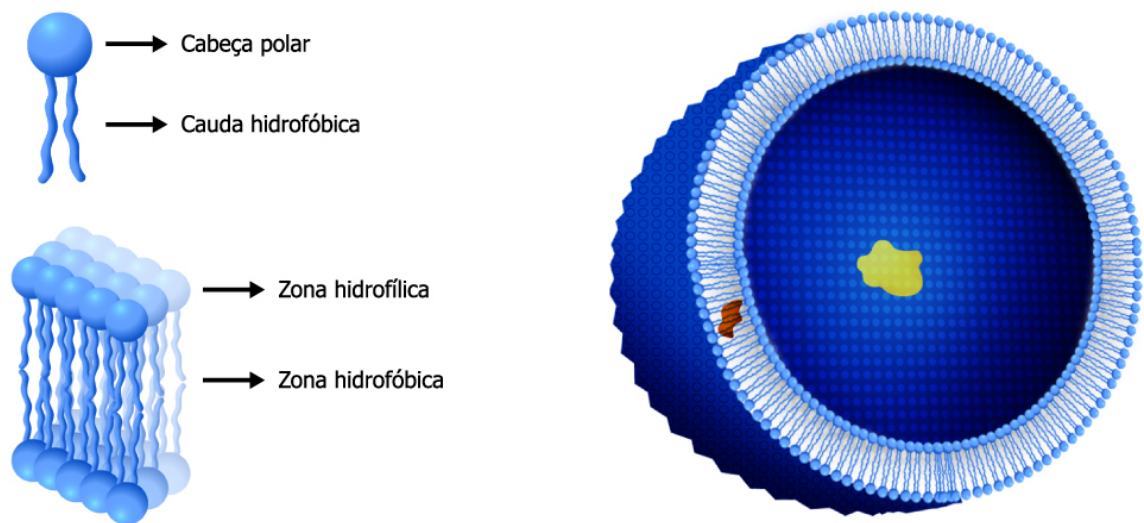


Figura 5: Características estruturais dos lipossomas
(FRÉZARD et al, 2005)

Os MLV são os lipossomas de mais fácil preparação, e por isso foram os primeiros a serem caracterizados. Foi este o sistema utilizado em todos os primeiros trabalhos, mantendo uma larga aceitação na atualidade (SANTOS e CASTANHO, 2002). Os lipossomas podem ser formados por diversos tipos de lipídios. Os fosfolipídios são os compostos mais utilizados na preparação de lipossomas, eles são constituídos de uma parte polar ou cabeça hidrofílica (grupo fosfato), ligada a uma cauda hidrofóbica apolar, geralmente formada por duas cadeias longas de ácidos graxos, exibindo propriedades anfífilas e tendem a agregar-se em estruturas ordenadas com diferentes morfologias, onde o tipo de empacotamento é determinado pelo tamanho relativo das cabeças polares e das caudas apolares das moléculas envolvidas (MORAES, 1996). Os lipossomas, geralmente podem ser preparados a partir de glicerofosfolipídeos e fosfatidilcolina (FRÉZARD *et al*, 2005). Após a escolha da composição lipídica e solução aquosa a ser utilizada, o lipídio seco deve ser dissolvido em um solvente ou mistura de solventes orgânicos que seja, ao mesmo tempo, eficiente na dissolução do lipídio e suficientemente volátil (ex. clorofórmio, misturas de clorofórmio-metanol). Atendendo as proporções as soluções dos componentes devem ser adicionados a um balão de fundo redondo. O solvente orgânico é evaporado até a secura, rodando o balão de modo a formar um filme lipídico tão fino quanto possível. De maneira que todo o solvente seja evaporado. A hidratação do lipídio é feita adicionando ao

balão contendo o filme, o volume desejado da solução aquosa escolhida, de modo a conseguir o desprendimento total do lipídio das paredes do balão (Fig. 6) (SANTOS e CASTANHO, 2002).

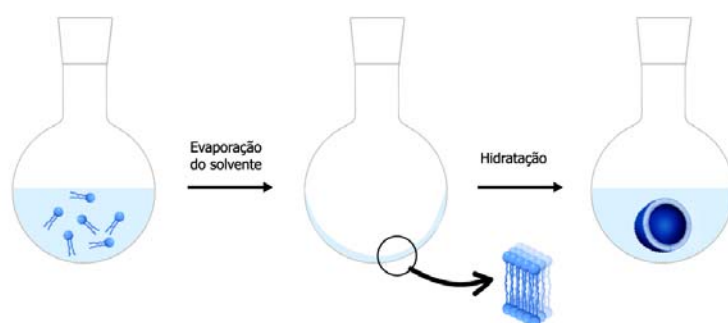


Figura 6: Método de preparação de lipossomas do tipo MLV (FRÉZARD et al, 2005)

Apesar de potencialmente útil, o uso de lipossomas em biocatálise tem sido relatado em poucos trabalhos. Atenção tem sido dada a este sistema na biotransformação de esteróides (MANOSROI *et al*, 2003; LIANES *et al*, 2002)

2.7 Bioensaios para reguladores de crescimento vegetal

Os bioensaios utilizados para determinar as atividades reguladoras de crescimento vegetal baseiam-se nos seus modos de ação. Dois mecanismos gerais são aceitos do modo de atuação dos fitohormônios. O primeiro considera que o hormônio atravessa a membrana celular e alcança o citoplasma, onde se une a uma molécula adequada (receptor) e forma um complexo hormônio-receptor. A partir deste momento, o complexo pode dissociar-se, entrar no núcleo e afetar a síntese do RNAm. O efeito sobre a tradução é o que produz a resposta fisiológica. O segundo mecanismo sugere que o hormônio se une a um receptor de membrana na célula. A união hormônio-receptor produz neste último uma mudança conformacional que conduz a uma cadeia de reações citoplasmáticas que podem produzir efeitos variados: novas atividades enzimáticas, modificação dos processos metabólicos, indução na síntese de RNAm, etc. Dentre os bioensaios disponíveis para a

avaliação de reguladores de crescimento vegetal estão os testes de hipocótilo de alface e o teste da aleurona da cevada.

2.7.1 Teste de hipocótilo da alface

O teste de hipocótilo da alface se baseia no desenvolvimento daquela estrutura durante a germinação de sementes. A germinação é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais da maturação (Fig. 7). Os processos fisiológicos do crescimento exigem atividades metabólicas aceleradas e a fase inicial de germinação consiste primariamente na ativação daqueles processos pelo aumento do teor da umidade e da atividade respiratória da semente (BOUWMEESTER e KARSEN, 1989).

A mobilização de reservas de sementes ocorre após o alongamento e emissão da raiz primária, sendo um evento pós-germinativo, no entanto, a degradação destas reservas se inicia nas primeiras horas de embebição das sementes não dormentes (BEWLEY e BLACK, 1985). Juntamente com a degradação das reservas insolúveis de alto peso molecular, ocorre a sua conversão a formas solúveis, que são transportadas aos tecidos de crescimento e para vários propósitos, tais como geração de energia e produção de matérias primas para a construção de novos tecidos e células (MAYER, 1985). As modificações metabólicas que ocorrem neste estágio resultam das atividades de várias enzimas (BEWLEY e BLACK, 1985).

As substâncias de reserva de sementes são carboidratos, lipídios, proteínas, ácidos nucléicos, compostos contendo fósforo e minerais. Em sementes de cereais, as principais substâncias de reserva são os carboidratos, chegando a 70 % do total das sementes, seguido pelas proteínas que constituem de 8 a 15% das sementes (ZAMSKI, 1995). O amido é o principal carboidrato de reserva das sementes de cereais (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

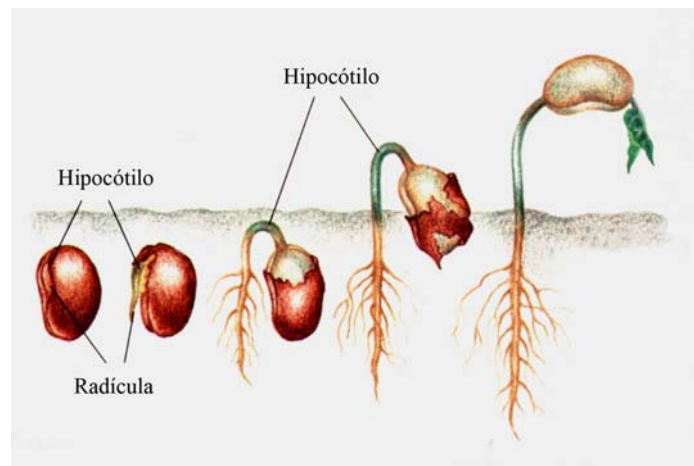


Figura 7: Etapas de germinação e formação do hipocótilo

2.7.2 Teste da aleurona da cevada

O amido é a substância de reserva para a maioria das plantas. Nos cereais o pericarpo envolve o embrião bem como o endosperma amiláceo, que contem a maior parte do amido. O amido é um polissacarídeo constituído por dois tipos principais de moléculas a amilose e a amilopectina (KOTARSKI, 1992).

A amilose é um polímero linear de unidades de D-glucose unidos por ligações do tipo α -1,4, a proporção de amilose no grânulo de amido pode variar de 14 a 34%, sendo que esta proporção pode variar segundo o tipo de grãos e segundo as variações genéticas dentro das espécies. A amilopectina é um polímero ramificado, constituída de uma cadeia linear de glucose (α -1,4), com pontos de ramificações α -1,6 a cada 20 a 25 unidades (Fig. 8).

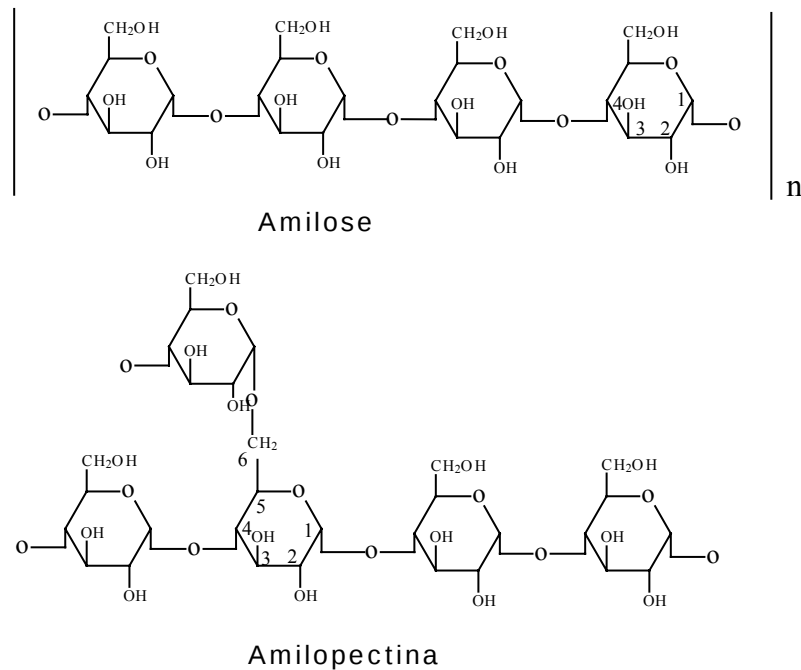


Figura 8: Estruturas da amilose e amilopectina

Durante a germinação das sementes, as reservas de amido são degradadas e convertidas a formas mais solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas em reações de síntese ou produção de energia. As modificações metabólicas que ocorrem neste estágio é devido à atividade de várias enzimas hidrolíticas e de transferência. A α -amilase tem o papel fundamental da quebra das ligações α -1,4 entre os resíduos de glicose das cadeias de amilose e amilopectina nas reservas de amido das sementes de cereais (BEWLEY e BLACK, 1985).

O grão de cevada (Fig. 9) é constituído basicamente por uma camada externa, endosperma amiláceo e germe (embrião). A casca constitui uma proteção externa para o grão, é constituído de material celulósico, apresentando proteínas, resinas e taninos em menor quantidade. É formada por duas estruturas: lema e pálea, que recobrem a região dorsal e a ventral do grão, respectivamente. O endosperma amiláceo é o tecido de reserva, que acumula o amido.

Na região do germe tem início o processo de germinação do grão. Ar e água chegam ao embrião através de uma estrutura chamada micrópila. Entre o embrião e o endosperma amiláceo há uma estrutura com forma de escudo chamada de escutelo, que

apresenta a função de secreção, permitindo a passagem de enzimas hidrolíticas do embrião para o endosperma amiláceo, e de açúcares, aminoácidos e outras moléculas simples no sentido inverso. A camada de aleurona, que envolve o endosperma amiláceo também apresenta atividade secretora, secretando apenas enzimas aminolíticas (FILHO, 2000).

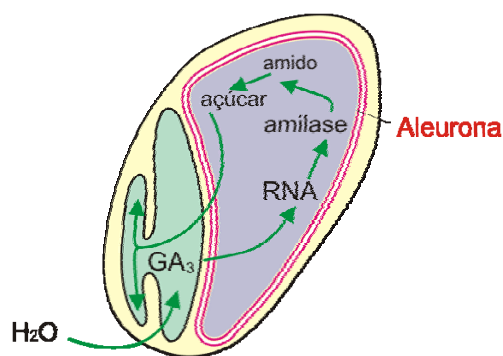


Figura 9: Semente cevada

A α -amilase está presente em sementes quiescentes, e durante a germinação são secretadas para o endosperma amiláceo por dois tecidos, o escutelo e a camada de aleurona (DURE, 1960). Estudos mostram que a degradação do amido depende da secreção de enzimas, e que este fato depende da presença do embrião, quando este era retirado da semente a degradação não ocorria, mesmo a semente sendo hidratada por longo período. No entanto quando a semente era hidratada próximo ao embrião retirado da semente, a degradação era observada. Desta maneira chegou-se a conclusão que o embrião secreta uma substância que difunde-se no meio e induz a síntese de α -amilase (ASHFORD e GUBLER, 1984).

A síntese dessa enzima ocorre em resposta a sinais produzidos pelo embrião durante a germinação, sendo que até a década de 60 não se conhecia nada a respeito desses sinais. Foi então que Paleg (1960) verificou que em meia-semente, mesmo na ausência do embrião, o ácido giberélico, estimulou a atividade de α -amilase em cevada. Esse autor concluiu que giberelinas endógenas podem exercer uma importante regulação hormonal durante a germinação. Trabalhos utilizando técnicas moleculares puderam, posteriormente, comprovar a teoria de que o GA aumenta a transcrição de genes que codificam α -amilase,

através do maior teor de mRNA dessa enzima observada (Higgins *et al.*, 1976 e Chandler *et al.*, 1984).

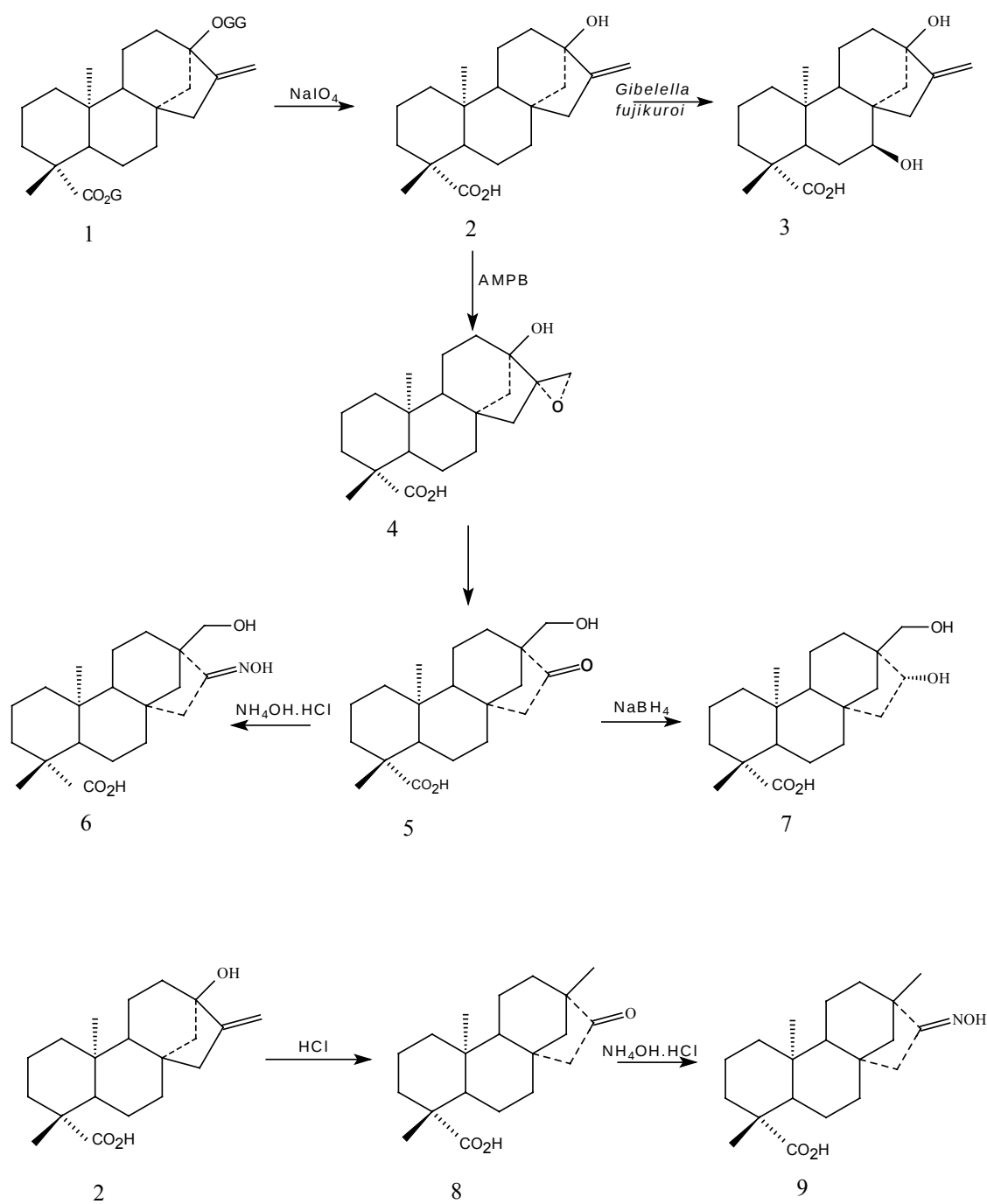
2.8 Objetivos

Geral

Obter derivados do esteviosídeo (esquema 2) que possuam atividade reguladora de crescimento vegetal.

Específicos

- obter, através de métodos químicos e biotransformação, os compostos de interesse a partir do esteviosídeo (esquema 1)
- testar os compostos obtidos em relação a sua atividade reguladora de crescimento vegetal (teste de hipocótilos de alface e aleurona da cevada).



Esquema 1: Compostos a serem preparados.

3 Material e Métodos

a) Instrumentação analítica: espectrômetro de RMN Brucker, modelo DRX 400 e DPX 200, operando em 400 e 200 MHz para RMN ^1H e 100 e 50 MHz para RMN ^{13}C , utilizando com solvente padrão de referência interna clorofórmio e/ou metanol deuterado; pHmetro EVLAB; sistema CLAE marca Varian, bomba quaternária (9012Q), detector UV fotodiodo (modelo 9065) e injetor automático (modelo AI200); os espectros de IV foram realizados em aparelho Excalibur serio Bio-Rad FTS3500GX, sendo as amostras preparadas em pastilha de KBr; os experimentos de biotransformação foram realizados em agitador-incubador orbital marca Tecnal TE-421 a 28° C e 150 rpm.

b) Cromatografia: o isolamento dos produtos foi realizado por cromatografia em camada delgada centrífuga (CCDC) em Chromatotron. Utilizou-se sílica Si-60 PF254 com sulfato de cálcio (Merck, art.7749). Os rotores foram preparados com uma camada de sílica de espessura de 1mm e 2mm. Para cromatografia a vácuo foi empregada sílica-60 (Merck, art. 7744), partículas de 5-10 μm . Para cromatografia em camada delgada (CCD), utilizou-se como adsorvente Si-60 F254 (Merck, art. 5554) com espessura de 0,2 mm. As revelações dos cromatogramas em CCD foram feitas com solução metanólica de ácido sulfúrico (50%) com aquecimento e/ou irradiação no UV

c) Solventes: os solventes utilizados foram de grau comercial e foram destilados antes do uso. O esteviosídeo foi fornecido pela steviafarma industrial S.A, situada em Maringá, Paraná. Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.1 Preparação do esteviol (2)

O esteviosídeo (10 g) foi dissolvido em 500 mL de água acrescentou-se 10,0 g de periodato de sódio. A mistura foi deixada em repouso por dezesseis horas no escuro. Após este período, adicionou-se hidróxido de potássio (7,5 g) (até pH 12) e a mistura foi aquecida sob refluxo por uma hora. Após resfriamento com gelo, acidulou-se com ácido acético glacial, até pH 4. Em seguida adicionou-se bissulfito de sódio 1N(40 mL) e a mistura foi extraída com acetato de etila (3x100 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O esteviol (2) foi recristalizado com metanol, por três vezes, o qual foi comparado com padrão existente em nosso laboratório. O rendimento foi de 37%. O éster metílico do esteviol foi preparado através de reação com diazometano etéreo.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) δ 4,87(d,1H, H-17), 4,81(d,1H,H-17), 3,64(s,3H,OMe), 1,17(s,3H,H-18), 0,82(s,3H,H-20).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 177,9 ppm, 156,1, 102,8, 80,2, 56,9, 53,7, 51,1, 47,3, 46,9, 43,7, 41,6, 41,3, 40,6, 39,2, 38,0, 28,6, 21,8, 20,4, 19,0, 15,2.

3.2 Preparação do isoesteviol (8)

O esteviol (10g) foi refluxado na presença de ácido clorídrico 10% (50mL) por uma hora. Após resfriamento, a mistura foi deixada em geladeira durante 24 horas e após precipitação, filtrou-se a mistura sob vácuo, o resíduo foi lavado com água destilada gelada, sendo posteriormente o sólido recristalizado em acetona:hexano. O isoesteviol (8) foi obtido com rendimento foi de 86%. I.V. λ Max 3450 cm^{-1} ; $2956,2918\text{ cm}^{-1}$; $1735, 1695\text{ cm}^{-1}$. O éster metílico foi preparado através de reação com diazometano etéreo.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) δ 3,63ppm(s,3H,OMe), 2,57(dd,1H,J=18,46 e 3,66Hz,H-15), 1,19(s,3H,H-18), 0,97(s,3H,H-17), 0,68(s,3H,H-20)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 187,9 ppm, 177,8, 57,0, 54,7, 54,2, 51,2, 48,6, 48,4, 43,7, 41,4, 39,7, 39,4, 37,9, 37,2, 28,8, 21,8, 20,6, 19,8, 18,9,13,1.

3.3 Preparação da oxima do isoesteviol (9)

O isoesteviol (318 mg, 1mmol) foi dissolvido em metanol/água (4:1). Acetato de sódio (120mg, 2mmol) e cloridrato de hidroxilamina (139 mg,2mmol) foram adicionados à reação, e manteve-se a mistura sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Ao final da reação adicionou-se água ao meio e o produto foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e eliminado em evaporador rotatório. O rendimento do ácido de ent-16-hidroximinoabacera-19-óico (9) foi de 74%. I.V. λ Max 3267 cm^{-1} ; $2954,2848\text{ cm}^{-1}$; 1693 cm^{-1} ; 1668 cm^{-1} ; 904 cm^{-1} . O éster metílico foi preparado através de reação com diazometano etéreo.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) δ 3,62 ppm(s,3H,OMe), 2,90(dd,H,J=15,54 e 3,52Hz, H-15), 1,17(s, 3H,H-18), 1,09(s,3H,H-17), 0,74(s,3H,H-20)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 177,9 ppm, 170,5, 57,0, 56,2, 54,8, 51,1, 43,7, 40,8, 40,5, 39,8, 39,4, 37,9, 36,7, 30,8, 28,7, 22,0, 21,6, 20,3, 18,8, 13,1.

3.4 Preparação do 16,17 α -epoxiesteviol (4)

O esteviol (500mg, 1,57 mmol) foi pesado e dissolvido em diclorometano (30mL) acrescentado-se ácido m-cloro perbenzóico (280 mg, 1,62 mmol) e deixado reagir por 72 horas a temperatura ambiente. Após este tempo, foi adicionada à reação uma solução de metabissulfito de sódio a 10%. A solução foi decantada e a ela adicionada 100 ml de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com solução tampão pH 7,4 e em seguida a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O rendimento final do ent-13-hidroxi-16,17 α -epoxicaur-19-óico foi de 56% (4). I.V. λ Max 3483 cm^{-1} ; 2935, 2866 cm^{-1} ; 1739 cm^{-1} ; 1232 cm^{-1} . O éster metílico foi preparado através de reação com diazometano etéreo.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) δ 3,65 ppm(s,3H,OMe), 2,94(d,1H,Hb-17, Jab=4,4 Hz), 2,79(d,1H,Ha-17, Jab=4,38 Hz), 1,17(s,3H,H-18), 0,85(s,3H,H-20)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 177,8 ppm, 74,7, 65,2, 56,8, 53,7, 51,1, 48,6, 46,4, 45,74 43,7, 41,5, 41,2, 40,7, 39,2, 37,9, 34,7, 28,6, 21,8, 19,5, 19,0, 15,5 ppm.

3.5 Preparação do 17-hidroxiisosteviol (5)

O 16,17 α -epoxiesteviol (3) (300 mg, 0,897 mmol) foi pesado e solubilizado em álcool etílico (30mL). A essa solução foi acrescentada solução de ácido clorídrico 0,5% (30mL) e deixado a temperatura ambiente por 8 horas. Retirou-se grande parte do etanol utilizado como solvente em evaporador rotativo e foi acrescentado acetato de etila (150 mL). A solução orgânica foi lavada por três vezes com água destilada (50 mL) e depois decantada. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado em evaporador rotativo. A recristalização foi feita em acetato de etila e o rendimento de ácido ent-17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico (5) foi de 44%; I.V. λ Max 3450 cm^{-1} ; 2939,2846 cm^{-1} ; 1726,1701 cm^{-1} . O éster metílico foi preparado através de reação com diazometano etéreo.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) δ 3,63 ppm(s,3H,OMe), 3,50 e 3,68(2d,2H,H-17; J=11,22 e 7,06 Hz), 1,14(s,3H,H-18), 0,80(s,3H,H-20)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 215,7 ppm, 182,5, 64,5, 56,7, 55,1, 54,1, 51,1, 48,6, 43,4, 41,1, 39,6, 38,1, 37,5, 31,9, 28,8, 21,5, 19,6, 18,7, 13,2

3.6 Preparação da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)

O 17-hidroxi-isoesteviol (333 mg, 1mmol) foi dissolvido em metanol/água (4:1). Acetato de sódio (120mg, 2mmol) e cloridrato de hidroxilamina (139 mg, 2mmol) foram adicionados a reação e manteve-se a mistura sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Ao final da reação, adicionou-se água ao meio e o produto foi extraído com acetato de etila, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e eliminado em evaporador rotatório. O rendimento de ent-17-hidroxi-16-hidroximinobaieran-19-óico (6) foi de 74%; I.V. λ Max 3413 cm^{-1} ; 2941,2854 cm^{-1} ; 1701 cm^{-1} ; 1643 cm^{-1} ; 908 cm^{-1} . O éster metílico foi preparado através de reação com diazometano etéreo.

RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ 3,62 ppm(s,3H,OMe), 3,64 e 3,55(2d,2H,H-17; J= 11,3 e 10,8), 1,18(s, 3H,H-18), 0,75(s,3H,H-20)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 177,9 ppm, 170,4, 67,0, 57,0, 55,0, 51,2, 51,1, 49,4, 43,8, 41,0, 40,8, 39,9, 38,1, 38,0, 37,0, 34,1, 28,7, 21,7, 19,9, 18,9, 13,2

3.7 Preparação do ácido ent-16,17-diidroxibaieran-19-óico (7)

O 17-hidroxi-isoesteviol (333 mg, 1 mmol), foi dissolvido em etanol (100 mL) e boroidreto de sódio (500 mg) foi adicionado, sendo a mistura agitada por 5 horas. Após este período, acrescentou-se 50 mL de ácido clorídrico 10%. Acabando a efervescência, reduziu-se o volume em evaporador rotatório e a extração do produto foi feita com acetato de etila (3x50mL). O rendimento do ácido ent-16,17-diidroxibaieran-19-óico (7) foi de 68%. I.V. λ Max 3547,3466 cm^{-1} ; 2943, 2844 cm^{-1} ; 1699 cm^{-1} . O éster metílico foi preparado através de reação com diazometano etéreo.

RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) δ 3,36 e 3,44 ppm(2d,2H,H-17; J= 10,42 Hz), 4,15(dd,H,H-16; J=10,90 e 4,6 Hz), 1,18(s,3H,H-18), 0,87 (s,3H,H-20)

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 179,9 ppm, 77,3, 69,8, 56,6, 56,2, 49,8, 46,3, 43,0, 41,9, 41,7, 41,6, 39,4, 37,9, 37,7, 29,1, 28,8, 21,5, 19,6, 16,6, 13,1

3.8 Biotransformação do esteviol

O fungo *Giberella fujikuroi* foi preservado em ágar batata dextrose (BDA) à temperatura de 5°C, por período de até 3 meses. Para reativação foi utilizado o Meio Sabouraud Modificado (MSM): 10g de peptona; 40g de sacarose; 20g de ágar; 2,0 mL de traços de elementos e completar com água para o volume 1000 mL.

A solução elementos-traço é composta de: 0,010g de nitrato de cobalto. 6H₂O; 0,100g de sulfato de ferro. 7H₂O; 0,015g de sulfato de cobre. 5 H₂O; 0,161 g de sulfato de zinco. 7 H₂O; 0,010 g de sulfato de magnésio. 7 H₂O; 0,100 g de molibdato de amônio. 4 H₂O e água destilada para completar o volume de 100 mL.

Para a biotransformação utilizou-se o meio ICI 10%: 80 g de maltodextrina; 2,4 g de nitrato de amônio; 5,0 g de fosfato de potássio dihidrogenado; 1,0 g de sulfato de magnésio. 10 H₂O; 2,0 mL da STE (solução de elementos-traço); água para completar o volume de 1000 mL, ajustar para o pH=5, transferir alíquotas (50 ou 300 mL) para Erlenmeyers em seguida autoclavados por 20 minutos a temperatura de 121°C e pressão de 110 kPa man. Para as biotransformações em escala analítica, foram utilizados Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido. Frascos de 1000 mL contendo 250 mL de meio foram usados em escala preparativa.

a) Biotransformação em escala preparativa

A *G. fujikuroi* foi cultivada em seis erlenmeyers de 1000 mL, com 250 mL de meio de cultura. Esteviol (300 mg) foi distribuído em três frascos e os outros três foram mantidos como controle. O experimento foi conduzido a 28 °C e a 170 rpm por 48 horas. Com 48 h, foram retirados dois frascos com o ensaio e seus controles respectivos. Após 96 h, a retirada dos dois últimos frascos, um com o composto e o controle. A mistura foi então filtrada, a vácuo, o filtrado foi extraído com acetato de etila (3x 100 mL) que foram secos com sulfato de sódio anidro e o solvente teve seu volume reduzido em evaporador rotatório.

O extrato seco foi fracionado em Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga (Chromatotron), utilizando-se sílica Si-60 PF254 (Merck, art. 7749). Após aplicação da amostra, a eluição foi feita com 4x100 mL de misturas de hexano e acetato de etila, sendo, 100 mL para cada uma das seguintes fases móveis: 75:25; 65:35; 50:50 e 35:65. A lavagem da placa foi efetuada com 100 mL acetato de etila: metanol (80:20). As frações semelhantes foram reunidas, o solvente foi evaporado e o resíduo foi recristalizado em metanol.

Obteve-se um rendimento entre 10 e 16%; I.V. λ Max 3433 cm^{-1} ; $2953,2879\text{ cm}^{-1}$; 1699 cm^{-1} ; 1668 cm^{-1} . O éster metílico foi preparado com diazometano etéreo.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) δ 4,98ppm(s,1H,H-17), 4,85(s,1H,H-17), 3,65(s,4H,OMe), 3,59(s,1H,H-7), 1,17(s, 3H,H-18), 0,83(s,3H,H-20)

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 178,0, pm, 155,2, 103,4, 80,1, 51,2, 47,8, 47,2, 45,8, 45,5, 43,8, 43,3, 40,4, 39,7, 38,9, 37,9, 29,2, 28,5, 20,0, 19,1, 15,2

b) Determinação da influência da temperatura

Os fungos foram cultivados por 48 horas em quatro erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (ICI 10%), em pH 4,5. Após 48 horas, foram adicionados a cada frasco 10 mg de esteviol em cada frasco, menos no controle, e mantidos sob agitação por mais 48 horas. O meio foi filtrado e extraído por 3 vezes com acetato de etila e a fase orgânica foi seca e concentrada. Os extratos foram analisados por CLAE. Este mesmo procedimento foi realizado nas temperaturas de 26, 28 e 30 °C.

f) Determinação da cinética da reação

Os fungos foram cultivados por 48 horas em quatro erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (ICI 10%), em pH 4,5, a 28°C. Após 48 horas foram adicionados a cada frasco 10 mg de esteviol em cada frasco, menos no controle, e mantidos sob agitação por mais 48 horas. Os frascos foram retirados em intervalos de 24 em 24 horas, até 120 horas. O meio foi filtrado e extraído por 3 vezes com acetato de etila. A fase orgânica foi seca e concentrada. Os extratos foram analisados por CLAE.

d) Avaliação do encapsulamento do esteviol com lipossomas

Os fungos foram cultivados por 48 horas em quatro erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (ICI 10%), em pH 4,5, a 28°C. Após 48 horas foram adicionados a cada frasco 10 mg de esteviol, encapsulado na forma de lipossomas preparados como descrito na letra “e” deste item, em cada frasco, menos no controle, e mantidos sob agitação por mais 48 horas. O meio foi filtrado e extraído por 3 vezes com acetato de etila. A fase orgânica foi seca e concentrada. Os extratos foram analisados por CLAE.

e) Encapsulamento do esteviol em lipossomas

O Epikuron 200SH (Fosfatidicolina) (400mg), um fosfolípido, foi pesado e colocado em um balão de 1000 ml, esteviol (10mg) e uma solução de clorofórmio:metanol (9:1, 10 ml) foram adicionados. A mistura foi mantida sob agitação até a completa dissolução dos lipídios e depois o balão foi acoplado ao evaporador rotatório, sob vácuo e temperatura de 65°, mantido a uma rotação de 16 rpm até completa evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente o balão foi mantido durante 15 minutos fora do banho, a temperatura ambiente, e 15 minutos imerso no banho gelado (4° C) até a formação do filme lipídico. A seguir o balão foi mantido a vácuo no evaporador rotatório, por uma hora, e depois o filme seco foi hidratado e mantido sob agitação (10 rpm), a 65 °C, por 30 minutos.

3.9 Teste do hipocótilo (VILLALOBOS *et al*, 1994)

Prepararam-se soluções-estoque na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em acetona, para o GA₃, e etanol, para os demais compostos. As diluições foram feitas em água destilada para atingir as concentrações de: 10⁻³, 10⁻¹ e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Sementes de alface (FELTRIN – Importadora de Sementes) foram imersas nas soluções por doze horas, inclusive o controle, que era, uma solução de acetona, para o GA₃ e etanol para os demais compostos. Foram utilizadas 60 sementes para cada concentração. Após este período, as sementes foram secas, e depositadas, em placas de Petri, umedecidas com água destilada contendo papel de filtro. Vinte sementes foram colocadas em cada placa. As placas, contendo o material vegetal foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de 28 ± 2 °C fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de radiação fotossinteticamente ativa de 40 $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e umidade relativa do ar igual 70 ± 5 %. Ao fim deste tempo, o comprimento do hipocótilo de cada semente foi medido com paquímetro.

3.10 Teste da aleurona

O procedimento foi baseado naquele descrito por REEVE e CROZIER (1975). As sementes de cevada foram colocadas em ácido sulfúrico 50 % por duas horas. Após este período as sementes foram filtradas e removido o excesso de ácido, cascas e outros fragmentos. Os grãos foram limpos, secados e mantidos em dessecador por uma noite. Em

câmara de fluxo laminar, os embriões das sementes foram removidos e as sementes cortadas ao meio. Os bioensaios foram feitos em frascos de 10 mL, onde foram adicionados 17 mg de massa de sementes por frasco. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de tampão acetato 0,2 mM (pH 4,8) e 0,5 mL de cloreto de cálcio mM e 1 mL da solução de cada composto a ser testada. Os ensaios foram feitos em triplicatas, utilizando uma triplicata como controle e soluções de GA₃ como testemunha. As triplicatas dos compostos a serem testados, foram feitas utilizando soluções nas concentrações de 10⁻³ µg.mL⁻¹, 10⁻¹ µg.mL⁻¹ e 10 µg.mL⁻¹. A incubação foi realizada em shaker por 36 horas, com agitação em 140 rpm, a temperatura de 28° C. Após este período, o hidrolizado, foi retirado e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos e analisados pelo método Nelson-Somogyi.

Os carboidratos redutores foram determinados pelo método de Nelson-Somogyi, usando-se a D-Glucose como padrão. Em tubos de ensaio fechados, foi adicionado uma alíquota de 1 mL de hidrolizado, 1 mL do reagente C e aquecidos a 100° C por 15 minutos. Foram resfriados rapidamente e adicionado 1 mL do reagente D. Adicionou-se 3 mL de água e a leitura foi feita a 520 nm.

Preparação dos reagentes (Nelson-Somogyi)

Reagente A: foi dissolvido 15 gramas de tartarato de sódio e potássio e 30 gramas carbonato de sódio anidro em 300 mL de água, adicionou-se 20 gramas de bicarbonato de sódio. Dissolveu-se 180 gramas de sulfato de sódio anidro em 500 mL, a solução foi aquecida até a ebulição e resfriada. Misturou-se as duas soluções e o volume foi completado para um litro de água.

Reagente B: dissolveu-se 5 gramas de sulfato de cobre pentahidratado e 45 gramas de sulfato de sódio anidro em água e completou-se para 250 mL de água.

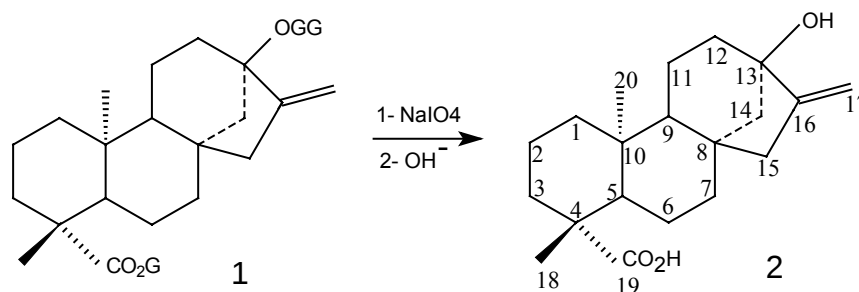
Reagente C: misturar os reagentes A e B na proporção de 4:1 na hora de serem utilizados.

Reagente D: dissolveu-se 25 gramas de moblidato de amônio em 450 mL de água. Adicionou-se 21 mL de ácido sulfúrico concentrado sob agitação. Manter por 24 - 28 horas a 37° C em frasco escuro.

4 Resultados e Discussão

4.1 Obtenção do esteviol (2)

A obtenção do esteviol (ácido *ent*-13-hidroxicaur-16-en-19-óico, 2) se deu através da oxidação do esteviosídeo com periodato de sódio seguido de refluxo da mistura reacional em solução alcalina. Após o refluxo e posterior resfriamento, o pH da solução foi reduzido cuidadosamente e o produto foi extraído com solvente orgânico (OGAWA *et al*,1980).



Esquema 2: Preparação do esteviol

A reação inicial com periodato produz um intermediário, um hexaldeído (Fig. 10).

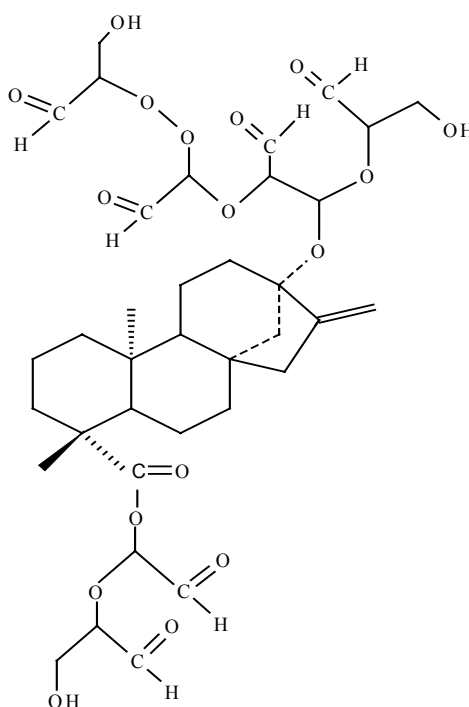


Figura 10: Produto de oxidação do esteviosídeo com periodato de sódio.

O rendimento da reação obtido foi de 36%, abaixo do resultado obtido por Ogawa (75%). Os dados espectrométricos foram compatíveis com os da literatura (OGAWA *et al*, 1980). O seu espectro no I.V. (figura 32, página 69) apresentou uma banda característica de deformação axial de OH do álcool em 3450 cm^{-1} . Apresentou em 2945 e 2841 cm^{-1} as bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 e CH_2 respectivamente. Apresentou em 1701 cm^{-1} a banda de deformação axial da carbonila e a banda referente a deformação axial de carbono dupla carbono em 1650 cm^{-1} .

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (figura 11) do éster metílico mostra em δ 4,97 e 4,81 ppm dois dupletes de integração um, atribuídos aos hidrogênios da dupla ligação, em 3,64 ppm um singleto de integração três, atribuídos aos hidrogênios do grupo metila do grupo éster, em 1,17 ppm um singleto de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 18, em 0,82 um singleto de integração três atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 20. Os hidrogênios restantes aparecem na forma de multiplete na região mais blindada do espectro.

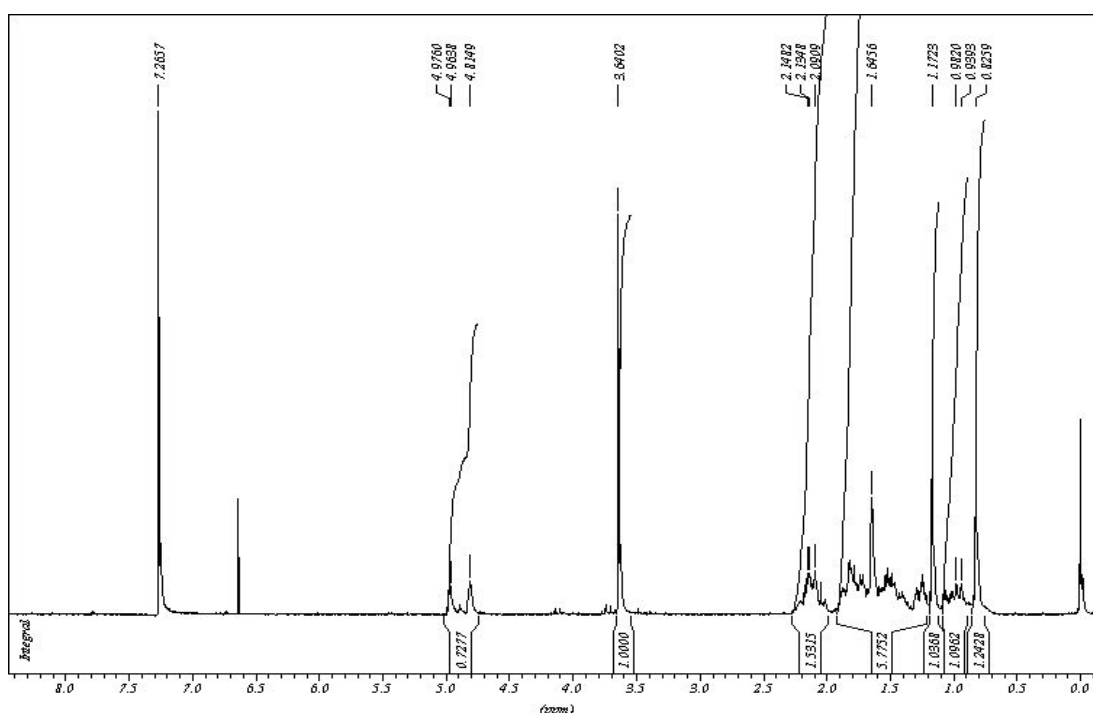


Figura 11: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster do esteviol (2)

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (figura 12) apresenta três sinais atribuídos a carbonos do tipo sp^2 , sendo um carbonílico em 177,9 ppm e dois olefinicos em 156,1 e 102,8ppm. Também mostra dois sinais de carbono do tipo sp^3 ligados a átomo de oxigênio do grupo éster e álcool terciário em 51,1 e 80,2 ppm, respectivamente. Os dados

dos espectros de RMN ^{13}C obtidos para o composto, foram comparados com dados da literatura, os quais confirmam a sua estrutura (tabela 1, página 33).

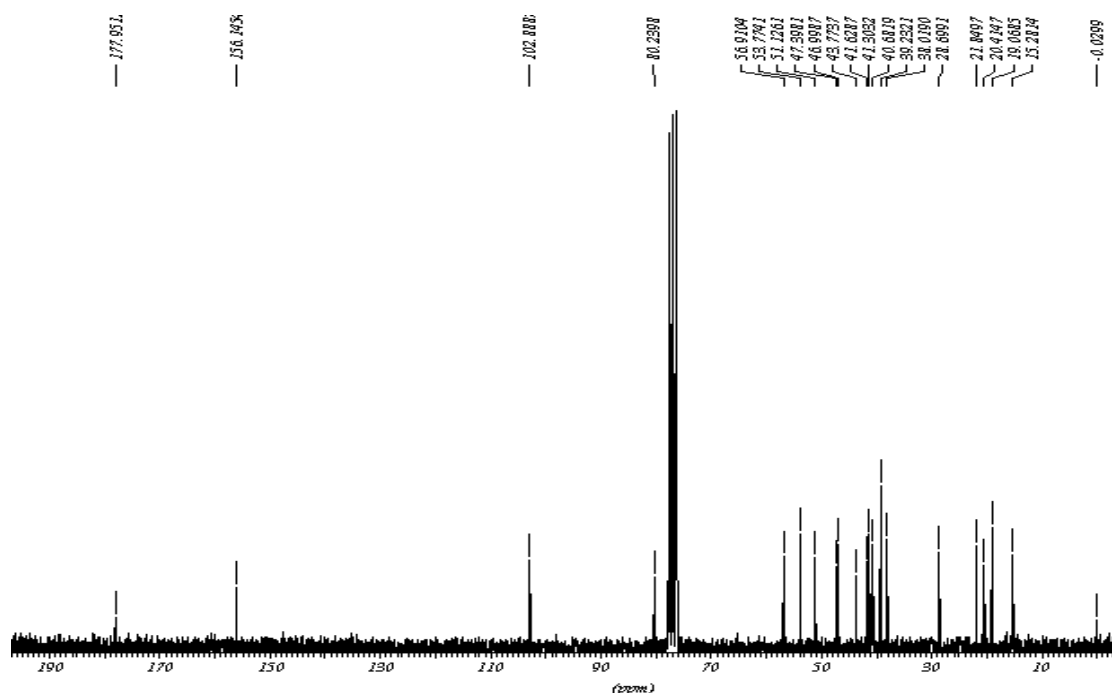
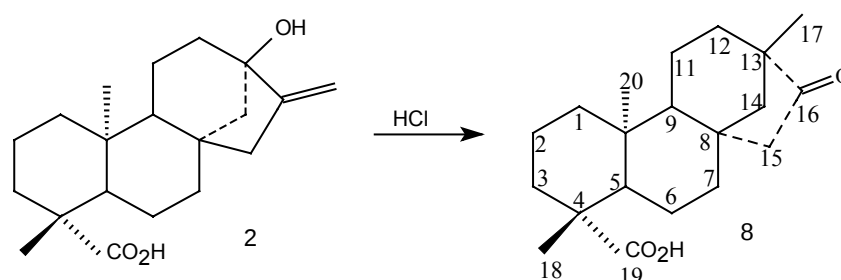


Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do esteviol (2)

O esteviol pode também ser obtido por hidrólise enzimática do esteviosídeo. Neste caso, apesar da obtenção de produto bruto praticamente puro, a reação é muito lenta levando dias para ser completada. Além disso ela é feita em soluções diluídas e, por isso, a quantidade que se pode obter em determinado período de tempo é relativamente pequena.

4.2 Obtenção do isoesteviol (8)

Colocando o esteviol sob refluxo, por uma hora, em presença de ácido clorídrico o esteviol sofre um rearranjo (Wagner-Meerwein), resultando na inversão dos anéis C e D e originando o isoesteviol (ácido *ent*-16-cetobaieran-19-óico, 8) (OLIVEIRA *et al*, 2005).



Esquema 3: Preparação do isoesteviol.

O rendimento da reação obtido neste trabalho foi de 86%, sendo superior aos de literatura (20 a 48%). Este rendimento é justificado pela obtenção do isoesteviol a partir do esteviol já purificado, e não direto do esteviosídeo como é descrito na literatura.

Os dados espectrométricos do produto foram compatíveis com os da literatura (KOROCHKINA *et al*, 2005). O espectro no infravermelho do ácido (figura 51, página 90) apresenta como principal característica as duas bandas de deformação axial da carbonila do ácido e da carbonila cetônica em 1735 e 1695 cm^{-1} respectivamente. Em 2956 e 2918 cm^{-1} aparecem as bandas atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 e CH_2 respectivamente.

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (figura 13) para seu éster metílico, mostra como principal diferença em relação ao esteviol, o surgimento dos sinais respectivos as quatro metilas existentes, em δ 3,63 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do grupo éster, em 2,62 um duplo duplete de integração um atribuídos ao hidrogênios do carbono 15, em 1,19 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 18, em 0,97 ppm singlete de integração três dos hidrogênios da metila do carbono 17, em 0,68 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 20.

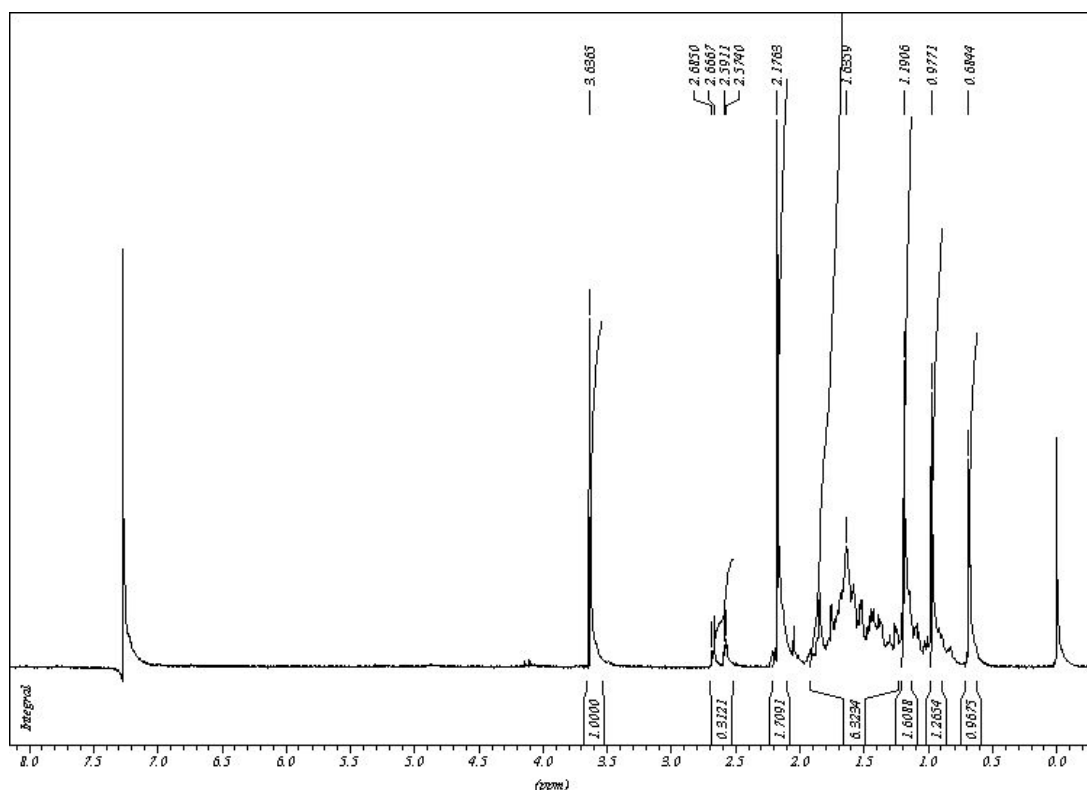
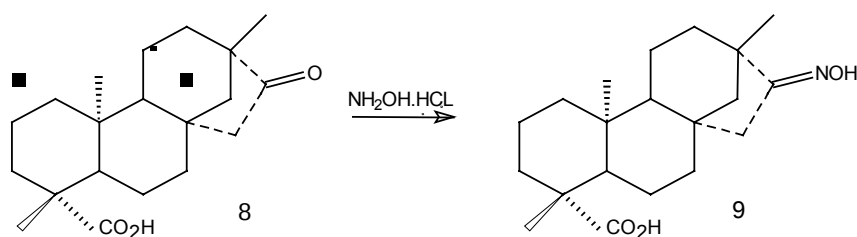


Figura 13: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do isoesteviol (8)

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (figura 53. pagina 92), não se observa os sinais respectivos aos carbonos olefinicos existentes no esteviol, apresenta dois sinais atribuídos a carbonos do tipo sp^2 oxigenados, sendo um cetônico que não aparece no espectro e um carboxílico em 177,8 ppm. Os dados dos espectros de RMN ^{13}C obtidos para o composto, foram comparados com dados da literatura, os quais confirmam a sua estrutura (tabela 1, página 33).

4.3 Obtenção da oxima do isoesteviol (9)

A oxima do isoesteviol foi preparada, colocando o isoesteviol (8) em presença de acetato de sódio e cloridrato de hidroxilamina (ALFONSOV *et al*, 2003). Após recristalização em metanol foi obtido o ácido *ent*-16-hidroximinobaieran-19-óico (9) com rendimento de 74%.



Esquema 4: Preparação da oxima do isoesteviol

Os dados espectrométricos foram compatíveis com os da literatura para este composto (ALFONSOV *et al*, 2003). Seu espectro no infravermelho (figura 14) mostrou, as bandas de deformação axial do C=N em 1668 cm^{-1} , e a banda de deformação axial do N-O em 904 cm^{-1} . Além destes apresenta os sinais de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 e CH_2 , em 2954 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} respectivamente.

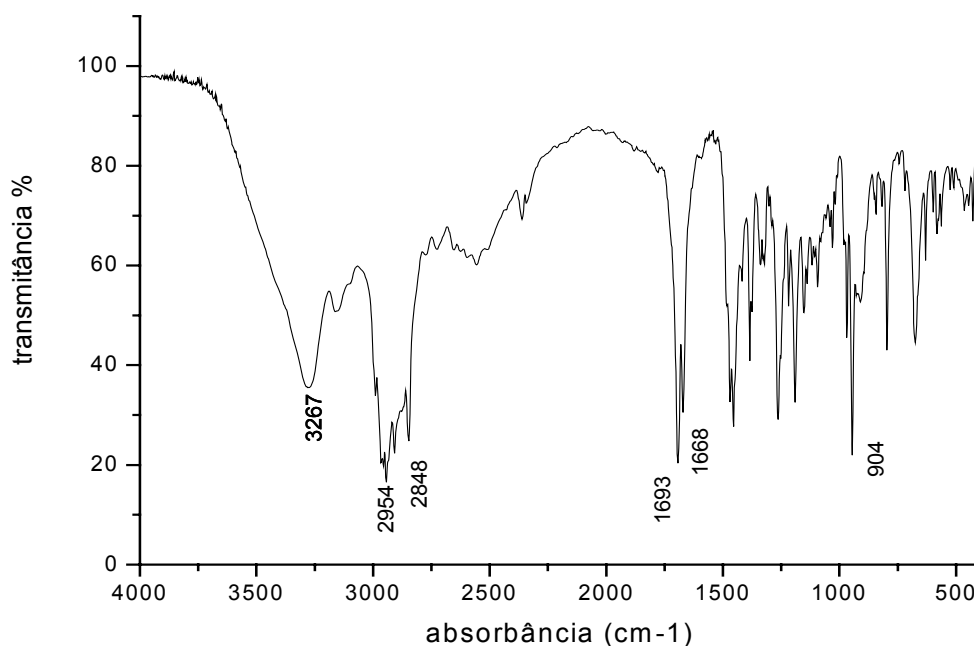


Figura 14: Espectro no IV ácido da oxima do isoesteviol (9)

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (figura 55, página 94) para o seu éster metílico, mostra em δ 3,62 ppm um singlete de integração três, relativos aos hidrogênios da metila do grupo éster, em 2,99 um duplo duplete de integração um atribuídos aos hidrogênios do carbono 15, em 1,17 ppm um singlete de integração três dos hidrogênios da metila do carbono 18, em 1,09 ppm um singlete de integração três dos hidrogênios da metila do carbono 17, em 0,74 ppm um singlete de integração três atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 20.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (figura 56, página 95) do éster, não mostra o sinal do carbono cetônico mas apresenta dois sinais atribuídos a carbonos do tipo sp^2 sendo um carboxílico em 177,9 ppm e em 170,5 ppm o sinal do carbono ligado ao átomo de nitrogênio. Não foram encontrados dados dos espectros de RMN ^{13}C para o composto em literatura. Os dados dos espectros de RMN ^{13}C obtidos para o composto estão na tabela 1, página 33.

Carbono	δC^* 2	δC 2	δC^* 8	δC 8	δC 9
1	40,6	40,6	39,8	39,7	40,8
2	18,9	19,0	18,9	18,9	20,3
3	37,9	37,9	37,3	37,2	36,7
4	43,6	43,7	43,8	43,7	43,7
5	56,8	56,9	57,1	57,0	57,0
6	21,7	21,8	21,7	21,6	21,6
7	41,2	41,3	41,5	41,4	40,8
8	41,5	41,6	48,7	46,6	40,5
9	53,7	53,7	54,8	54,7	56,2
10	39,1	38,0	38,0	37,9	22,0
11	20,3	20,4	20,3	20,6	20,6
12	39,2	39,2	38,0	37,9	37,9
13	80,0	80,2	39,4	39,4	39,4
14	47,3	47,3	54,4	54,2	54,8
15	46,8	46,9	48,5	48,4	30,8
16	155,9	156,1	222,1		170,5
17	107,8	102,8	19,8	19,8	18,8
18	28,5	28,6	28,8	28,8	28,7
19	177,7	177,9	177,7	177,8	177,9
20	15,1	15,2	13,2	13,1	13,1
OMe	51,0	51,1	51,1	51,2	51,1

TABELA 1: DADOS DOS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DOS COMPOSTOS OBTIDOS

δC 2 – ácido *ent*-13 α -hidroxicaur-16-en-19-óico (2);

δC 8 - ácido *ent*-16-cetobaieran-19-óico (8);

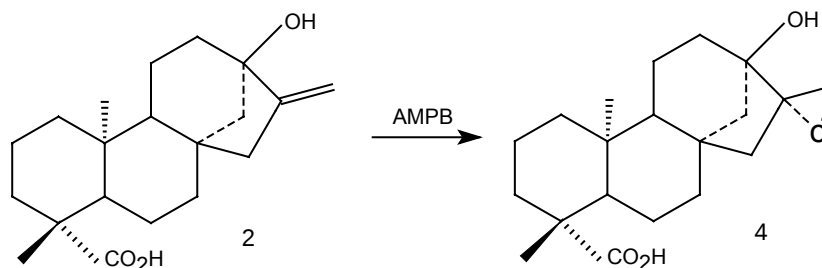
δC 9 - ácido *ent*-16-hidroximinobaieran-19-óico (9);

δC^* - dados da literatura composto - 2 - (HANSON & OLIVEIRA, 1990), 8 - OLIVEIRA *et al*, 1999)

δC - dados deste trabalho.

4.4 Obtenção do 16,17 α -epóxido do esteviol (4)

A obtenção do epóxido do esteviol (ácido *ent*-13-hidroxi-16,17 α -epoxicaur-19-óico, 4) foi feita através de sua reação com ácido *m*-cloroperbenzóico, à temperatura ambiente, por 72 horas (MIZUSHINA *et al*, 2005). Após purificação o produto foi obtido com rendimento de 56%.

Esquema 5: Preparação do 16,17 α -epoxi-esteviol

Os dados espectrométricos foram compatíveis com os da literatura (PEZZUTO *et al*, 1984). O espectro no infravermelho (figura 39, página 76) apresentou uma banda larga em 1232 cm^{-1} , atribuída a deformação axial simétrica do anel do epóxido, em 1739 cm^{-1} a deformação axial da carbonila do ácido. Em 3483 cm^{-1} a deformação axial do grupamento OH, em 2935 e 2866 cm^{-1} as bandas referentes ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 e CH_2 respectivamente.

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (figura 15) do éster metílico mostra em 2,93 e 2,78 ppm dois dupletes de integração um relativo aos hidrogênios do anel epóxido, em 3,65 ppm um singlete de integração três atribuídos aos hidrogênios do metila do grupo éster, em 1,17 ppm um singlete de integração três relativo aos hidrogênios da metila do carbono 18 e em 0,85 ppm um singlete de integração três relativo aos hidrogênios da metila do carbono 20. Os outros hidrogênios aparecem na forma de multiplete na região de campo mais alto, região mais protegida do espectro.

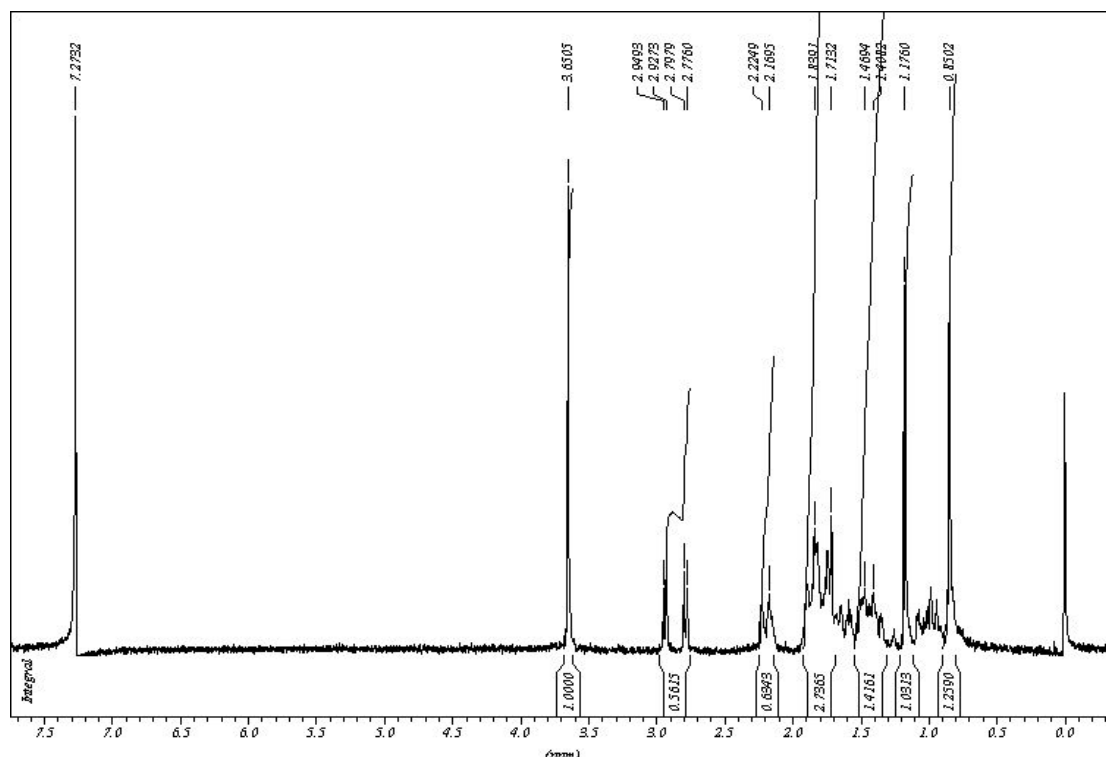


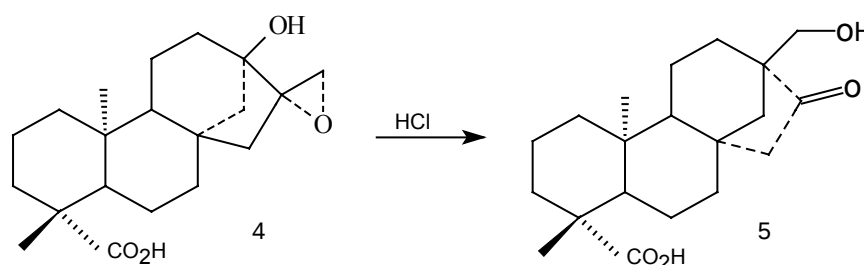
Figura 15: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 16,17 α -epoxi-esteviol (4)

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (figura 39, página 78) do éster metílico apresenta um sinal de carbono sp^2 em $8177,8\text{ ppm}$, atribuído ao carbono carboxílico. Os sinais dos carbonos sp^3 ligados a oxigênio aparecem em $74,7\text{ ppm}$, relativo ao carbono do álcool terciário, em $65,2$ e $48,6\text{ ppm}$ atribuídos aos carbonos do anel epóxido, em $51,1\text{ ppm}$ relativo ao carbono do grupo éster. Os dados dos espectros de RMN ^{13}C obtidos para o

composto, foram comparados com dados da literatura, os quais confirmam a sua estrutura (tabela 2, página 37).

4.5 Obtenção do 17-hidroxiisoesteviol (5)

O 17-hidroxiisoesteviol (ácido *ent*-17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico, 5) foi obtido pela reação do epóxido do esteviol (4) com ácido clorídrico (0,5%) (OLIVEIRA *et al*, 1999). Após purificação o produto foi obtido com rendimento de 44%. A reação envolve uma isomerização (Wagner-Merweein) com inversão dos anéis C e D, semelhante à que ocorre com a conversão do esteviol em isoesteviol.



Esquema 6 : Preparação do 17-hidroxiisoesteviol

Os dados espectrométricos do produto foram compatíveis com os da literatura (OLIVEIRA *et al*, 1999). O espectro no infravermelho (figura 40, página 79) para o ácido *ent*-16-cetobaieran-19-óico, o 17-hidroxi-isoesteviol, apresenta uma banda de deformação axial do grupamento OH em 3450 cm^{-1} , duas bandas de deformação axial da carbonila do ácido e da carbonila cetônica em 1726 e 1701 cm^{-1} . Em 2939 e 2846 cm^{-1} aparecem as bandas atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 e CH_2 respectivamente.

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (figura 16) para o seu éster metílico, mostra como principal diferença em relação ao 16,17 α -epoxiesteviol, o surgimento dos sinais respectivos aos dois dupletes em δ 3,50 e 3,68 ppm, referentes aos hidrogênios do carbono 17, o qual possui a hidroxila. Em 3,63 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do grupo éster, em 1,24 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 18, em 0,79 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 20.

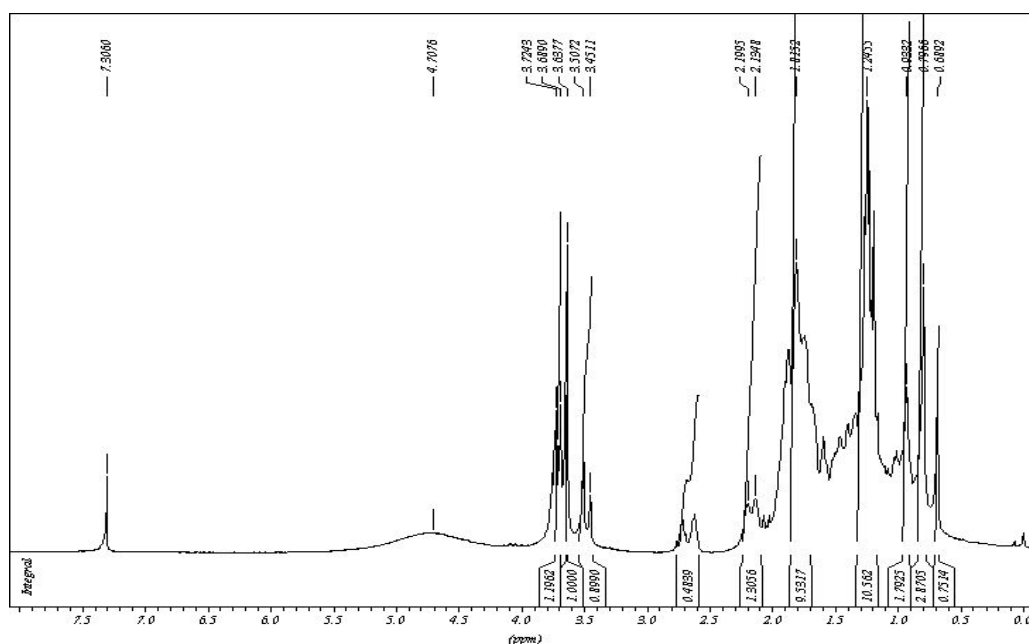


Figura 16: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 17-hidroxiisosteól (5)

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (figura 17), apresenta dois sinais atribuídos a carbonos do tipo sp^2 , sendo um cetônico em δ 215,7 ppm e um carboxílico em 182,5 ppm. Além destes existem os sinais atribuídos aos carbonos do tipo sp^3 ligados ao átomo de oxigênio álcool e grupo éster em 64,5 e 51,1 ppm respectivamente.

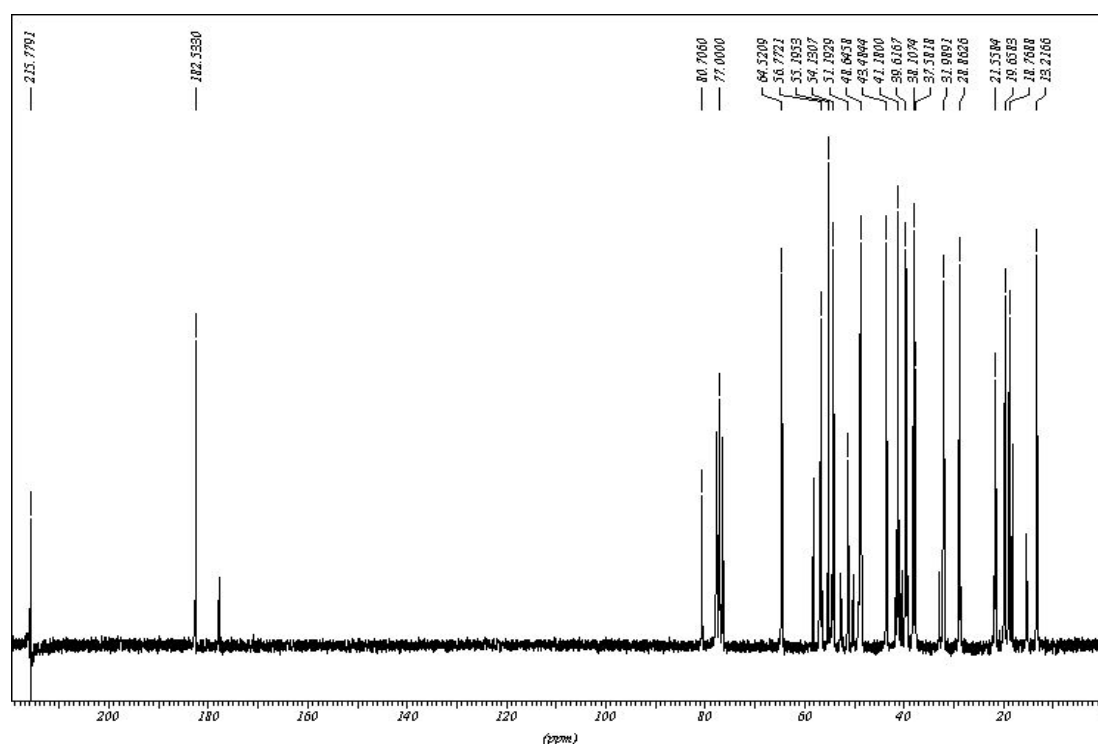


Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 17-hidroxiisosteól (5)

Na obtenção do ácido *ent*-17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico (5), a partir do epóxido (4) observa-se uma alteração do deslocamento químico do C-16 de 48,6 para 215,7 ppm, compatível para carbono cetônico. Também se observa a alteração no deslocamento químico do C-13 de 74,7 para 54,1 ppm. Os dados dos espectros de RMN ^{13}C obtidos para o composto, foram comparados com dados da literatura, os quais confirmam a sua estrutura (tabela 2).

Carbono	$\delta \text{ C}^*$ 2	$\delta \text{ C}$ 2	$\delta \text{ C}^*$ 4	$\delta \text{ C}$ 4	$\delta \text{ C}^*$ 5	$\delta \text{ C}$ 5
1	40,6	40,6	41,1	41,2	40,1	39,6
2	18,9	19,0	18,9	19,0	19,2	18,7
3	37,9	37,9	37,9	37,9	38,1	37,5
4	43,6	43,7	43,6	43,7	44,0	43,4
5	56,8	56,9	56,8	56,8	57,3	56,7
6	21,7	21,8	21,7	21,8	22,0	21,5
7	41,2	41,3	34,7	34,7	41,7	41,1
8	41,5	41,6	41,6	41,5	40,1	39,6
9	53,7	53,7	53,8	53,7	55,8	55,1
10	39,1	38,0	39,4	39,2	38,7	38,1
11	20,3	20,4	19,5	19,5	20,2	19,6
12	39,2	39,2	40,6	40,7	32,5	31,9
13	80,0	80,2	74,9	74,7	54,5	54,1
14	47,3	47,3	48,7	46,4	49,4	48,6
15	46,8	46,9	45,6	45,7	49,3	48,6
16	155,9	156,1	48,7	48,6	223,7	215,7
17	107,8	102,8	65,3	65,2	65,5	64,5
18	28,5	28,6	28,8	28,6	29,3	28,9
19	177,7	177,9	183,	177,8	183,3	182,5
20	15,1	15,2	15,7	15,5	13,7	13,2
OMe	51,0	51,1	51,1	51,1	51,0	51,1

Tabela 2: Dados dos espectros de RMN ^{13}C dos compostos obtidos

$\delta \text{ C } 2$ – ácido *ent*-13 α -hidroxicaur-16-en-19-óico (2);

$\delta \text{ C } 4$ - ácido *ent*-13-hidroxi-16,17 α -epoxicaur-19-óico (4);

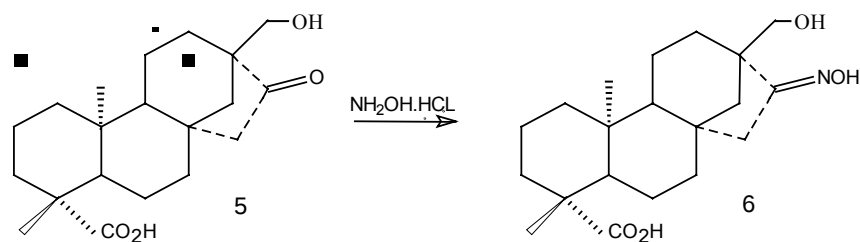
$\delta \text{ C } 5$ - ácido *ent*-17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico (5);

$\delta \text{ C}^*$ - dados da literatura composto - 2 - (HANSON & OLIVEIRA, 1990), 4, 5 - OLIVEIRA *et al*, 1999)

$\delta \text{ C}$ - dados deste trabalho.

4.6 Obtenção da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)

A oxima do 17-hidroxiisoesteviol (ácido *ent*-17-hidroxi-16-hidroxiiminobaieran-19-óico, 6) foi preparada através de sua reação com cloridrato de hidroxilamina na presença de acetato de sódio (ALFONSOV *et al*, 2003). O rendimento da reação foi de 74% e informações sobre este composto não foram encontrados na literatura.



Esquema 7: Preparação da oxima do 17-hidroxiisoesteviol

O seu espectro no infravermelho (figura 18) mostrou a banda de deformação axial do C=N em 1643 cm^{-1} e a banda de deformação axial do N-O em 908 cm^{-1} . Além destes apresenta os sinais de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 e CH_2 , em 2941 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} respectivamente.

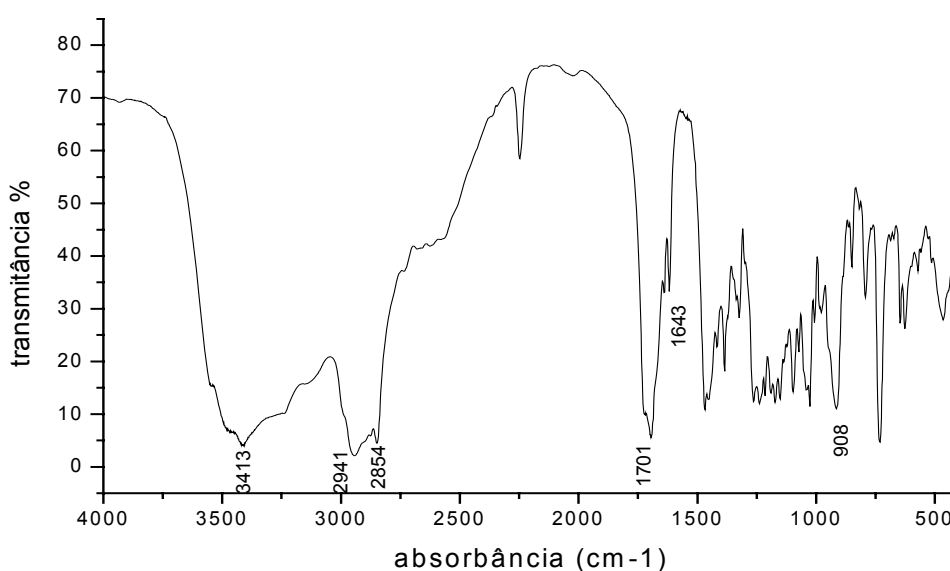


Figura 18: Espectro no IV ácido da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)

O espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) (figura 44, página 83) para o seu éster metílico, mostra em δ 3,62 ppm um singlete de integração três, relativos aos hidrogênios da metila do grupo éster, em 3,64 e 3,70 ppm dois dupletes referentes aos hidrogênios do carbono 17, o qual contém a hidroxila. Em 1,23 ppm um singlete de integração três dos hidrogênios da metila do carbono 18, em 0,86 ppm um singlete de integração três atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 20.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) (figura 19), não se observa o sinal do carbono cetônico existente no 17-hidroxiisoesteviol em 215,7 ppm, e sim dois sinais atribuídos a carbonos do tipo sp^2 , sendo um carboxílico em 177,9 ppm e em 170,4 ppm o

sinal do carbono ligado ao átomo de nitrogênio. Os dados do espectro RMN ^{13}C obtidos para o composto, pode ser comparado com os dados do 17-hidroxiisoesteviol (tabela 3).

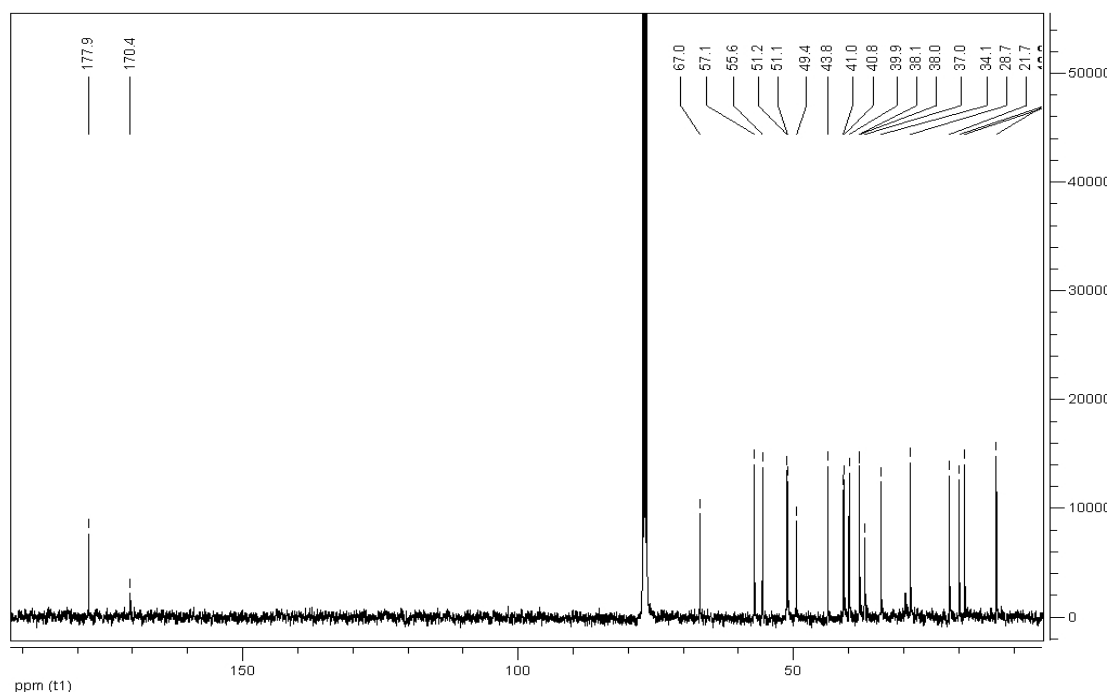


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)

O seu espectro RMN ^{13}C – DEPT-135 mostrou a presença de tres carbonos metílicos, dez metilênicos e dois metínicos. (figura 20)

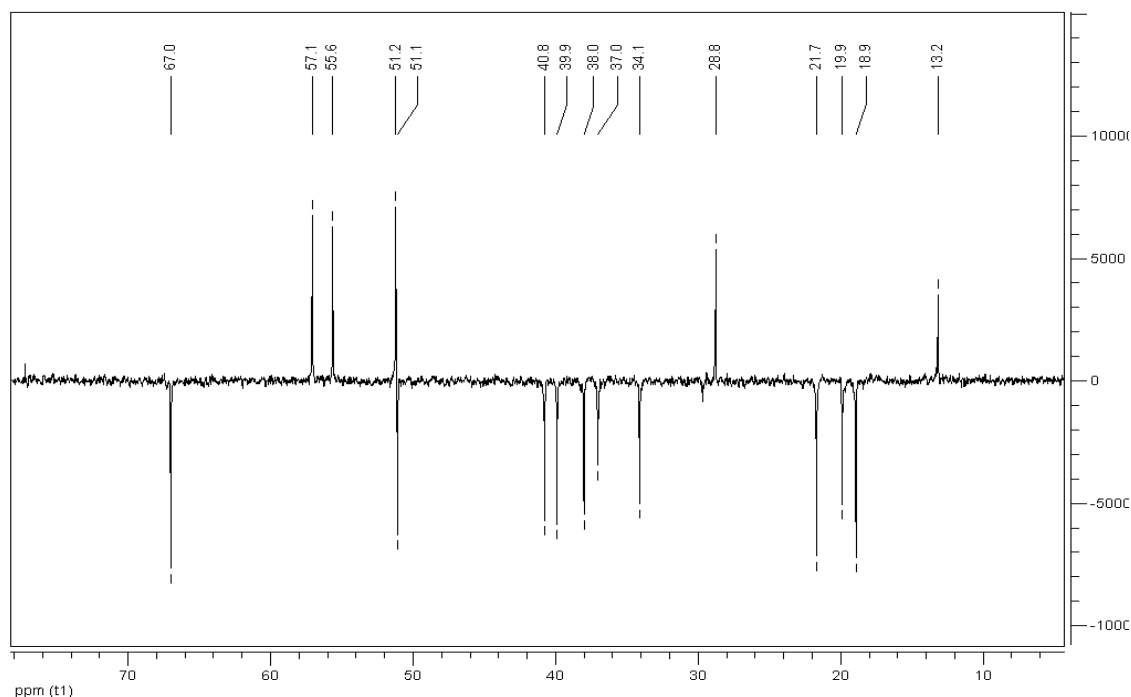
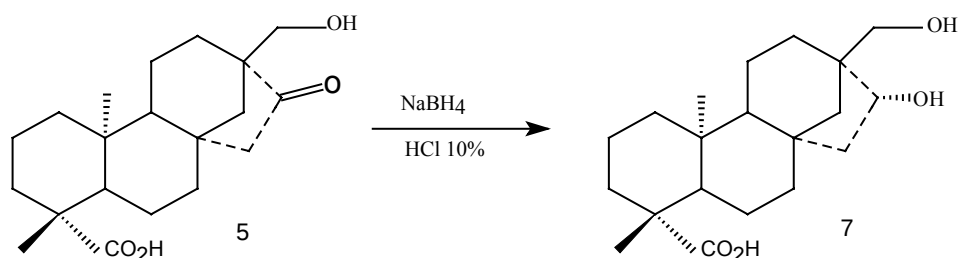


Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT-135 (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)

4.7 Obtenção do ácido *ent*-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7)

O 17-hidroxiisoesteviol (5) foi reduzido com boroidreto de sódio, produzindo o diol correspondente (7) (OLIVEIRA *et al*, 2005). O rendimento da reação foi de 68% e não foram encontradas informações sobre este composto na literatura.



Esquema 8: Preparação do ácido *ent*-16,17-diidroxiabaierano-19-óico

O espectro no infravermelho (figura 47, página 86) para o ácido *ent*-16,17-diidroxiabaierano-19-óico, apresenta uma banda de deformação axial de hidroxila em 3547 e 3466 cm⁻¹, da carbonila em 1799 cm⁻¹. Em 2943 e 2844 cm⁻¹ aparecem as bandas atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupos CH₃ e CH₂ respectivamente.

O espectro no RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) (figura 21) do éster metílico mostra como principal diferença em relação ao 17-hidroxi-isoesteviol, além dos sinais referentes aos dois dupletes dos hidrogênios do carbono 17 (3,36 e 3,44 ppm), o surgimento de um duplo dupletes em 4,15 ppm, referentes ao hidrogênio do carbono 16, o qual possui uma hidroxila. Em 1,18 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 18, em 0,87 ppm um singlete de integração três, atribuídos aos hidrogênios da metila do carbono 20.

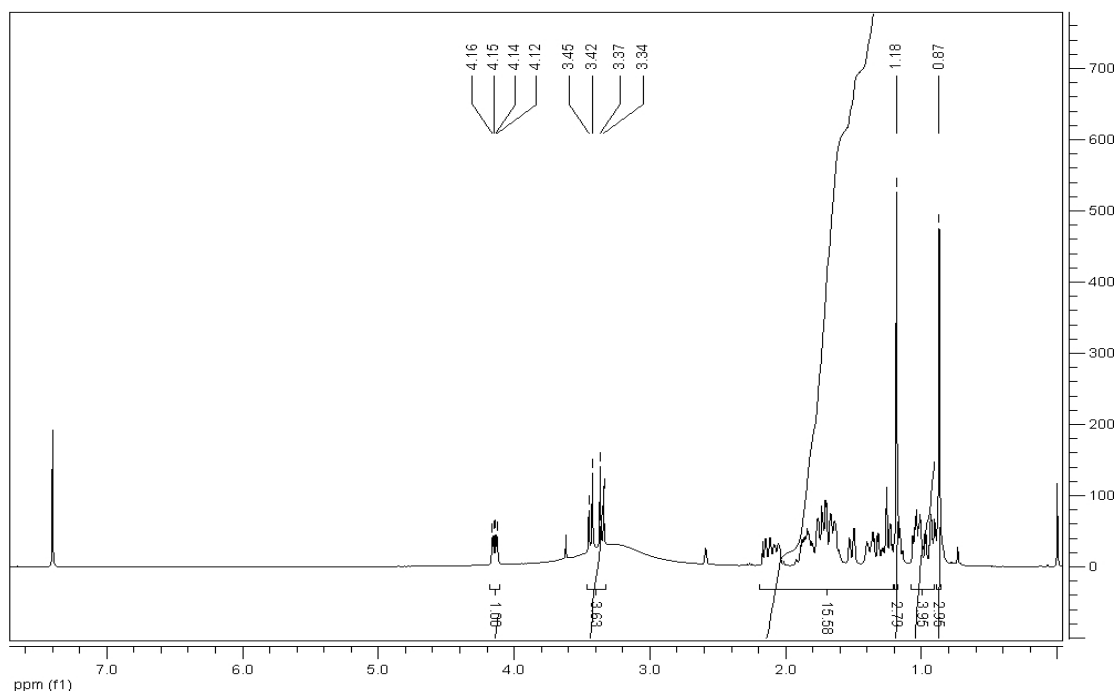


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido *ent*-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7)

No espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (figura 22), não se observa o sinal do carbono do tipo sp^2 , cetônico em δ 215,7 ppm, existente no 17-hidroxi-isoesteviol, apenas um carboxílico em 179,7 ppm. Além destes existem os sinais atribuídos aos carbonos do tipo sp^3 ligados ao átomo de oxigênio em 77,3 e 69,8 ppm dos carbonos 16, 17 respectivamente. Na obtenção do ácido *ent*-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7) a partir do 17-hidroxiisoesteviol (5), se observa o deslocamento do sinal do carbono 16 em 215,7 ppm, para um campo mais baixo 77,3 ppm conforme dados da tabela 3, página 43).

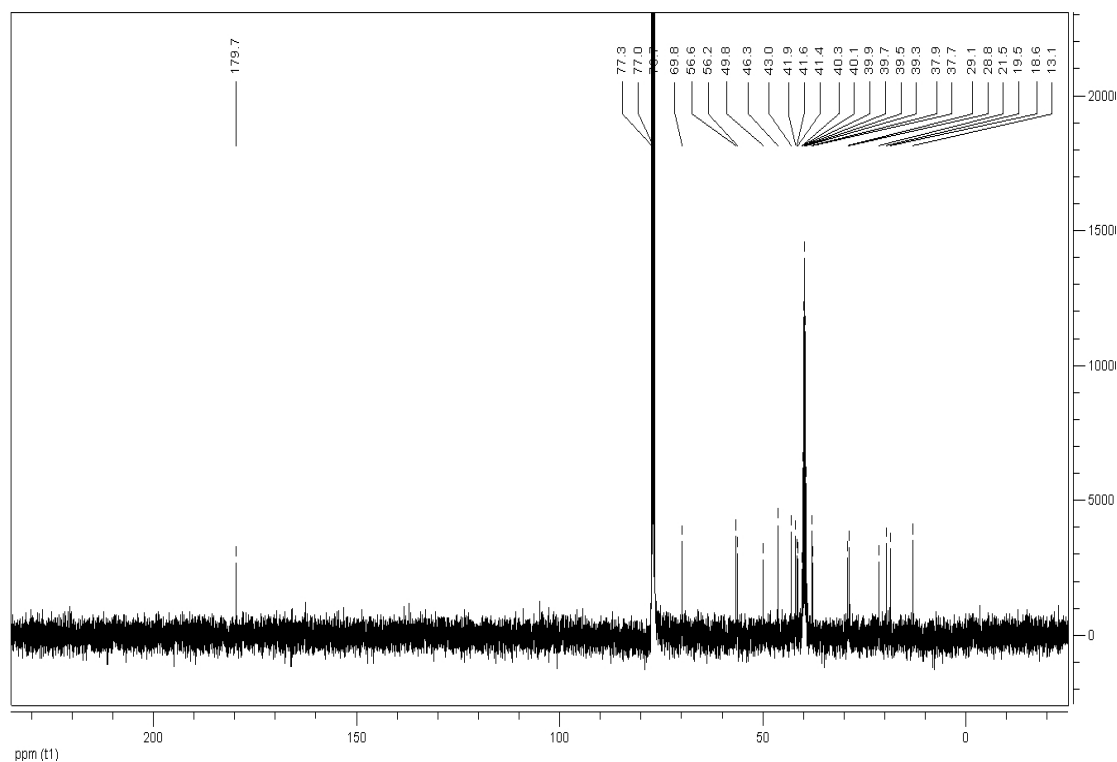


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido *ent*-16,17-diidrobaieran-19-óico (7)

O seu espectro RMN ^{13}C – DEPT-135 mostrou a presença de dois carbonos metílicos, nove metilênicos e tres metínicos. (figura 23)

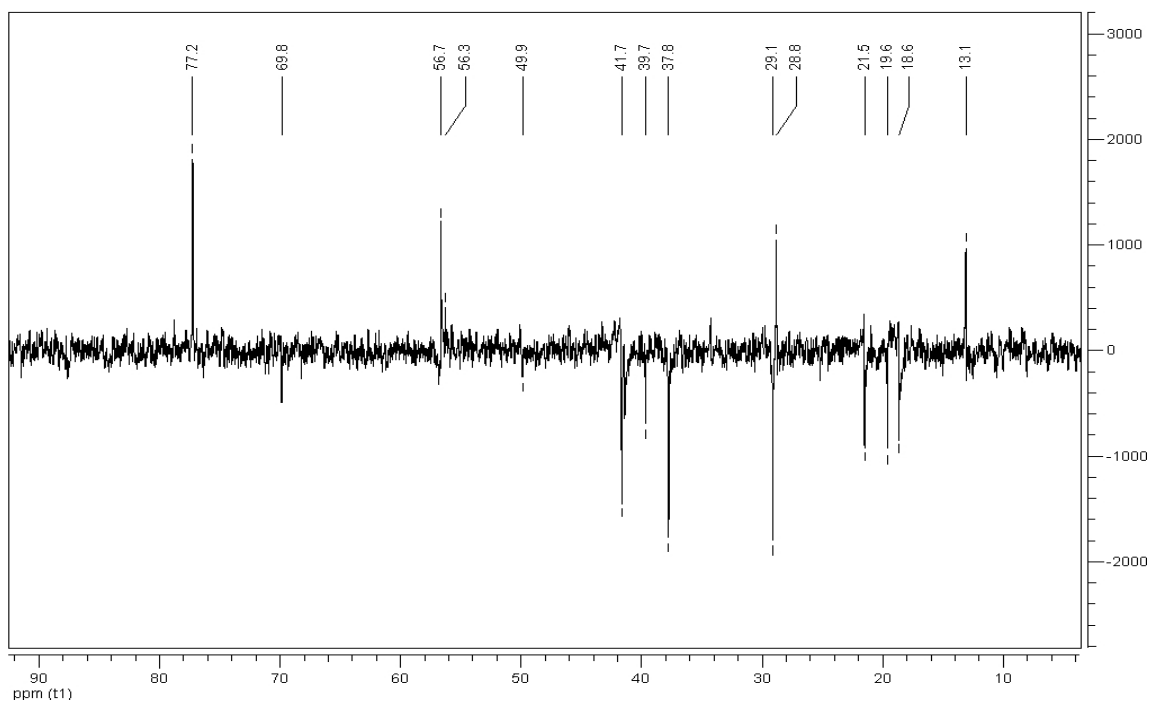


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT-135 (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido *ent*-16,17-diidrobaieran-19-óico (7)

Carbono	δC^* 5	δC 5	δC 6	δC 7
1	40,1	39,6	40,8	39,4
2	19,2	18,7	19,9	16,6
3	38,1	37,5	38,0	37,7
4	44,0	43,4	43,8	43,0
5	57,3	56,7	57,1	56,2
6	22,0	21,5	18,9	21,5
7	41,7	41,1	37,0	41,7
8	40,1	39,6	49,4	41,6
9	55,8	55,1	55,6	56,6
10	38,7	38,1	41,0	37,9
11	20,2	19,6	21,7	19,6
12	32,5	31,9	39,9	29,1
13	54,5	54,1	38,1	41,9
14	49,4	48,6	51,1	46,3
15	49,3	48,6	34,1	49,8
16	223,7	215,7	170,4	77,3
17	65,5	64,5	67,0	69,8
18	29,3	28,9	28,7	28,8
19	183,3	182,5	177,9	179,7
20	13,7	13,2	13,2	13,1
OMe	51,0	51,1	51,2	

Tabela 3:Dados dos espectros de RMN ^{13}C dos compostos obtidos

δC 5 - ácido *ent*-17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico (5);

δC 6 - ácido *ent*-17-hidroxi-16-hidroximinobaieran-19-óico (6);

δC 7 - ácido *ent*-16,17-diidroxibaieran-19-óico (7);

δC^* - dados da literatura composto - 5 - OLIVEIRA *et al*, 1999)

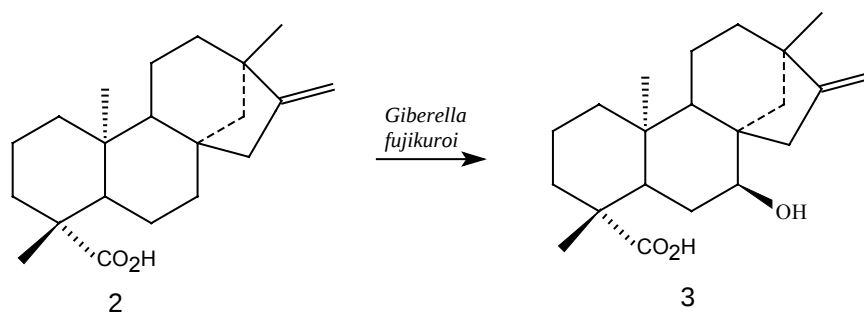
δC - dados deste trabalho.

4.8 Biotransformações

Dando prosseguimento aos objetivos de nosso trabalho, a seguir descrevemos a nossa alternativa à síntese química, no sentido de obter um intermediário na síntese de giberelinas, tentando, no decorrer do processo, otimizar o método, usando algumas variáveis para obter um melhor rendimento na biotransformação.

4.8.1 Obtenção do 7-hidroxiesteviol (3)

O ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicaur-16-en-19-óico (3), foi obtido através da biotransformação do esteviol, pela *G. fujikuroi*. Obteve-se um rendimento entre 10 e 16%.



Esquema 9: Preparação do 7-hidroxiesteviol

Os dados espectrométricos do produto foram compatíveis com os da literatura (HANSON & OLIVEIRA, 1990). O seu espectro no infravermelho (figura 24) apresentou uma banda característica de deformação axial da OH de álcool, em 3433 cm^{-1} , e em 2953 cm^{-1} e 2879 cm^{-1} as bandas referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos CH_3 e CH_2 respectivamente. Em 1699 cm^{-1} foi observada a banda referente ao grupo carbonila do ácido.

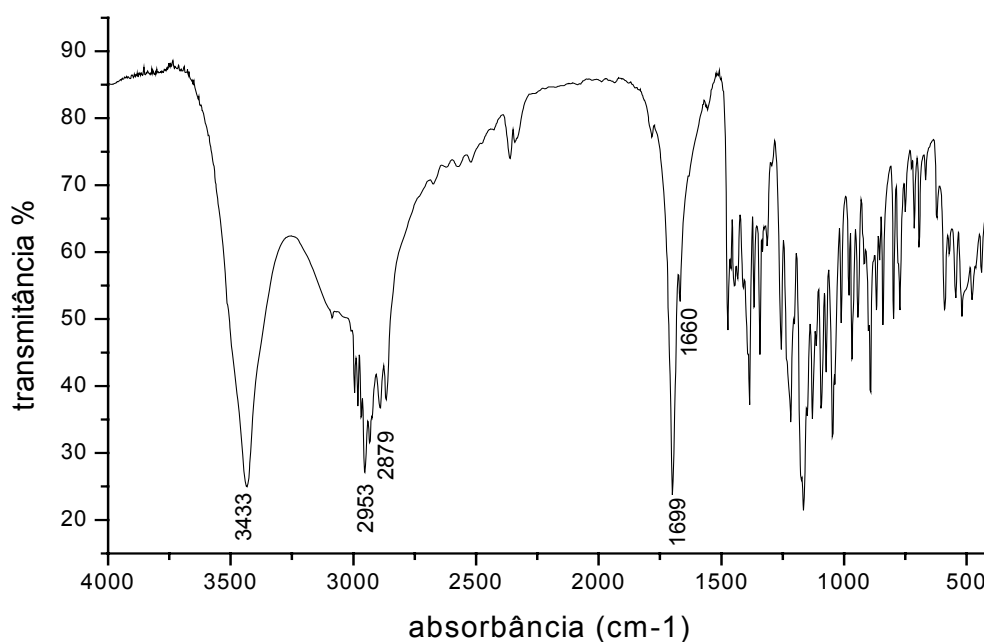


Figura 24: Espectro no IV do ácido 7-hidroxiesteviol (3)

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 – MeOD) (figura 25) para o seu éster metílico, mostra em δ 5,00 e 4,88 ppm dois dupletes de integração um cada, atribuídos aos hidrogênios olefinicos, em 3,65 ppm um singlete de integração quatro, atribuídos aos hidrogênios da metila do grupo éster e do hidrogênio do carbono 7, onde ocorreu a hidroxilação, em 1,17 ppm um singlete de integração três, atribuído aos hidrogênios da

metila do carbono 18, em 0,83 um singlete de integração três referente aos hidrogênios da metila do carbono 20.

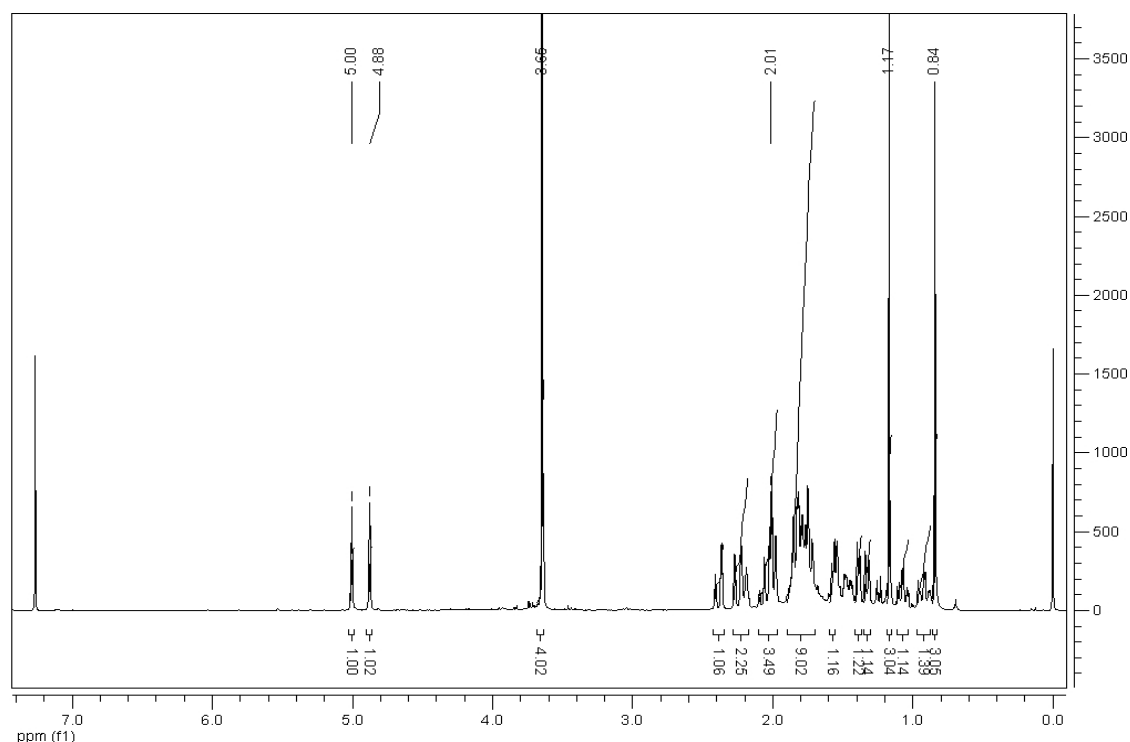


Figura 25: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (figura 26) apresenta 3 sinais atribuídos a carbonos do tipo sp^2 sendo um carboxílico em 178,0 ppm e dois olefinicos em 155,2 e 103,4 ppm, também mostra 2 sinais de carbono do tipo sp^3 ligados a oxigênio em 80,1, e 51,1 ppm. Comparando-se os deslocamentos químicos dos carbonos no espectro de RMN ^{13}C , do ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicaurenóico (3), observa-se a hidroxilação ocorrida no C-7 através do surgimento de um sinal de carbono oxigenado em δ 77,6 ppm no espectro de DEPT-135, sendo que este carbono se apresentava em um campo mais alto 41,3 ppm no esteviol. Os carbonos vizinhos, C-6 e C-8, sofreram deslocamento para campo mais baixo (tabela 4, página 47).

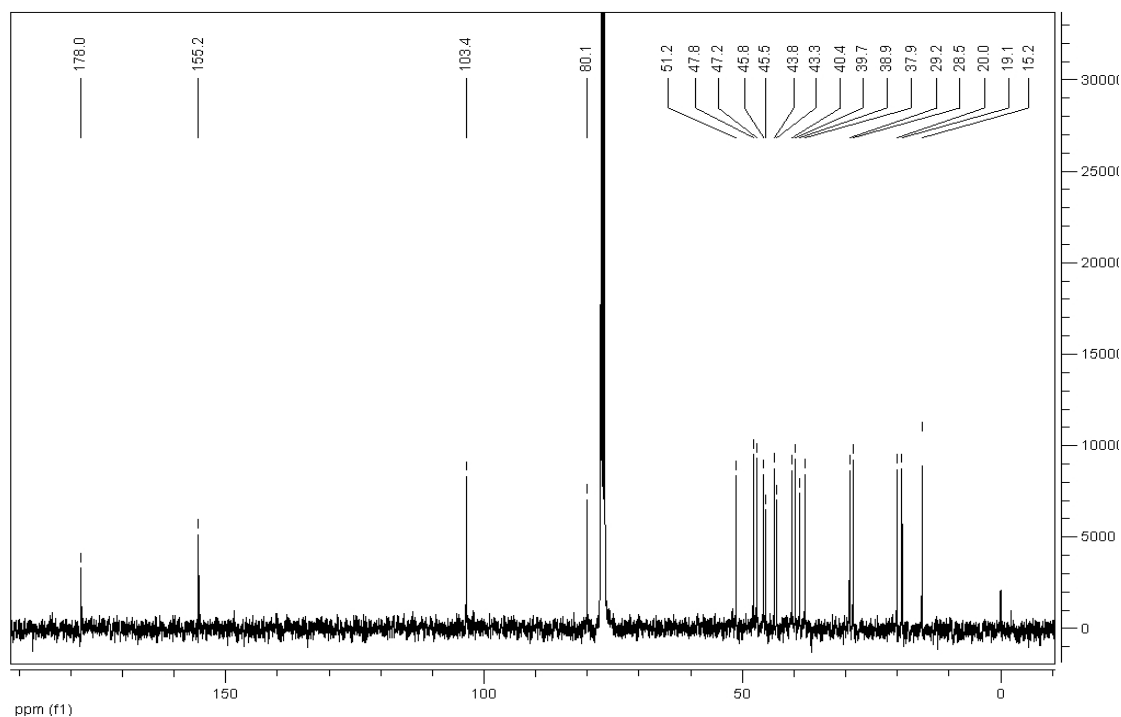


Figura 26: Espectro RMN ^{13}C (100MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)

No espectro RMN ^{13}C – DEPT-135 (figura 27) observamos a presença de três sinais de carbonos metílicos, nove metilênicos e três carbonos metínicos. O sinal em 76,6 mostra a hidroxilação ocorrida, sendo que este sinal não aparece no espectro de ^{13}C RMN por aparecer sobreposto ao sinal do solvente.

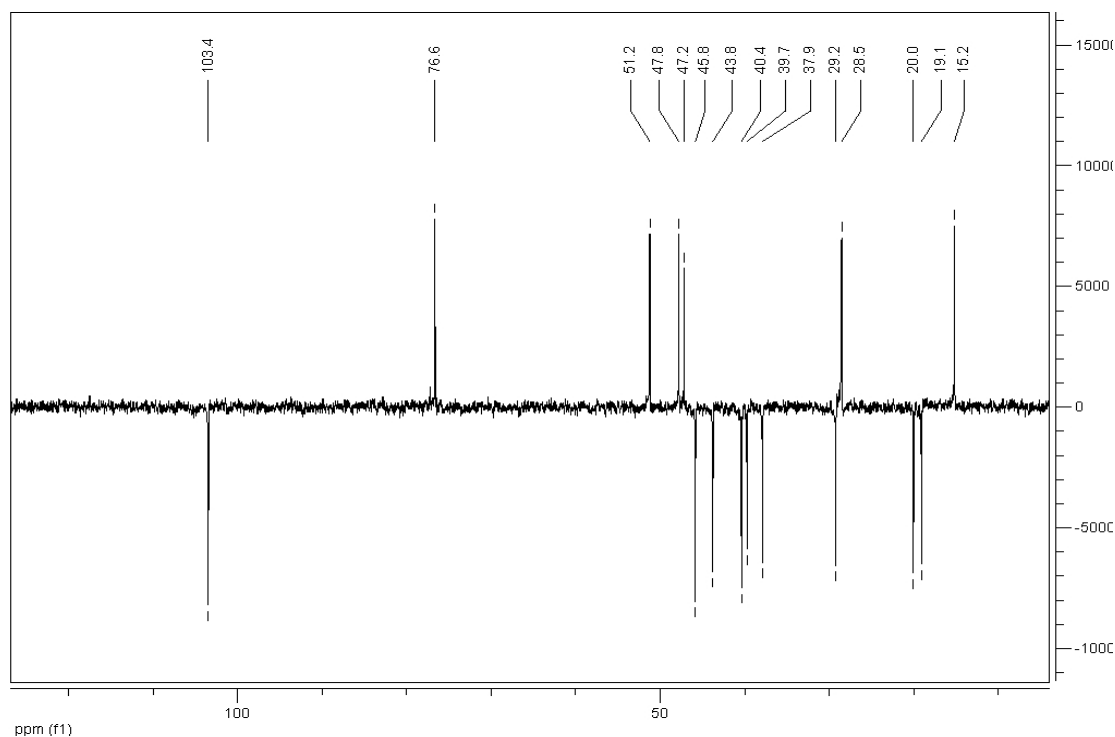


Figura 27: Espectro RMN ^{13}C -DEPT-135 (100MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)

Carbono	δC^* 2	δC 2	δC^* 3	δC 3
1	40,6	40,6	40,2	40,4
2	18,9	19,0	18,9	19,1
3	37,9	37,9	37,7	37,9
4	43,6	43,7	43,2	43,3
5	56,8	56,9	47,6	47,8
6	21,7	21,8	28,9	29,2
7	41,2	41,3	76,1	76,6
8	41,5	41,6	45,3	45,8
9	53,7	53,7	46,9	47,2
10	39,1	38,0	38,7	38,7
11	20,3	20,4	19,8	20,0
12	39,2	39,2	39,5	39,7
13	80,0	80,2	79,6	80,1
14	47,3	47,3	45,2	45,5
15	46,8	46,9	43,6	43,8
16	155,9	156,1	156,0	155,2
17	107,8	102,8	103,0	103,4
18	28,5	28,6	28,2	28,5
19	177,7	177,9	178,0	178,0
20	15,1	15,2	15,0	15,2
OMe	51,0	51,1	51,0	51,2

Tabela 4: Dados dos espectros de RMN ^{13}C dos compostos obtidos

δC 2 – ácido *ent*-13 α -hidroxicaur-16-en-19-óico (2);

δC 3 - ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicaur-16-en-19-óico (3);

δC^* - dados da literatura composto - 2 - (HANSON & OLIVEIRA, 1990), 3 - OLIVEIRA *et al*, 1999)

δC - dados deste trabalho.

4.8.2 Análise quantitativa do 7-hidroxiesteviol

A análise quantitativa do ácido *ent*-7 α ,13-dihidroxicaurenóico foi feita através de CLAE pelo método de calibração externa. A purificação da amostra foi realizada através de extração em fase sólida.

4.8.3 Calibração externa do 7-hidroxiesteviol

O ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicaurenóico, cromatograficamente puro, foi dissolvido em metanol e acetonitrila (40:60) e diluído até as concentrações finais de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 15,625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cada solução foi injetada 3 vezes e os resultados utilizados para construção da curva de calibração ($R^2=0,9999555$) (figura 28).

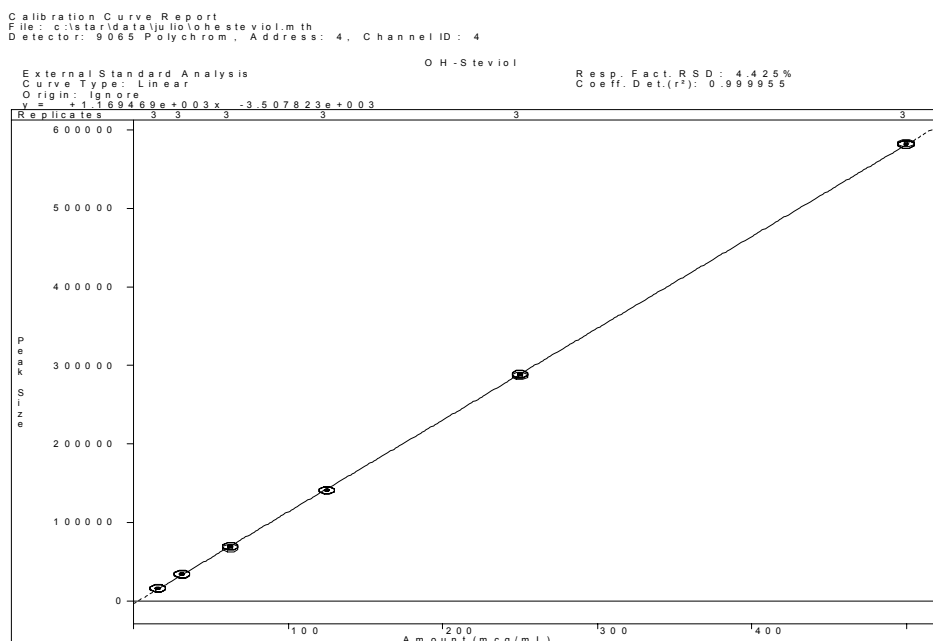


Figura 28: Curva de calibração para o 7-hidroxiesteviol

4.8.4 Influência da temperatura na produção do 7-hidroxiesteviol

A atividade enzimática depende de vários fatores. Um dos mais importantes é a temperatura. Por isso foram feitos experimentos para determinar a temperatura ótima de obtenção do 7-hidroxiesteviol.

Para as fermentações em escala analítica todos os experimentos foram feitos em triplicata. Os fungos foram cultivados por 48 horas em quatro erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura (ICI 10%), em pH 4,5, sendo um frasco usado como controle. Após 48 horas foram adicionados, a cada frasco, 10 mg de esteviol previamente solubilizado em 1 mL de etanol, exceto o frasco controle, e mantidos sob agitação por mais 48 horas. Em seguida o conteúdo de cada frasco foi filtrado e extraído por 3 vezes com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Após centrifugação as amostras foram analisadas por CLAE. Este procedimento foi repetido por três vezes, variando a temperatura durante o processo de biotransformação. Para se observar a influência da temperatura na quantificação do ácido ent-7a,13-diidroxicaurenóico, os experimentos descritos acima foram realizados nas temperaturas de 26°, 28° e 30° C. Os resultados estão resumidos no gráfico 1.

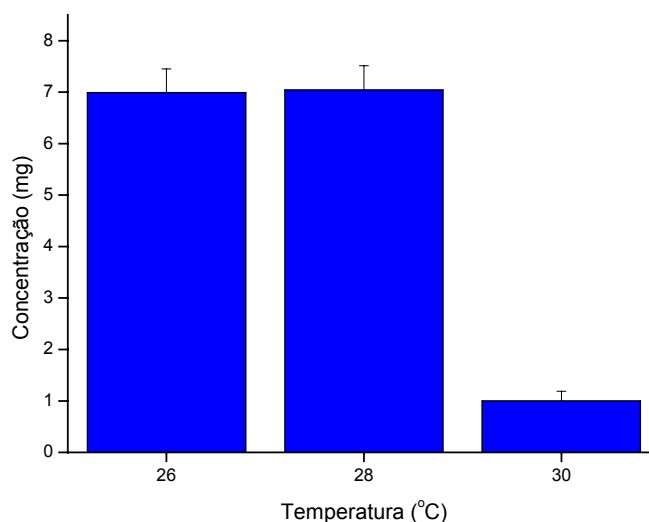


Gráfico 1: Influência da temperatura na produção do 7-hidroxi-esteviol (média de três experimentos; mg/50 mL de meio)

Os resultados em relação a variação de temperatura (gráfico 1), indicaram que o melhor rendimento ocorreu na temperatura de 28° C, pouco superior em relação a temperatura de 26° C e bastante superior quando comparado a temperatura de 30° C. Não foram encontrados dados de literatura informando sobre a otimização da produção do ácido ent-7 α ,13-diidroxicaurenóico em relação à temperatura.

4.8.5 Influência da utilização de lipossomas na produção de 7-hidroxiesteviol

Os primeiros experimentos de obtenção do 7-hidroxiesteviol mostraram rendimento muito baixo. Uma das justificativas para isto seria a sua baixa solubilidade.

A utilização de lipossomas teve como objetivo verificar se a solubilidade influencia no rendimento da biotransformação do esteviol em ácido ent-7 α ,13-diidroxicaurenóico. A hipótese era a de que, na forma de lipossomas, o esteviol pudesse se dispersar melhor no meio de cultura e, dessa forma, facilitar sua penetração nas células do fungo. Não foram encontrados dados de literatura que informem sobre a utilização de lipossomas na biotransformação do esteviol.

Os meios de cultura foram preparados da mesma forma descrita no item , com a diferença na hora de adicionar o substrato, o esteviol, ao meio de cultura. Desta maneira foram utilizados oito erlenmeyers rotulados GC, G1, G2 e G3, para os frascos onde o esteviol foi adicionado ao meio solubilizado em 1 ml de etanol e LC, L1, L2 e L3, para os frascos onde o esteviol foi adicionado ao meio na forma de “lipossomas”, lembrando que

aos frascos GC e LC foram utilizados como controle e a eles não foi adicionado esteviol. Os experimentos foram realizados a uma temperatura de 28° C e pH 4,5. As fases orgânicas foram concentradas em evaporador rotatório e analisadas por CLAE. Os resultados estão demonstrados no gráfico 2.

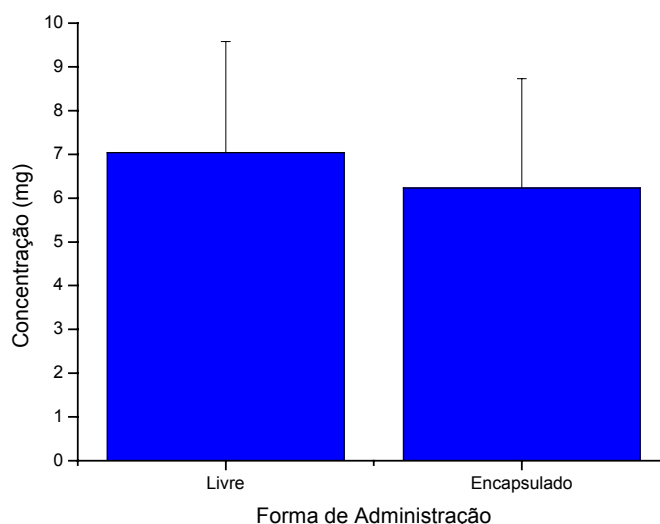


Gráfico 2: Influência da utilização de lipossomas na produção do 7-hidroxiesteviol.

(n=3; mg/50ml de meio)

De acordo com os resultados (gráfico 2), observa-se que ocorreu a transformação do esteviol encapsulado em ácido *ent-7* α ,13-diidroxicaurenóico. A diferença no rendimento para a reação com esteviol não encapsulado, entretanto, não foi significativa. Este resultado mostra que o baixo rendimento da reação não se deve à dificuldade de dispersão do substrato no meio de cultivo mas sim à baixa atividade da monooxigenase do fungo responsável pela reação. O resultado mostra também que a penetração do esteviol encapsulado foi tão boa quanto à do esteviol não encapsulado.

4.8.6 Cinética de produção do 7-hidroxiesteviol

Com objetivo de avaliar a formação do 7-hidroxiesteviol em função do tempo, o experimento de biotransformação foi realizado em vários frascos preparados pela maneira descrita no item 9.4. A intervalos de 24 horas, até no máximo 120 horas, um frasco foi removido e seu conteúdo analisado por CLAE. Os resultados estão resumidos no gráfico 3.

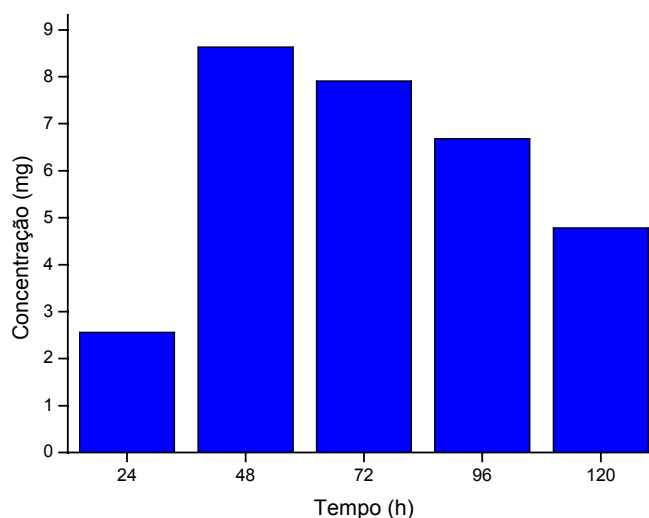


Gráfico 3: Cinética de produção 7-hidroxiesteviol

O máximo de produção ocorre entre 48 horas e 72 horas, sendo que com 24 horas já se constata a presença do composto no meio. Após este tempo se observa um decréscimo na quantidade, provavelmente havendo o consumo do metabólito formado, dando sequência à rota metabólica para a formação dos compostos subsequentes (GAs).

Uma das etapas da biossíntese de GA₃ (Esquema 1, página 18) inclui a hidroxilação do ácido caurenóico em C-7. Mecanismo semelhante ocorre com o esteviol quando é colocado em presença do fungo *Giberella fugikuroi*. Esta inserção do oxigênio acontece através de monooxigenases, promovido pelo Citocromo P-450. Em termos gerais, o xenobiótico entra no sítio ativo em que se encontra a oxigenase, a redutase transfere um elétron do ferro hemático ou porfirínico, reduzindo-o do nível (III) a (II), a redução abre um sítio ativo de O₂, o O₂ entra em seu sítio ativo e oxida o xenobiótico que está na superfície da enzima transferindo-lhe um dos átomos de oxigênio.

Não foram encontrados dados de literatura para comparar os dados da determinação da cinética da biotransformação do esteviol.

4.9 Teste do hipocótilo

O teste do hipocótilo é um bioensaio utilizado para testar atividade reguladora de crescimento vegetal. Ele se baseia na comparação do comprimento do hipocótilo de sementes de alface germinadas em água destilada na ausência (controle) e na presença das substâncias a serem testadas (VILLALOBOS, 1994). Para validar o bioensaio e para

comparação usualmente também se utiliza soluções de ácido giberélico (testemunha). O hipocótilo é parte da planta que fica entre as folhas e a radícula (Fig. 9, página 14)

Prepararam-se soluções-estoque na concentração de 1000 mg.mL^{-1} , em acetona, para o GA_3 , e etanol, para os demais compostos. As diluições foram feitas em água destilada para atingir as concentrações de 10^{-3} , 10^{-1} e $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos foram coletados, demonstrados graficamente e interpretados.

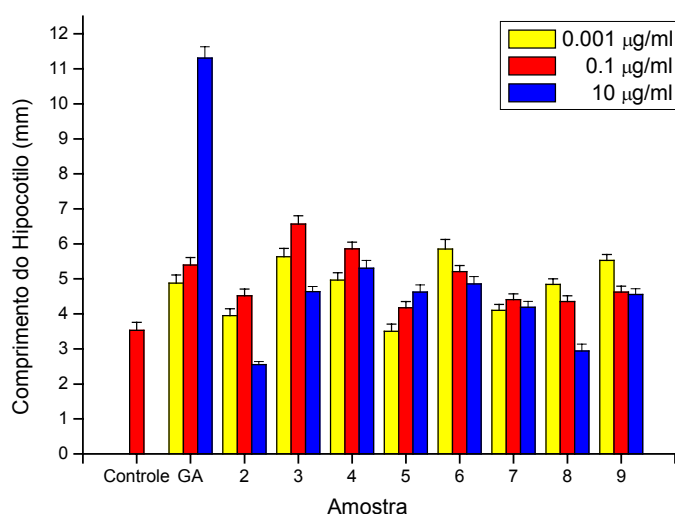


Gráfico 4: Teste do hipocótilo dos compostos obtidos (72 horas).
 esteviol (2); 7-hidroxiesteviol(3); 16,17 α -epoxiesteviol (4); 17-hidroxiisoesteviol (5);
 oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6); ácido *ent*-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7);
 isoesteviol (8); oxima do isoesteviol (9)

Na concentração de $10^{-3} \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (gráfico 4), comparando-se a atividade dos compostos obtidos frente ao ácido giberélico, observa-se que nesta concentração o 7-hidroxiesteviol (3), 16,17 α -epoxiesteviol (4), a oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6) e a oxima do isoesteviol (9) possuíram as melhores respostas, frente ao controle, sendo superior a atividade do ácido giberélico. O esteviol (2), ácido *ent*-16,17-dihidroxiabaieran-19-óico (7) e o isoesteviol (8) possuíram uma resposta menor, mais uma resposta positiva em relação ao controle, caracterizando assim a sua propriedade como fitohormônios. O 17-hidroxiisoesteviol (5) possuiu uma resposta ligeiramente negativa em relação ao controle, inibindo o seu crescimento.

Na concentração de $10^{-1} \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (gráfico 4), comparando-se a atividade dos compostos obtidos frente ao ácido giberélico, observa-se que nesta concentração nenhum dos compostos possuiu uma resposta negativa, em relação ao controle. O 7-hidroxiesteviol (3) e o 16,17 α -epoxiesteviol (4) foram os que deram uma melhor resposta positiva em

relação ao controle, sendo superiores a resposta do ácido giberélico nesta concentração. Os demais compostos nesta concentração possuíram uma resposta superior ao controle mais uma resposta inferior quando comparados ao ácido giberélico.

Na solução de maior concentração $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (gráfico 4), nenhum dos compostos possuiu uma atividade superior a resposta do ácido giberélico frente ao controle, sendo interessante destacar a resposta negativa frente ao controle do esteviol (2) e do isoesteviol (8). Importante observar que nesta concentração nenhum dos compostos possui uma atividade positiva muito destacada em relação uns aos outros e a melhor resposta positiva foi do 16,17 α -epoxiesteviol (4).

Neste gráfico pode-se comparar o comprimento do hipocótilo, para cada composto nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-1} e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. Observa-se que a medida que aumenta a concentração das soluções para o ácido giberélico ocorre um aumento no comprimento do hipocótilo, este comportamento é observado também para o 17-hidroxiisoesteviol (5). Comportamento oposto é observado para a oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6) e o isoesteviol (8), observando-se uma diminuição no comprimento do hipocótilo, a medida que aumenta a concentração destes compostos nas soluções. Para os demais compostos não observa-se uma variação proporcional a variação da concentração das soluções mas a maioria dos compostos possuindo uma resposta positiva em relação ao controle nas três concentrações, exceção para o esteviol (2) e do isoesteviol (8) na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Analizando as seqüências de modificações ocorridas a partir do esqueleto carbônico do esteviol (esquema 1, pagina 18), podemos observar a influência destas mudanças na atividade destes compostos. Na primeira seqüência de reação, a adição de um hidroxila no carbono 7 do esteviol (composto 2 $\rightarrow$ 3), através da biotransformação fez o composto tornar-se mais ativo nas três concentrações testadas. Na segunda seqüência, a epoxidação dos carbonos 16 e 17 (composto 2 $\rightarrow$ 3), aumenta a atividade nas três concentrações. Interessante observar que estes três compostos possuem um grupamento hidroxila na posição 13. Em uma terceira seqüência (composto 2 $\rightarrow$ 8), a adição de um grupamento carbonila no carbono 16 e a substituição da hidroxila do carbono 13 por uma metila tornou a atividade do composto igual ou menor que a atividade do esteviol (2), sendo menor nas concentrações de 10^{-1} e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e praticamente igual na concentração de $10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesta mesma seqüência a substituição da carbonila do carbono 16 por um grupamento oxima (composto 8 $\rightarrow$ 9), torna o composto tornou-se mais ativo nas três concentrações.

A adição de um grupamento hidroxila no carbono 17 (composto 8 $\rightarrow$ 5), torna o composto menos ativo na solução de menor concentração (10^{-3} $\mu\text{g.mL}^{-1}$), mas aumenta a sua atividade a medida que se aumenta a sua concentração (10^{-1} e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A substituição da carbonila por um grupamento oxima no carbono 16 (composto 5 $\rightarrow$ 6), torna o composto mais ativo nas três concentrações. E por ultimo a substituição da carbonila por um grupamento hidroxila no carbono 16 (composto 5 $\rightarrow$ 7), torna o composto mais ativo nas concentrações de 10^{-3} e 10^{-1} $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Mas esta atividade diminui a medida que a sua concentração aumenta.

De maneira geral se observa que ocorre um aumento da atividade com hidroxilas nas posições 7, 13, 16 e 17 dos compostos e quando substituímos o grupamento carbonila do carbono 16 por um grupamento oxima.

4.10 Teste da aleurona

Como foi mencionado na introdução, um dos casos mais interessantes da participação das giberelinas no controle do crescimento vegetal, ocorre na germinação da semente de cevada. Quando essas sementes são colocadas para germinar, observa-se, após certo tempo, a produção de giberelinas pelo embrião. Essas giberelinas são transportadas para a camada de aleurona, rica em proteínas e adjacente ao endosperma armazenador de amido. Nas células da camada de aleurona a giberelina induz, após poucas horas, a síntese de enzimas hidrolíticas. Entre as enzimas produzidas estão a α -amilase, a qual, transportada até o endosperma, causa a hidrólise do amido e libera açúcares simples que serão utilizados como fonte de energia e de carbono para o desenvolvimento do embrião.

O teste da aleurona da cevada é um bioensaio utilizado para testar a indução da produção desta enzima, a α -amilase na camada de aleurona. Este teste é baseado na determinação de açúcares redutores produzidos na decomposição do amido das sementes promovido pela atividade desta enzima liberada pela camada de aleurona. A quantificação dos açúcares redutores foi feita através de método de Somogyi-Nelson utilizando uma curva padrão (fig. 29) construída a partir de uma solução padrão de glicose de concentração 3mg/mL com intervalos de 75, 150, 300, 500 e 600 micromolar.

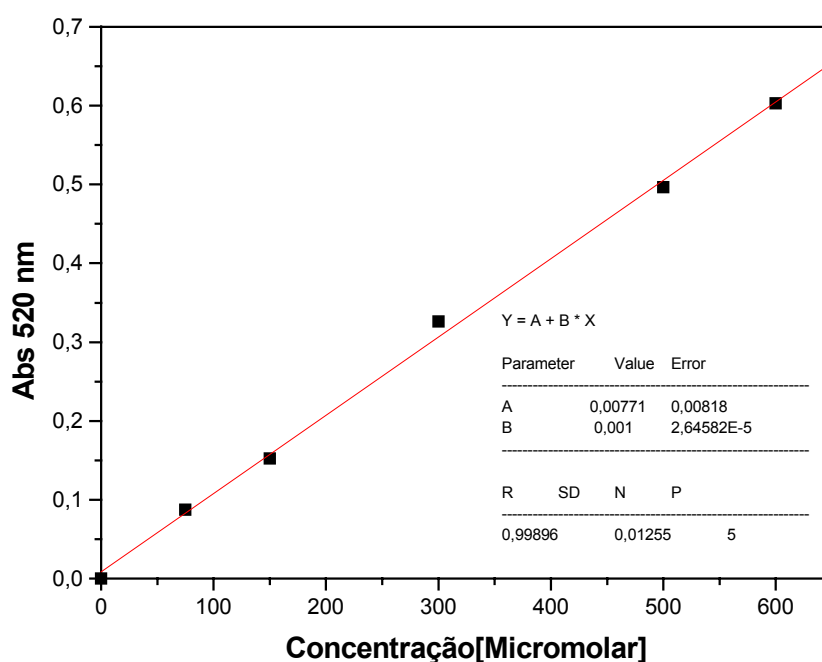


Figura 29: Curva padrão D-glicose ($R^2 = 0,99896$)

Prepararam-se soluções-estoque dos compostos a serem testados na concentração de 1000 mg.mL^{-1} , em acetona, para o GA_3 , e etanol, para os demais compostos. As diluições foram feitas em água destilada para atingir as concentrações de 10^{-3} , 10^{-1} e $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados estão resumidos no Gráfico 4.

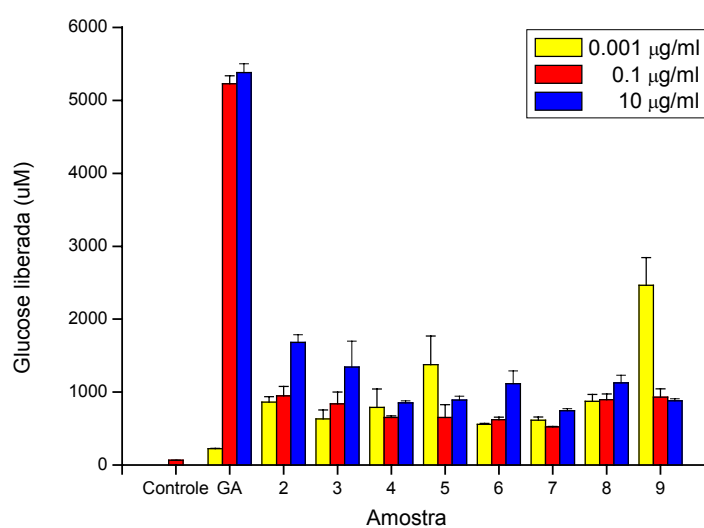


Gráfico 4: Teste aleurona dos compostos obtidos.
 esteviol (2); 7-hidroxiesteviol(3); 16,17 α -epoxiesteviol (4); 17-hidroxiisoesteviol (5);
 oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6); ácido ent-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7);
 isoesteviol (8); oxima do isoesteviol (9).

Na solução de menor concentração, $10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$, todos os compostos possuíram uma resposta superior ao do ácido giberélico. Destacou-se a resposta do 17-hidroxiisoesteviol (5) e principalmente do oxima do isoesteviol (9), que possuiu uma resposta excelente em relação aos outros compostos, sendo sua atividade aproximadamente dez vezes superior ao do ácido giberélico. Os demais compostos, o esteviol (2), 16,17 α -epoxiesteviol (4) e o isosesteviol (8) demonstraram uma atividade semelhante e ligeiramente superior ao 7-hidroxiesteviol (3), oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6) e do ácido *ent*-16,17-dihidroxibaieran-19-óico (7).

Na solução de concentração intermediária, $10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$, a atividade do ácido giberélico é destacada em relação a todos os compostos testados. Nesta concentração as melhores respostas foram do esteviol (2), isoesteviol (8) e oxima do isoesteviol (9), sendo suas atividades ligeiramente superiores ao 7-hidroxiesteviol (3), 16,17 α -epoxiesteviol (4), 17-hidroxiisoesteviol (5), oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6), e ácido *ent*-16,17-dihidroxibaieran-19-óico (7).

Na solução de maior concentração, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, novamente a atividade do ácido giberélico é destacada em relação aos demais compostos. Em relação aos compostos estudados, demonstraram melhor atividade o esteviol (2) e o 7-hidroxiesteviol (3), sendo suas respostas ligeiramente superiores a oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6) e isoesteviol (8). Nesta concentração os compostos de menor atividade foi o 16,17 α -epoxiesteviol (4), 17-hidroxiisoesteviol (5) e o ácido *ent*-16,17-dihidroxibaieran-19-óico (7).

É interessante observar no gráfico dos três experimentos que a medida que aumentamos a concentração de ácido giberélico, aumenta-se a atividade aminolítica da camada da aleurona, estando isto de acordo com várias aplicações de ácido, onde sua atividade conforme suas aplicações, é maior em soluções mais concentradas.

Comportamento semelhante observamos em relação ao esteviol (2), 7-hidroxiesteviol (3), oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6) e isoesteviol (8). Contraria a esta observação foi o comportamento da oxima do isoesteviol (9), o qual a medida que se aumenta a concentração de suas soluções sua atividade diminui. As soluções formadas pelo 16,17 α -epoxiesteviol (4), 17-hidroxiisoesteviol (5) e ácido *ent*-16,17-dihidroxibaieran-19-óico (7) não demonstraram nenhum comportamento proporcional a sua concentração.

No ensaio da aleurona se observa que todas as mudanças feitas no esqueleto do esteviol, conduziram a uma queda na atividade dos compostos. Exceção feita aos compostos 5 e 9 na solução de menor concentração. A boa resposta do composto 5, pode ser justificada pela presença do grupo carbonila no carbono 16 e da hidroxila no carbono

17. A excelente resposta obtida pelo composto 9, na solução de menor concentração pode ser atribuída ao grupamento oxima na posição do carbono 16.

Analisando os resultados, se observa que os compostos 5 e 9 possuem uma melhor atividade na solução de menor concentração e uma tendência de suas atividades aumentarem a medida que aumenta a polaridade das moléculas.

4.11 Conclusões

A preparação dos derivados do esteviosídeo por via química ocorreu da forma esperada e os compostos conhecidos tiveram seus dados espectroscópicos comparáveis com os da literatura. Os ácidos *ent*-16,17-diidroxiabaieran-19-óico (7) e *ent*-17-hidroxi-16-hidroxinobaieran-19-óico (6) não foram encontrados na literatura e foram devidamente caracterizados (I.V., RMN ^1H e RMN ^{13}C).

Em relação à obtenção do ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicaurenóico, através da biotransformação do esteviol pela *Gibberella fujikuroi*, realizou-se vários ensaios na tentativa de se otimizar a produção. Não foram encontrados na literatura tentativas neste sentido. Nos nossos ensaios foi observado a influência da temperatura, solubilidade e tempo de reação. Os melhores rendimentos ocorrem a uma temperatura de 28° C, entre 48 e 72 horas, com o esteviol sendo solubilizado em etanol.

O uso do esteviol encapsulado na forma de lipossomas, não ocasionou aumento no rendimento da biotransformação, sendo a diferença muito pequena quando solubilizado em etanol. Entretanto, este é um método alternativo e interessante, para se otimizar biotransformações de substâncias hidrofóbicas, pouco solúveis em meio líquido.

O teste do hipocótilo, na concentração de 10^{-3} $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrou que o ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicaur-16-en-19-óico (3), *ent*-17-hidroxi-16-hidroxinobaieran-19-óico (6) e ácido *ent*-16-hidroxinobaieran-19-óico (9), possuem atividade superior ao da giberelina comercial, GA₃. Nesta mesma concentração, o ácido *ent*-13-hidroxi-16,17 α -epoxicaur-19-óico (4) e ácido *ent*-16-cetobaieran-19-óico (8) tiveram comportamento semelhante à giberelina comercial. Portanto, estes compostos derivados do esteviol, nestas concentrações possuem potencial uso como regulador de crescimento vegetal.

Na concentração de 10^{-1} $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrou que o ácido *ent*-7 α ,13-diidroxicaur-16-en-19-óico (3) e o ácido *ent*-13-hidroxi-16,17 α -epoxicaur-19-óico (4), possuem atividade superior ao da giberelina comercial, GA₃. Demonstrando que nesta concentração possuem potencial uso como regulador de crescimento vegetal.

Na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, nenhum dos compostos possuiu resposta superior ao do ácido giberélico, observando que os compostos ácido *ent*-13 α -hidroxicaur-

16-en-19-óico (2) e ácido *ent*-16-cetobaieran-19-óico (8) possuíram uma resposta negativa em relação ao controle, mostrando nesta concentração um comportamento de inibidor do crescimento vegetal.

No biosensaio da aleurona a atividades dos compostos foram superiores ao do ácido giberélico na solução de menor concentração, destacando-se a atividade do ácido *ent*-17-hidroxi-16-cetobaieran-19-óico (5) e do ácido *ent*-16-hidroximinobaieran-19-óico (9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSOV, A.; ANDREEVA, O.; BAKALEYNIK, G.A.; BESKROVNY, D.; KATAEV, V.; KOVYLJAEVA, G.; LITVINOV, I.; MILITSINA, O.; STROBYKINA, I. Chemistry and struture of diterpene compouds of the Kaurane Series: Azomethines derived from Isosteviol. **Russian Journal of General Chemistry**, v.73, n.8, p.1255-1260,2003.

ALVES, Z.A.; SÁ, M.E.; CORREA, L.C. and BINOTTI, F.S., Efeito da temperatura de armazenamento fitorreguladores na germinação de sementes maracujá doce e desenvolvimento inicial de mudas. **Acta Science Agronomy**, v. 28, n.3, p.441-448 , 2006.

ASHFORD, A.E. & GUBLER, F. Mobilization of polysaccharide reserves from endosperm. In: MURRAY, D.R. (ed) Seed Physiology. London: Academic Press, v.2., p. 117-161, 1984.

ARAGÃO, C. A.; DANTAS, B. F.; ALVES, E.; CATANEO, A. C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho super doce tratadas com ácido giberélico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 43-48, 2003.

BEARDER, J.R. ; MACILLAN, J. and PHINNEY, C.M.W.O. The metabolism of steviol to 13-hidroxlated *ent*-gibebrellanes and *ent*-kauranes, **Phytochemistry**, v.14, n.8, p. 1741-1748, 1975.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. Seeds. Physiology of development and germination. New York: Plenum Press. 367p, 1985.

BOUWMEESTER, H.J. and KARSSSEN, C.M. Environmental factor influencing the expression of dormancy patterns in weed seeds. **Anais of Botany**, n.63, p.113-120, 1989.

CARVALHO, N.M. and NAKAGAWA, J. Composição química de sementes. In: Sementes, ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP. p. 66-97, 2000.

CHEETHAM P.S.J: Case studies in the application of biocatalysts for the production of (bio)chemicals. In Applied Biocatalysis, Edited by Straathof AJJ, Adlercreutz P. Amsterdam: Harwood Scientific Publishers; 2e, p.93-152, p.395-402, 2000.

CHITARRA, M.I.F., CHITARRA, A.B. Póscolheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL, 1990.

CHANDLER, P.M., ZWAR, J.A., JACOBSEN, J.V., HIGGINS, T.J.V. & INGLIS, A.S. The effect of gibberellic acid and abscisic acid on α -amilase mRNA levels in barley aleurone layers. Studies using the α -amilase cDNA clone. **Plant Molecular Biology**, v.3, p.407-418, 1984.

DURE, L.S. Site of origin and extent of amylases in maize germination. *Plant Physiology*, v.35, p.925-934, 1960.

FACHINELLO, J.C. Influência de GA3 em frutos de laranja (Citrus sinensis) cv. valência, na região de Pelotas, RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. Resumos. Salvador: SBF, p. 357-358, 1994

FERREIRA, G.; ERIG, P. R.; MORO, E. Uso de ácido giberélico em sementes de frutado-conde (Annonasquamosa L) visando à produção de mudas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 178-182, 2002.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.; ROCHA, O.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia a base de antimônio. **Química Nova**, v.28, n.3, 511-518, 2005.

GEUNS, J.M.C., Stevioside, **Phytochemistry**, v.64, p.913-921, 2003.

GIANFAGNA, T. ; ZEEVART, J.A.D. e LUSK, W.J. Synthesis of (h-2)-labeled gibberellins from steviol using the fungus *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v.22, n.2, p.427-230,1983.

FILHO, W.G.V.; Tecnologia de cerveja. Botucatu : Funep, 84p, 2000.

HANSON, J.R., OLIVEIRA, B.H., The microbiological transformation of steviol derivatives by *Resumos stolonifer* and *Gibberella fujikuroi*. **Phytochemistry**, v.29, n.12, p.3805-3807, 1990.

HERSHENHORN, J.; ZOHAR, M.; CRAMMER, B.; ZIV, Z.; WEINSTEIN, V.; KLEIFELD, Y.; LAVAN, Y. & IKAN, R. Plant-growth regulators derived from the sweetener stevioside. *Plant Growth Regulation*. V.23, 173-178, 1997.

HIGGINS, T.J.V., ZWAR, J.A. & JACOBSEN, J.V. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α -amilase in barley aleurone layers. *Nature*, v.260, p.166-169,1976.

HUISMAN, G.W., GRAY, D. Current opinion in Biotechnology, towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. **Current Opinion in Biotechnology**, V.13, p.352-358, 2002.

HORE, J.K., SEN, S.K. Viability of papaya (*Carica papayaL.*) seeds under different pre-storage treatments. **Environment Ecology**, v. 11, n. 2, p. 273-275, 1993.

HOWARD, B.H.; OEHL, V.H. Improved establishment of in vitro propagated plum micropropagules following treatment with GA3 or prior chilling. **Journal of Horticultural Science**, v.56, n.1, p. 1-7, 1981.

HOLLAND, H. L. Microbial and in vitro Enzymic Transformation of Alkaloids. Em: The Alkaloids. Manske, R. H. F.; Rodrigo, R. G. A. Academic Press: New York. p.323-400, 1981.

IWAMURA, J. US PATENT 4: 449-997, 1984.

KENDE, H.; ZEEVAART, JAN A. D. The Five “Classical” Plant Hormones. **The Plant Cell**, v.9, p.1197-1210, 1997.

KENNELLY, E.J., Sweet and non-sweet constituents of *stevia rebaudiana bertonii*. In: Kinghorn, A.D. (ed), *Stevia*, the Genus *stevia*. **Medicinal and Aromatic plants-Industrial profiles**, v.19, p.68-85, 2002.

KOROCHINA, M.; FONTANELLA, M.; CASNATI, A.; ARDUINI, A.; SANSONE, F.; UNGARO, R.; LATYPOV, S.; KATAEV, V. And ALFONSOV, V. Synthesis and spectroscopic studies of isosteviol-calix[4]arene and calix[6]arene conjugates. **Tetrahedron**, v.61, p.5457-5463, 2005

KOTARSKI, S.F.; WANISHA, R. D.; THURN, K. K. Starch hidrolisis by the ruminal microflora. **Journal of Nutrition**, v.122, p.78-190, 1992.

LIANES, N.; PENDAS, J.; FALERO, A.; PERES, C.; HUNG, B.; MOREIRA.T. Conversion of liposomal 4-androsten-3,17-dione by *A. simplex* immobilized cells in calcium lactate. **Journal Biochem Molecule Biology**, v.80, p.131-133, 2002.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. INDUSTRIAL BIOTRANSFORMATIONS. WILEY-VCH, WEINHEIM, GERMANY, 2000.

LUCKWILL, L.C. **Growth Regulators in Crop Production**, Edward Arnold, London, 1981.

MACIEL, S.C.; VOLTOLINI, J.A.; PEDROTTI, E.L. Enraizamento ex vitro e aclimatização do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 289-292, 2002.

MacMILLAN, J.; Biosynthesis of the gibberellins. **Natural Product Report**, v.14, p.221-243. 1997.

MacMILLAN, J., Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. **Journal of Plant Growth Regulator**, v.20, p.387-442 , 2002.

MANOSROI, J.; SRIPALAKIT, P.;MANOSROI, A. Biotransformation of chlormadinone acetate by free and immobilized *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 and *Bacillus sphaericus* ATCC 13805, **Enzyme and Microbial Tecnology**, v.33, p.320-325, 2003.

MANZONI M, ROLLINI N: Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p.555-564, 2002.

MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. The germination of plants. Oxford: Pergamon Press, 4ed, 270p. 1978.

METIVIER, J.R. Dormência e germinação. In: FERRI, M.G. (Ed.). Fisiologia vegetal 2. São Paulo:EPU, p.343-392, 1985.

METIVIER, J.R. Giberelinas. Fisiologia vegetal. São Paulo: EPU/Edusp, p. 129-162. 1986.

MISUSHINA, Y.; AKIHISA, T.; UKIYA, M.; HAMASAKI, Y.; NAKAI, C.; KURIYAMA, I.; SUGAWARA, F.; YOSHIDA, H.; Structural analysis of isosteviol and

related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. **Life Science**. V.77, p.2127-2140, 2005.

MORAES, A. M.; Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, Campinas, S.P, 1996.

MUROFUSHI, N. ; SHIGEMATSU, Y.; NAGURA, S. Metabolism of steviol and its derivatives by *Gibberella fujikuroi*. **Agr. Biol. Chem. Tokyo**, v.46, n.9, p.2305-2311, 1982.

OGAWA, T.; NOZAKI, M.; MATSUI, M.; Total Synthesis of Stevioside. **Tetrahedron Letters**, v.36, p.2641-2648, 1980.

OLIVEIRA, B.H.; SANTOS, C.S ; LEAL, P.C. Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. **Phytochemistry**, v.51, p.737-741, 1999.

OLIVEIRA, B.H.; FILHO, J.D.; LEAL, P.C. Biotransformation of Steviol Derivatives by *Aspergillus niger* and *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.210-213, 2005.

PALEG, L.G. Physiological effects of gibberellic acid. II. On starch hydrolyzing enzymes of barley endosperm. **Plant Physiology**, v.35, n.2, p.902-6, 1960.

PASQUAL, M.; PETRI, J.C. Quebra de dormência das fruteiras de clima temperado. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.124, p.56-62, 1985.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D. S.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. A. R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de

dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas in vitro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 380-381, ago. 2004.

PEZZUTO, J.M.; COMPADRE, C.M.; SWANSON, S.M.; DHAMMIKA, N.P.; and KINGHORN, D. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside is mutagenic. **Medical Science**, v.82, p.2478-2482, 1985.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R. de L.; SILVA, J.B. da. Crescimento de plantas micropropagadas de macieira em casa de vegetação com aplicações de ácido giberélico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.36, n.6, p.881-886, 2001.

PIRES, E. J. P.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C.; TERRA, M. M.; PASSOS, I. R. S.; CRUZ, L.S.; MARTINS, F.P. Respostas a aplicação de ácido giberélico (GA) em panículas de videira do cultivar IAC 871-13 A Dona. *Anais... Brasília: Embrapa DDT/CNPq*, v. 2, p. 473-477, 1986.

PONCHIA, G.; GARDMAN, M. The micropropagation and post-acclimation growth of *Prunus laurocerasus* L. *Advances in Horticultural Science*, v.7, n.1, p.11-14, 1983.

REEVE, D.R. and CROZIER, A. *Gibberellins and Plant Growth*. John Wiley, New Delhi. p. 35-64. 1975.

RETAMALES, J.; BANGERTH, F.; COOPER, T.; CALLEJAS, R. Effects of CPPU and GA3 on fruit quality of Sultanina table grape. **Acta Horticulturae**, n.394, p. 149-157, 1995.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Parada de crescimento de mudas de macieira da cv. Gala, clone FZ, durante a aclimatização em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.145-152, 1992.

RICHMAN, A.S. ; GIJZEM, M.; STARRATT, A.N.; YANG, Z.; BRANDLE, J.E. Diterpenes synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. **Plant Journal**, v.19, n.4, p.411-421, 1999.

RUDDAT, M; HEFTMANN, E. e LANG, A. Conversion of steviol to a gibberellin-like compound by *Fusarium moniliforme*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.111, n.1, p.187-196, 1965.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.; Lipossomas: a bala mágica acertou. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1181-1185, 2002.

SEBEK, O. K. Fungal transformations as a useful method for the synthesis of organic compounds. **Mycologia**, v.75, p.383-394, 1983.

SERVI, S. Microbial Reagents in Organic Synthesis. Kluwer Academic Publishers:Dordrecht,TheNetherlands. p.381.1992.

SHIBATA, H. *et al.* Steviol and Steviol-Glycoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni – purification and partial characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 321, n.2, p.390-396, 1995.

SILVA, J. A.A. Tratamento de laranja ‘Hamlin’ com ácido giberélico associado a surfactante. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15., 1998, Poços de Caldas. Resumos... Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1998. p. 332.

SCALON, S. P. Q.; SCALON FILHO, H.; RIGONI, M. R. Armazenamento e germinação de sementes de uvas *Eugenia uvalba* Cambess. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1228-1234, nov./dez. 2004.

SMIDERLE, O. J.; SOUSA, R. C. P. Dormência em sementes de paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunth - Fabaceae -Papilionidae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.25, p. 48-52, 2003.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro. *Journal of Horticultural Science*, v.56, n.1, p.71-76, 1981.

STENZEL, N. M. C.; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V. J. Superação de dormência em sementes de atemóia e frutado-conde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 305-308, 2003.

STRAATHOF, A.J.; PANKE, S.; ANDREAS, S., The production of fine chemicals by biotransformations, **Current Opinion in Biotechnology** , v. 13, p.548–556, 2000.

SZOKA, JR., F.; PAPAHA DJOPOULOS, D.; Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes) **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v.9, p.467, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. FISILOGIA VEGETAL. PORTO ALEGRE: ARTMED, 3. ED, P.559, 2004.

THOMAS, SM., DI COSIMO, R., NAGARAJAN, Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. **Trends in Biotechnology**, v.6, p.238-242, 2002.

TOTTE, N., CHARON, L., ROHMER, M., COMPERNOLLE, F., BABOEUF, I., GEUNS, J.M.C. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an *ent*-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. **Tetrahedron Letters**, v.41, p.6407-6410, 2000.

- TUDZYNSKI, B. HOLTER, K., Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. **Fungal Genetics and Biology**. v.25, p.157–170, 1998.
- VAN BEILEN, J.B., DUETZ, W.A., SCHMID, A., WITHOLT, B., Practical issues in the application of oxygenases. **Trends in biotechnology**. V.4, p.170-177, 2003.
- VIEIRA, F.A.; GUSMÃO, E.; Efeitos de giberelinas, fungicidas e do armazenamento na germinação de sementes *Genipa americana*. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 2, p.137-144, 2006.
- VILLALOBOS, N., MARTIN, L., MACIAS, M.J., MANCHENO, B., GRANDE, M., Gibberellin-like activity of some tetracyclic diterpenoids from *Elaeoselinum* species and their derivatives, **Phytochemistry**, v.37, n.3, p. 635-639, 1994.
- YABUTA, T. SUMIKI, Y., On the crystal gibberellins, a substance to promote plant growth. **J. Agric. Chem. Soc. Japan**, v.14, p.1526, 1938.
- ZAMSKI, E. Transport and accumulation of carbohydrates in developing seeds: the seed as a sink. In: Seed development and germination. New York: Marcel Dekker. p.139-162, 1995.
- ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.110, n.1, p.34-38, 1985.
- WEAVER, R.J. Rooting and propagation. ed. Plant growth substances in agriculture. San Francisco, Freeman, cap. 5, p. 118-145, 1972.

5 ANEXOS

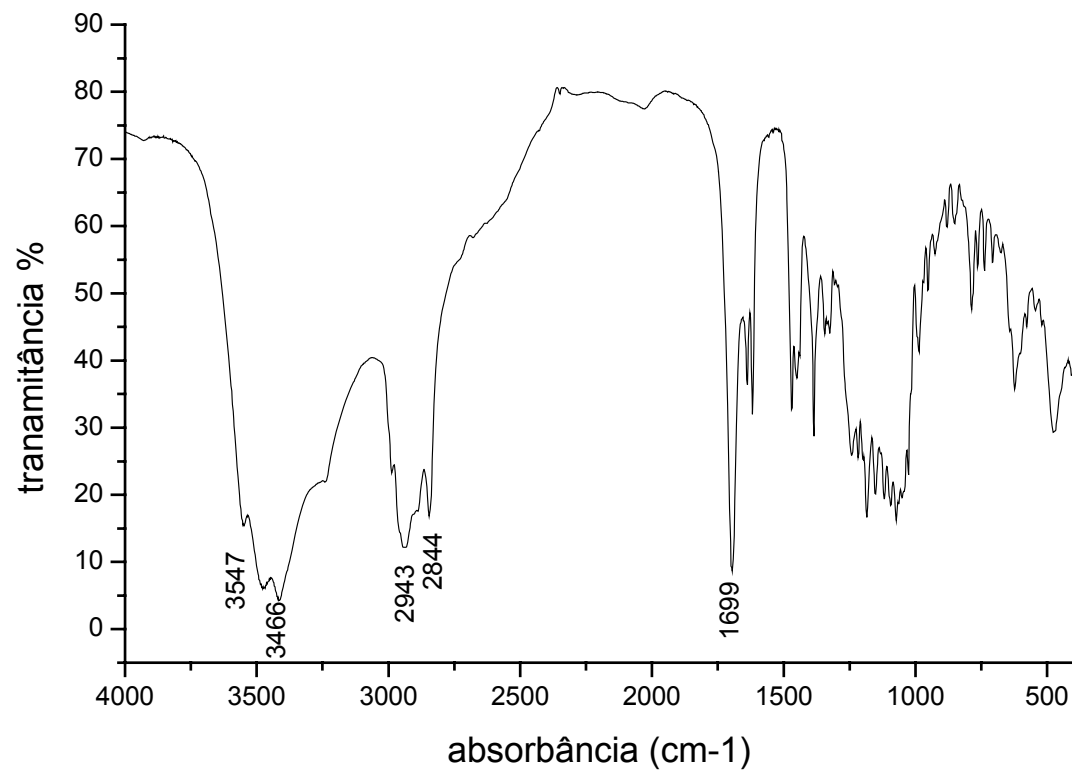


Figura 30: Espectro no IV do esteviol (2)

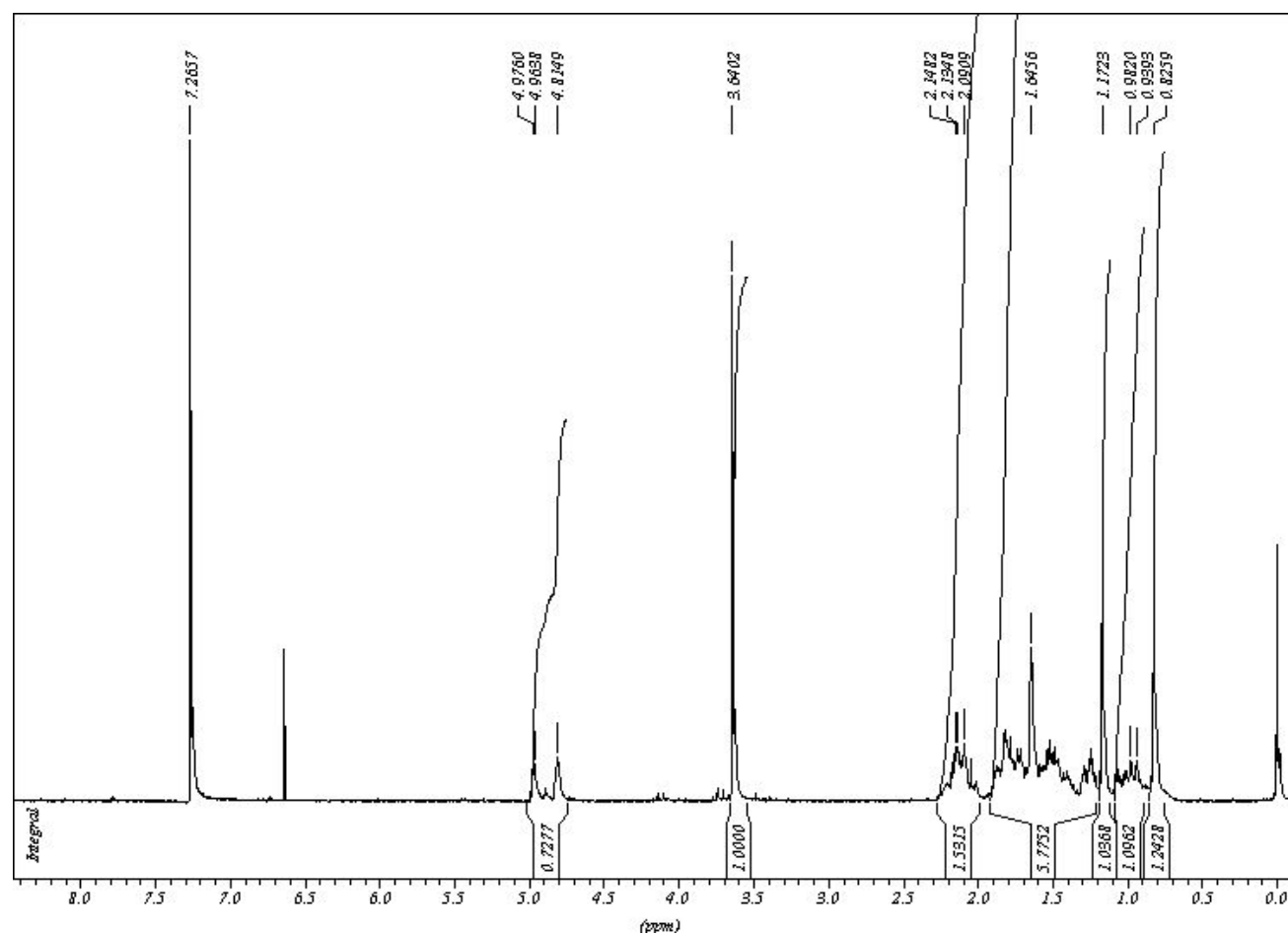


Figura 31: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do esteviol (2)

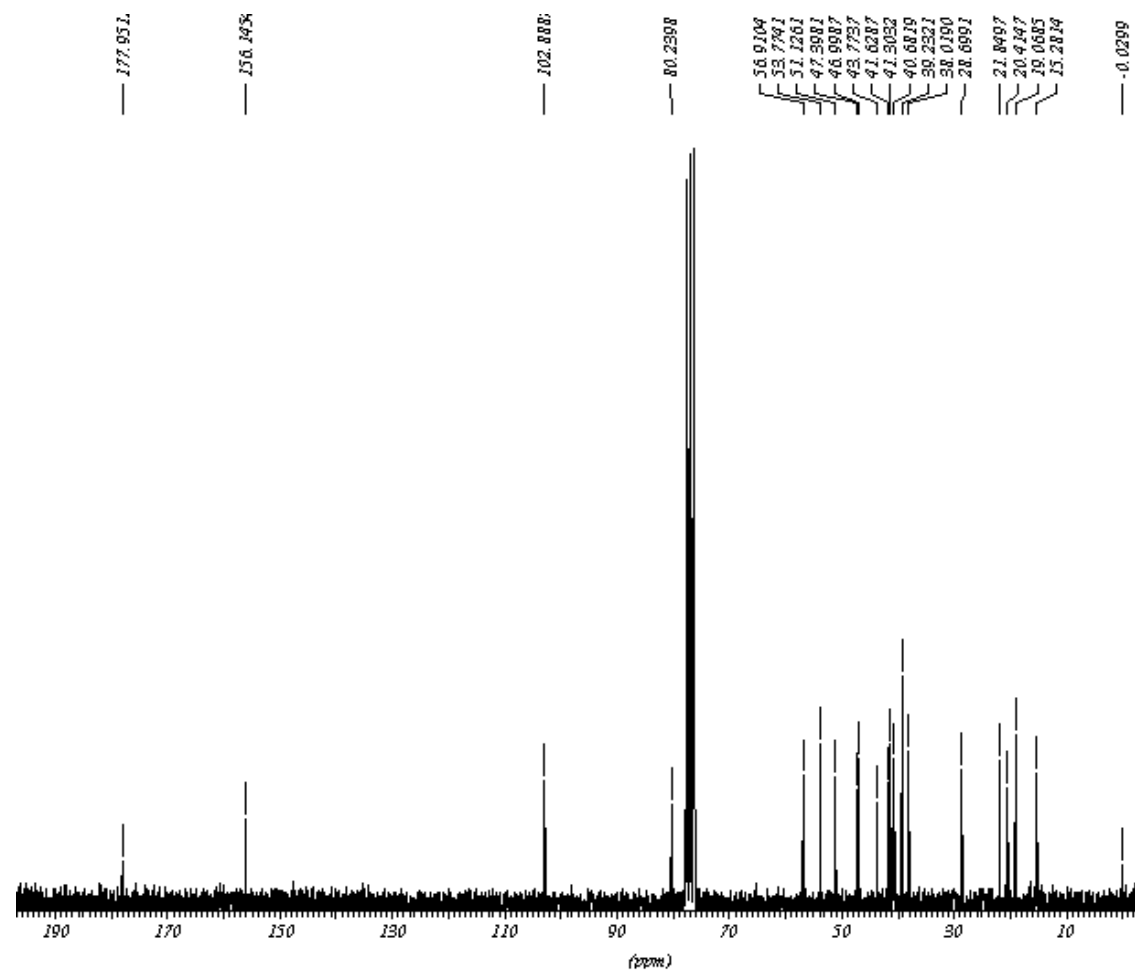


Figura 32: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do esteviol (2)

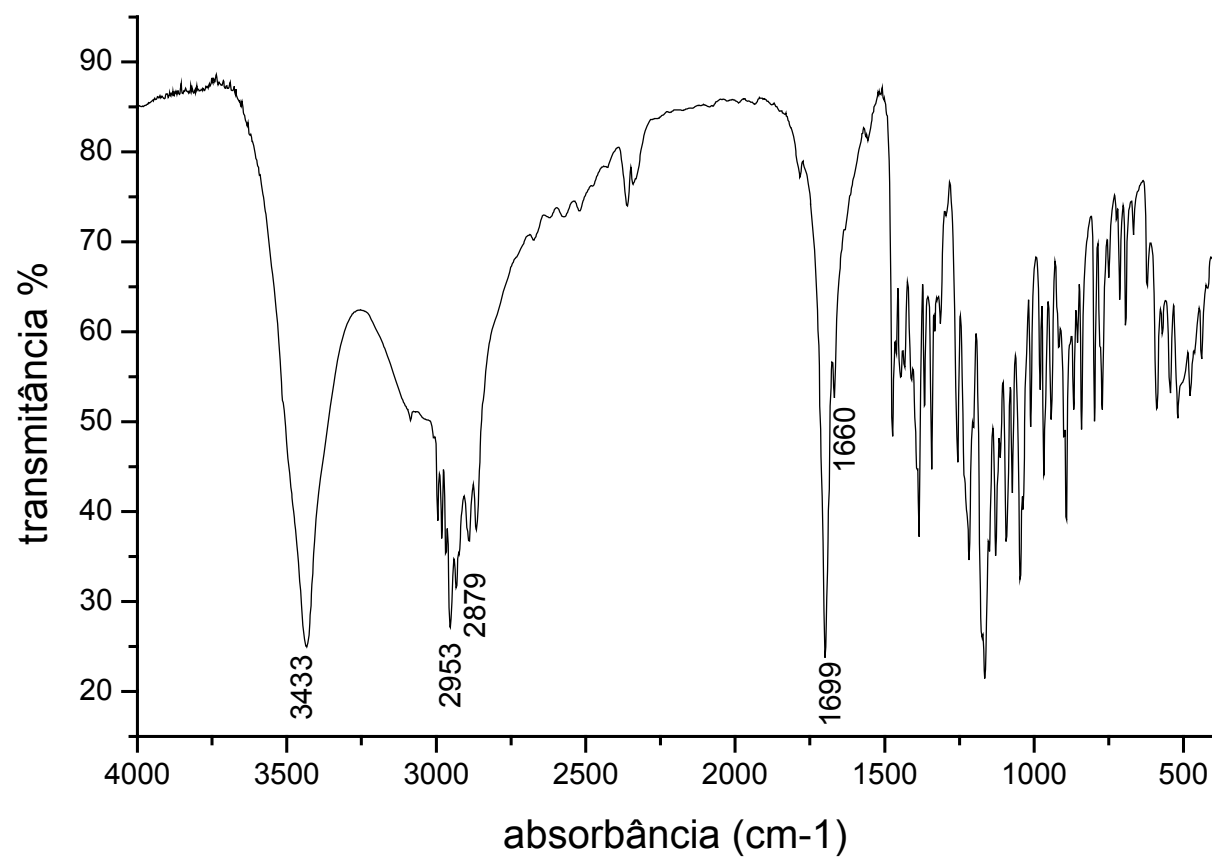


Figura 33: Espectro no IV do 7-hidroxiesteviol (3)

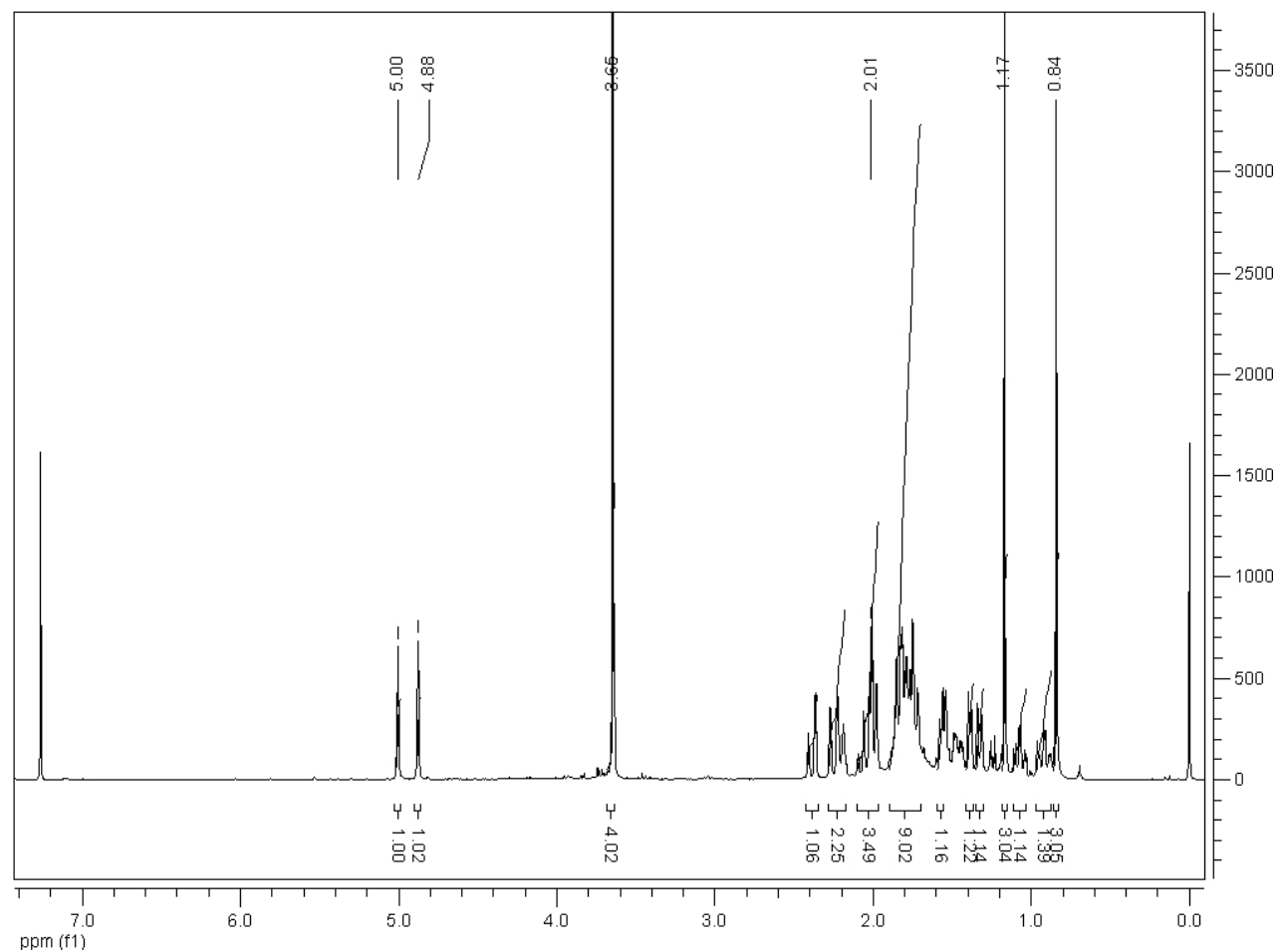


Figura 34: Espectro de RMN ^1H (200MHz , $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)

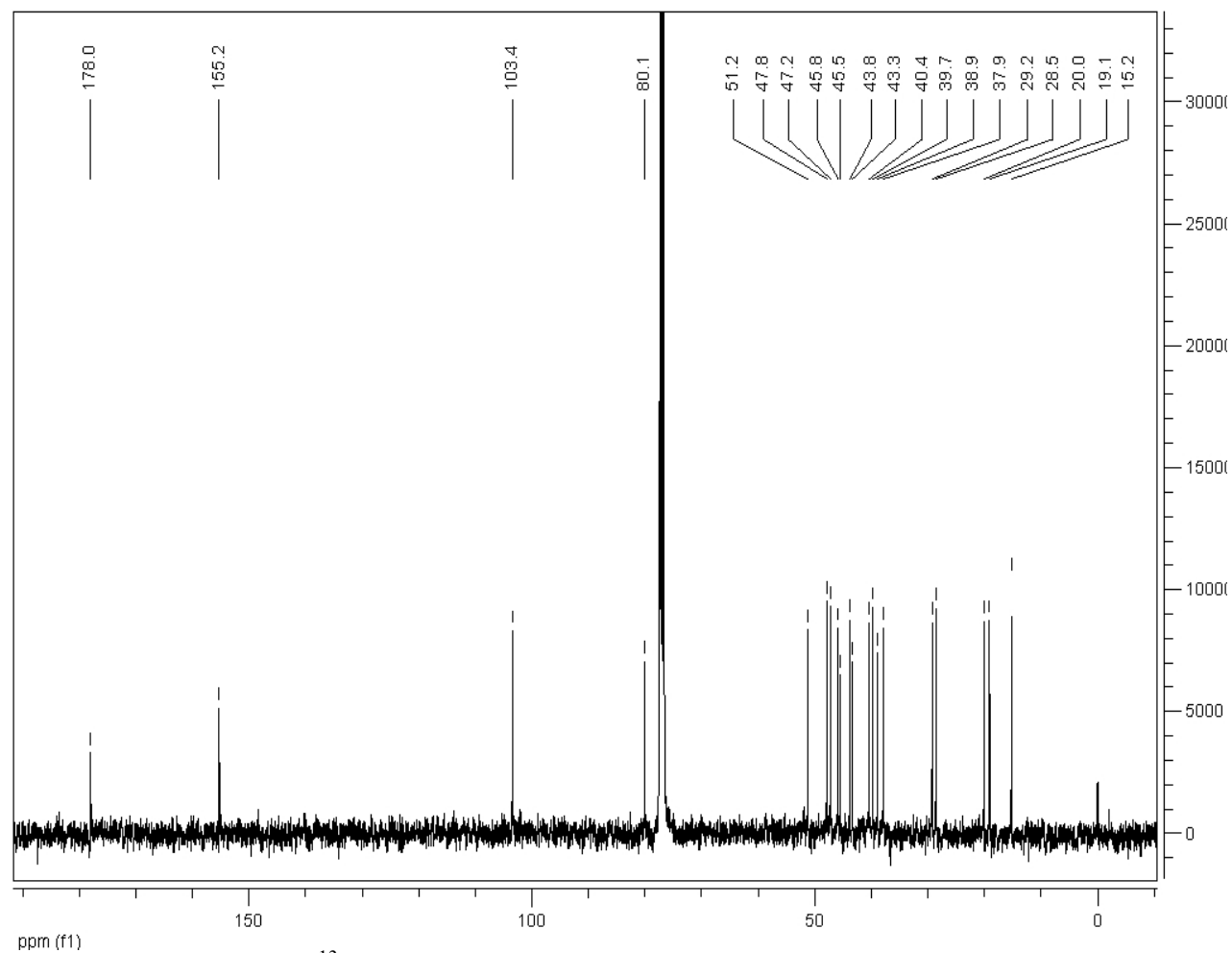


Figura 35: Espectro RMN ^{13}C (100MHz, $\text{CDCl}_3\text{-MeOD}$) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)

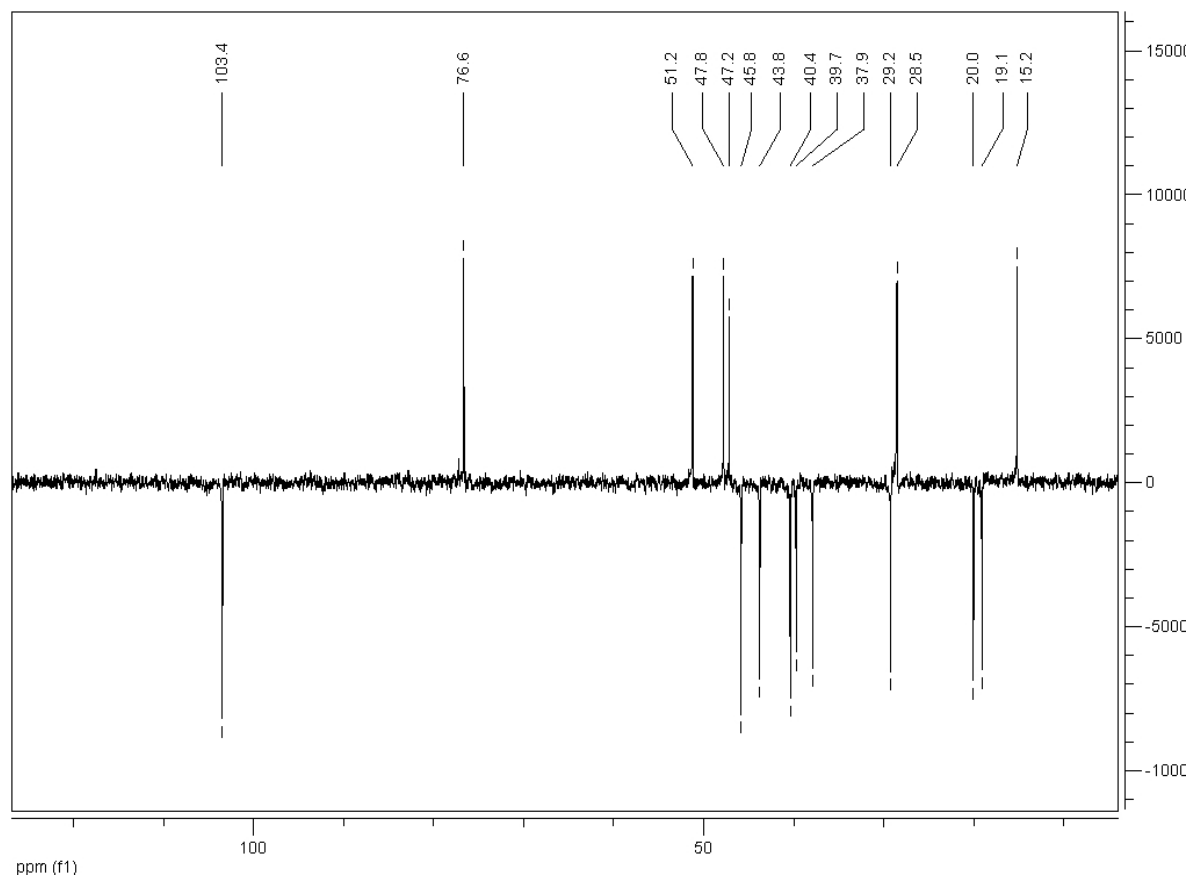


Figura 36: Espectro RMN ¹³C-DEPT -135 (100MHz, CDCl₃-MeOD) para o éster metílico do 7-hidroxiesteviol (3)

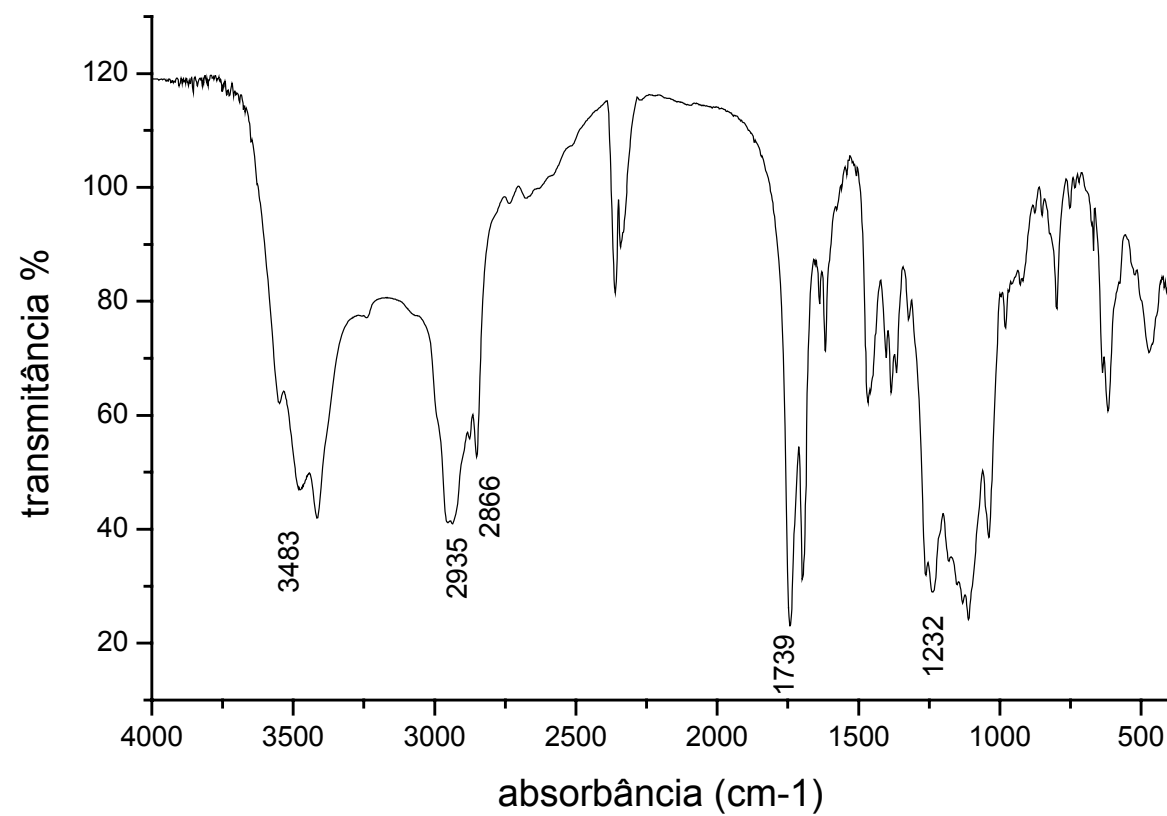


Figura 37: Espectro no IV do 16,17 α -epoxiesteviol (4)

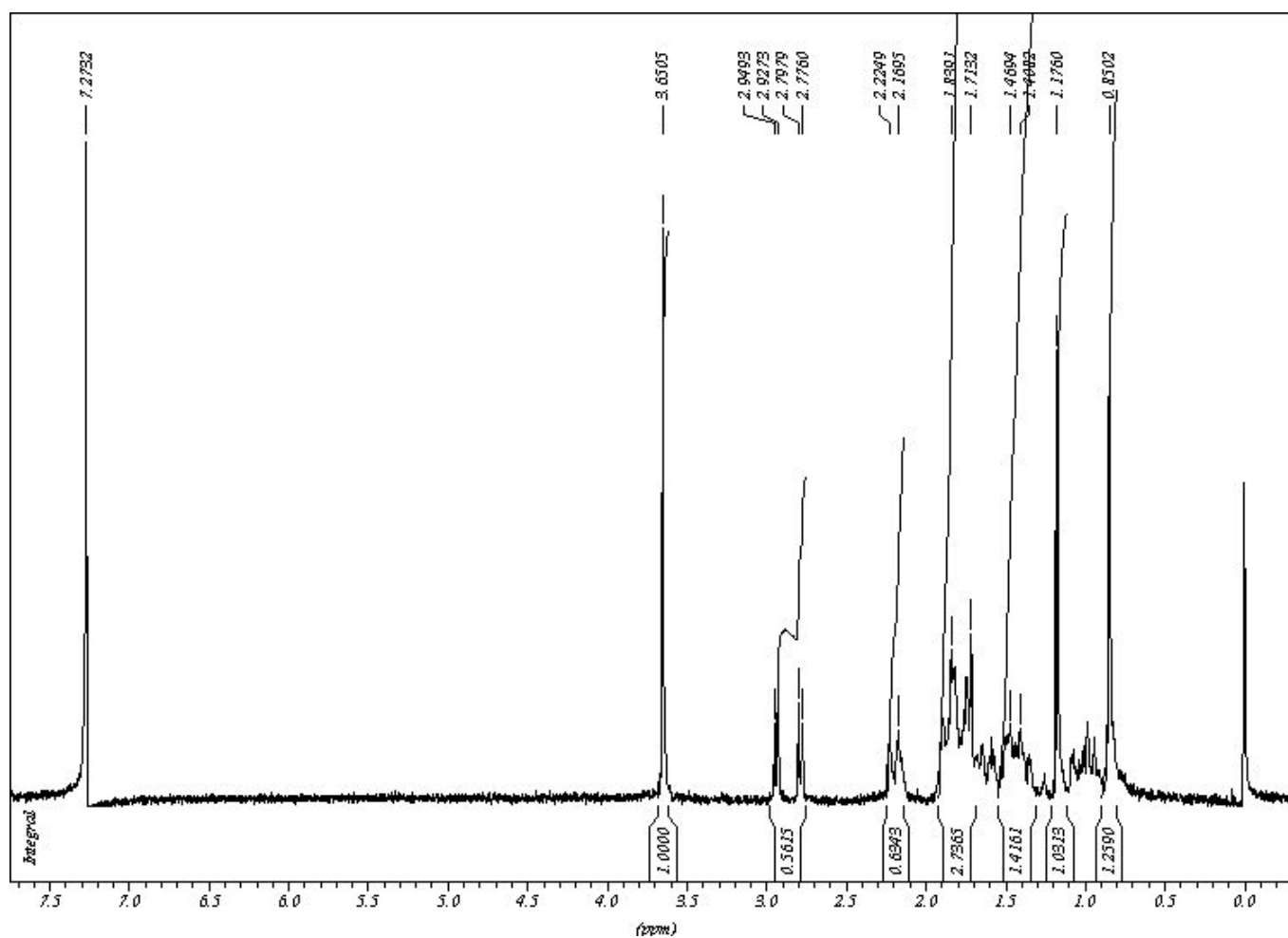


Figura 38: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 16,17 α -epoxieseviol (4)

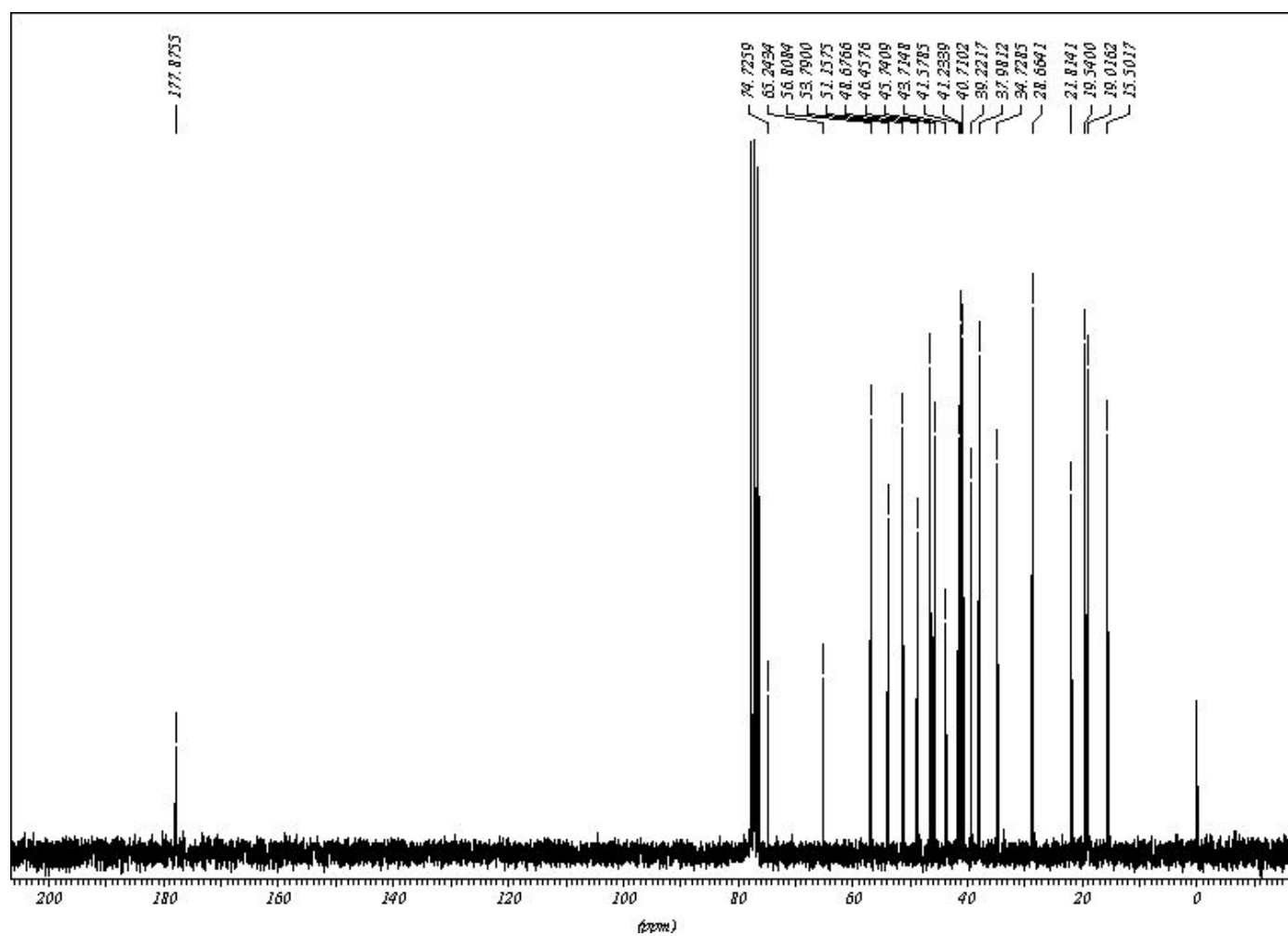


Figura 39: Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 16,17 α -epoxisteviol (4)

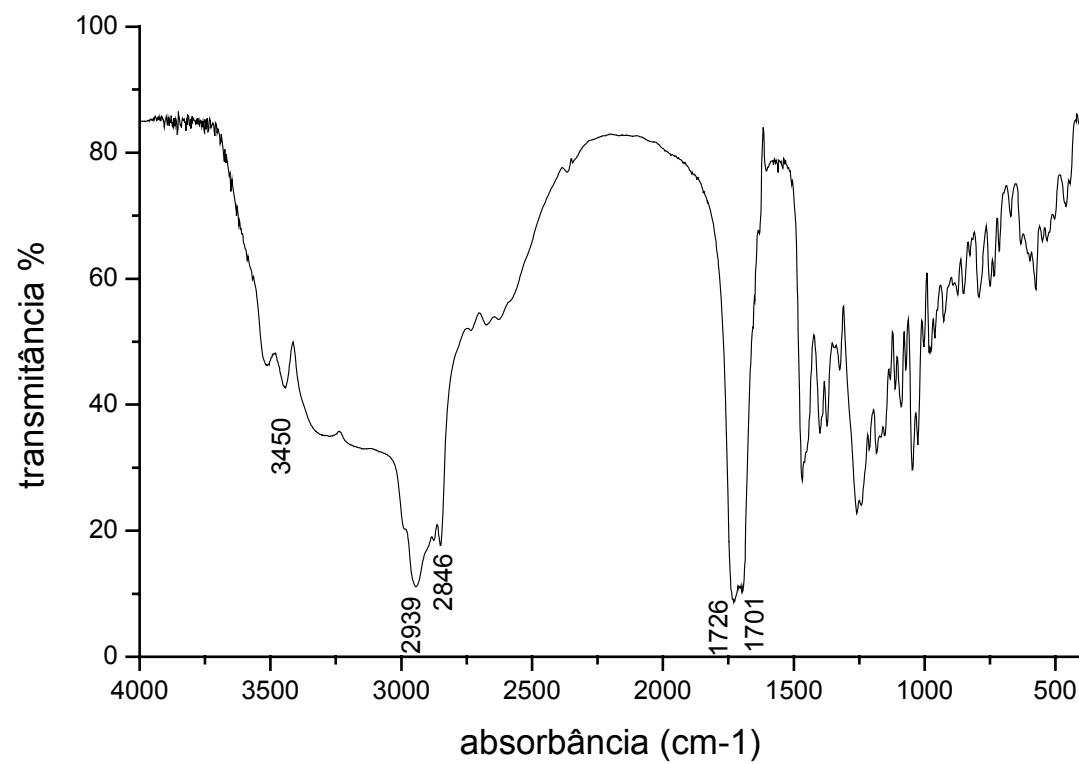


Figura 40: Espectro no IV ácido 17-hidroxi-isoesteviol (5)

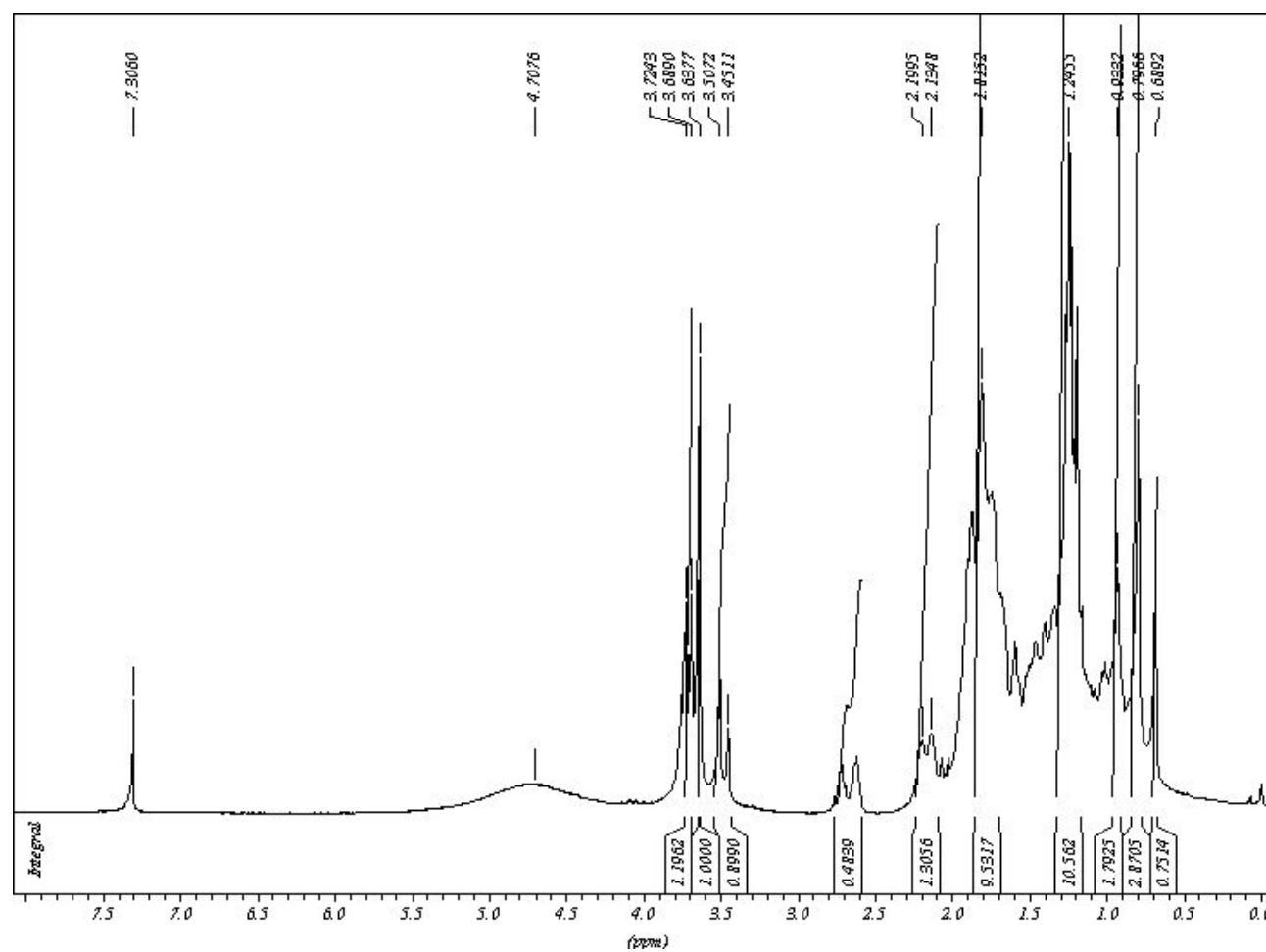


Figura 41: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 17-hidroxi-isoesteviol (5)

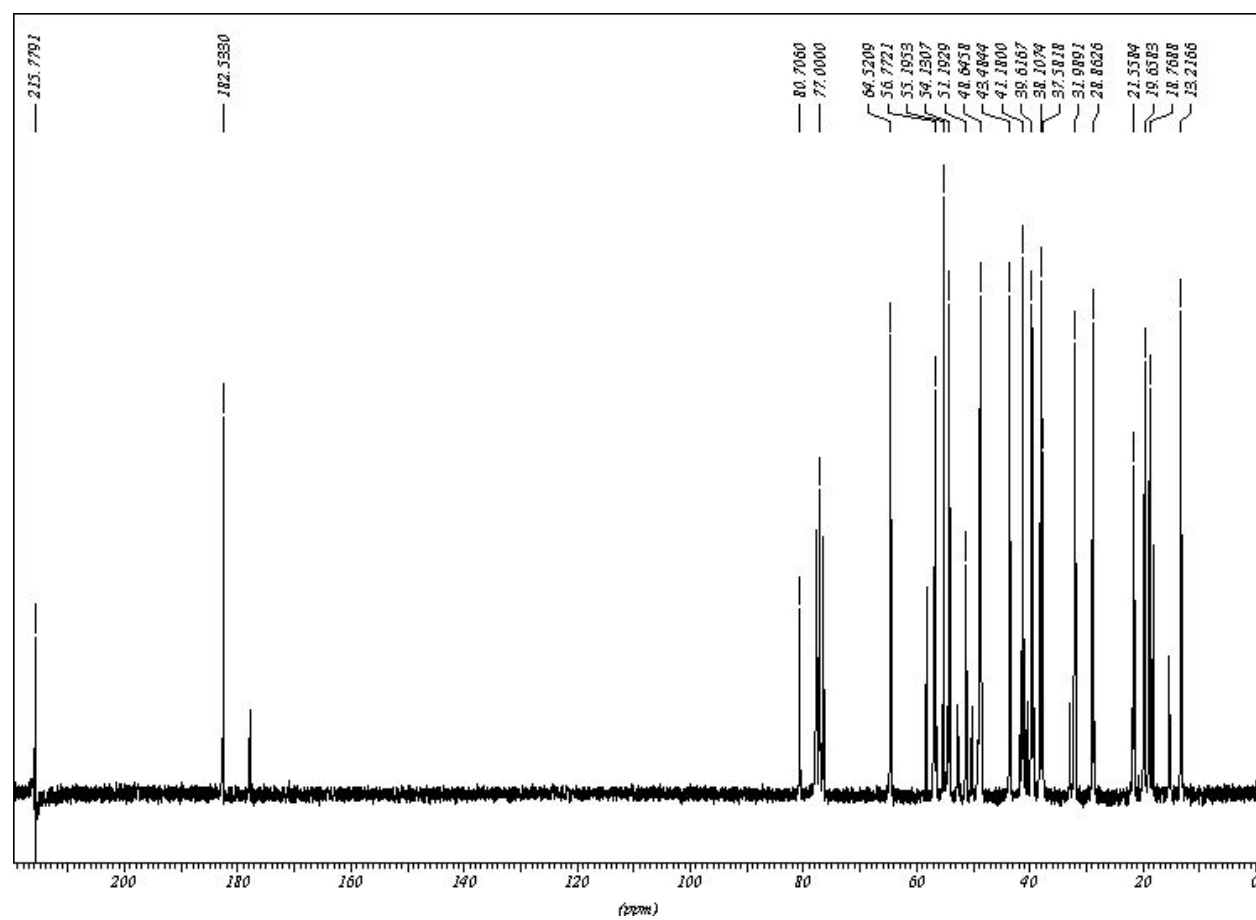


Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do 17-hidroxi-isoesteviol (5)

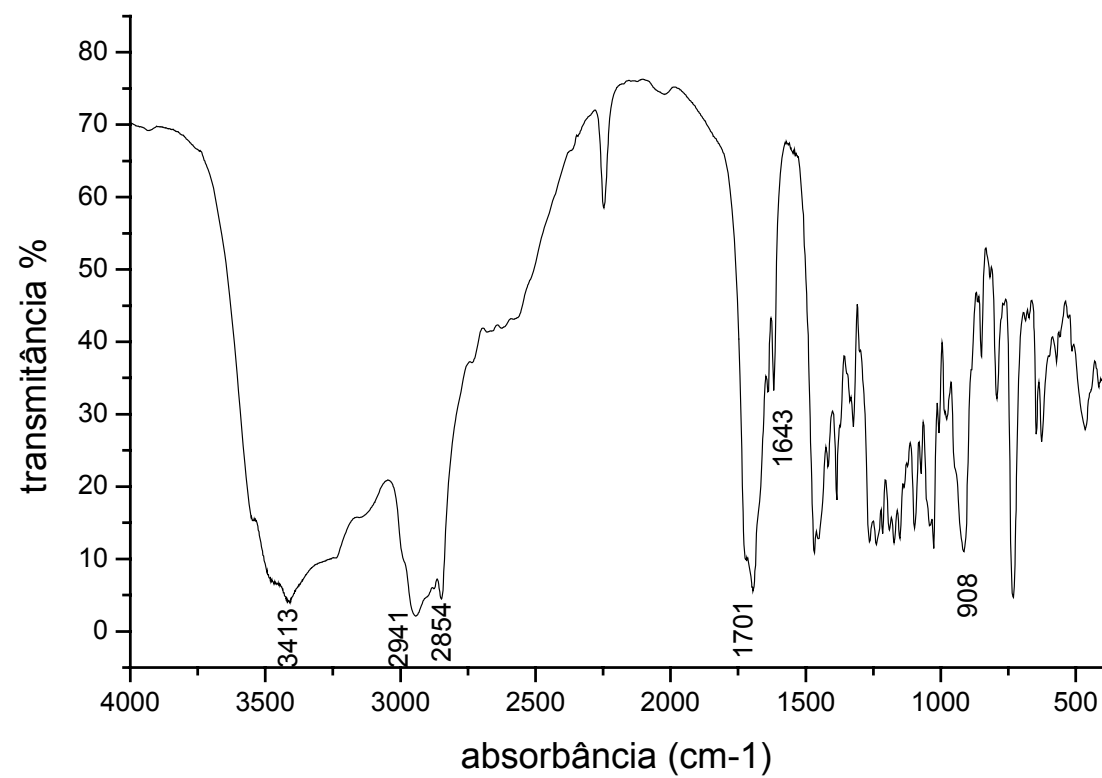


Figura 43: Espectro no IV ácido da oxima do 17-hidroxiisoesteviol (6)

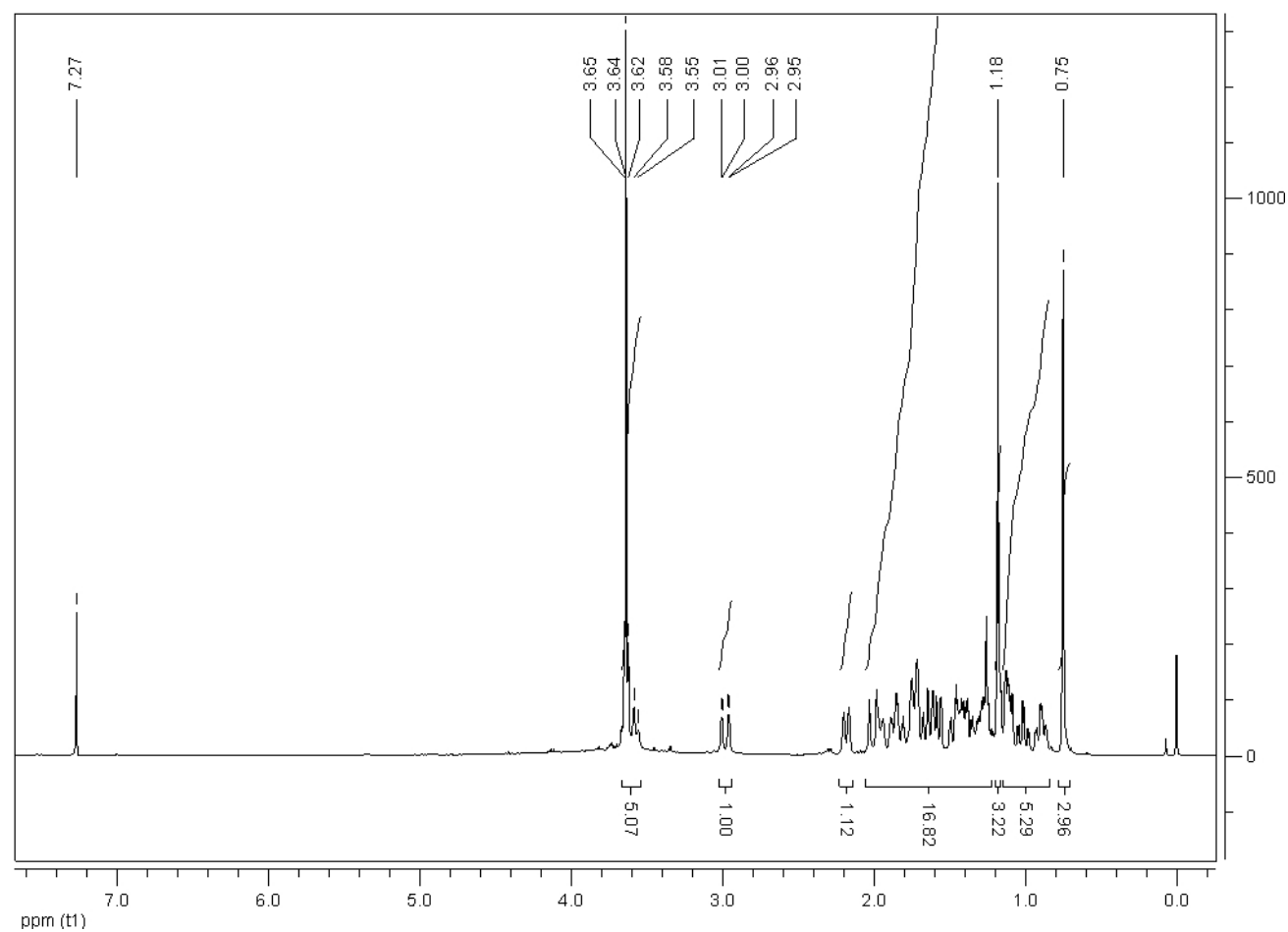


Figura 44: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisosteviol (6)

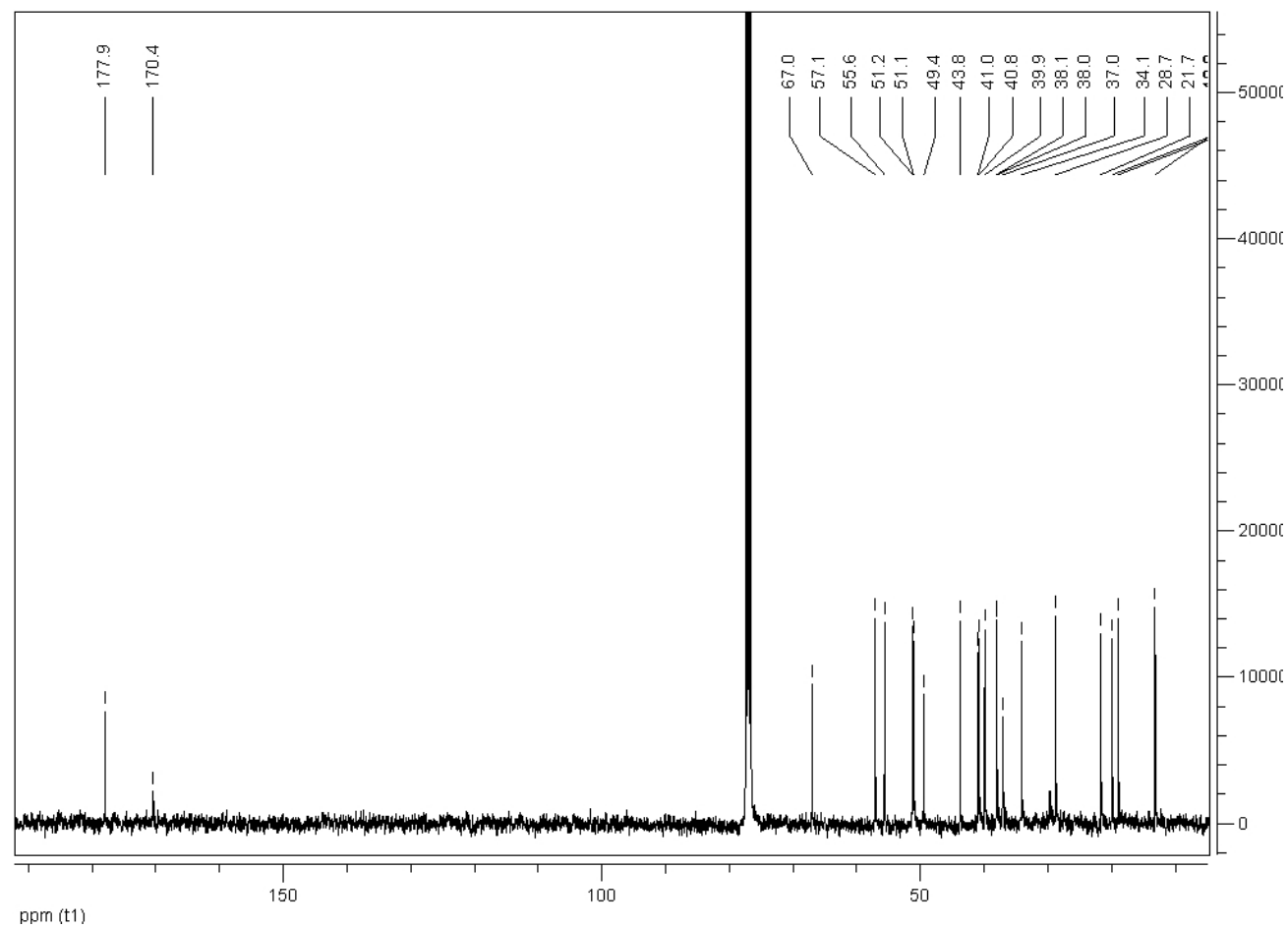


Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisoeleostiol (6)

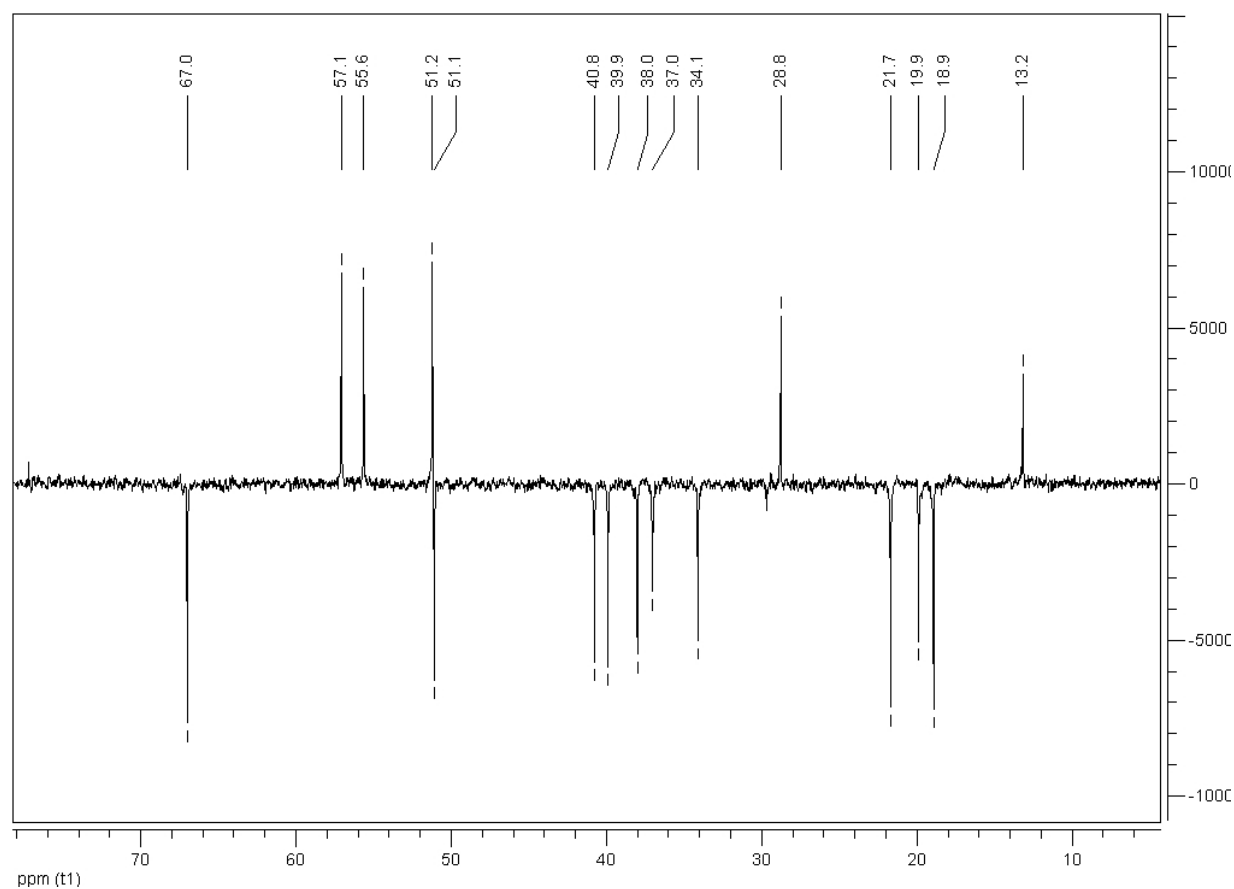


Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C – DEPT (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do 17-hidroxiisosteviol (6)

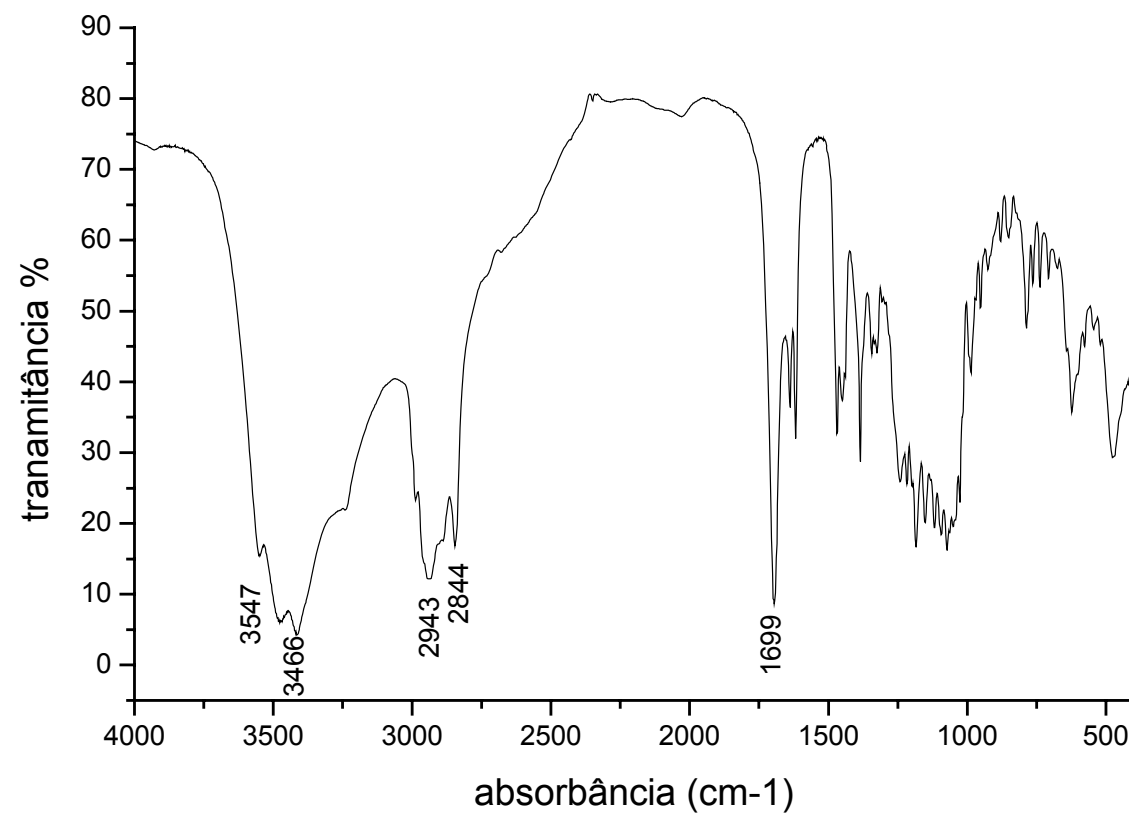


Figura 47: Espectro no IV do ácido ent-16,17-diidrobaieran-19-óico (7)

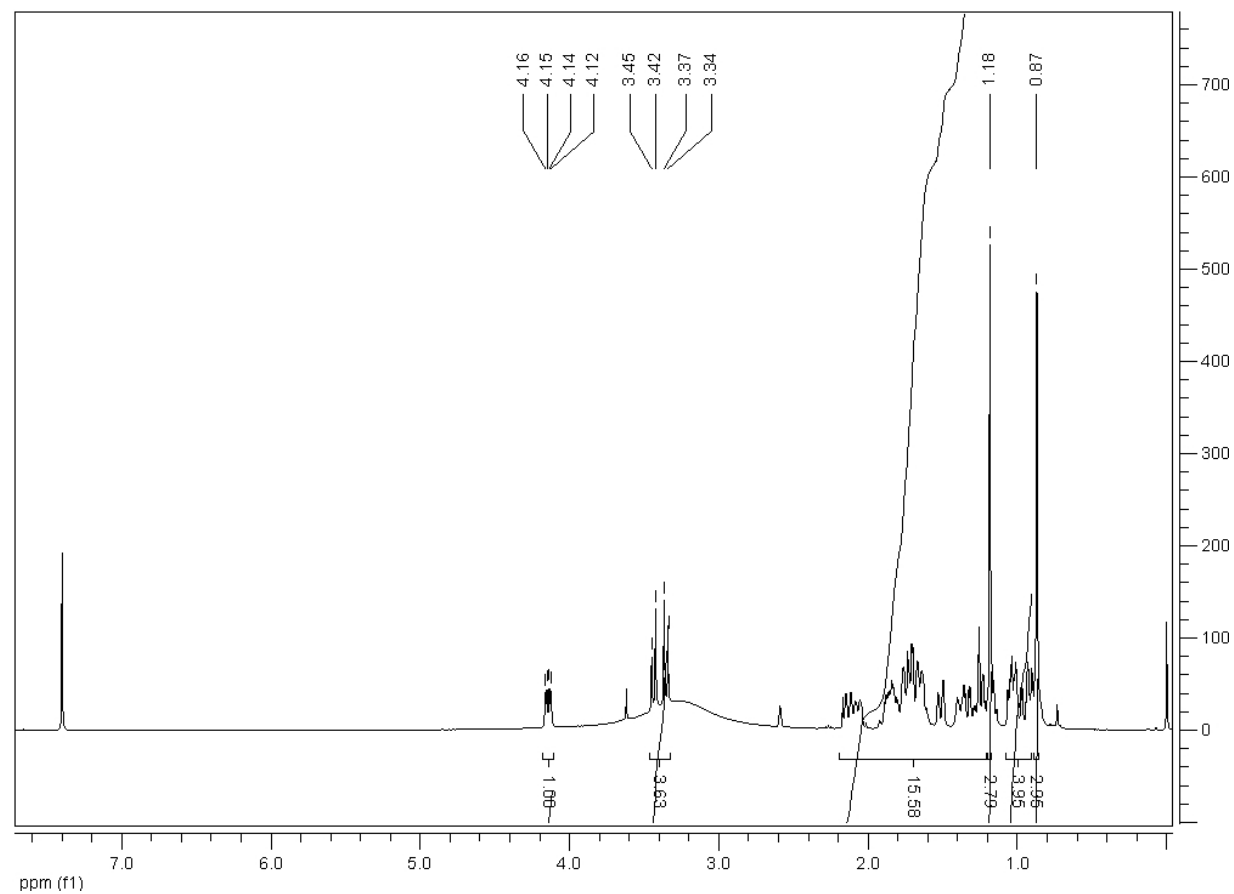


Figura 48: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido ent-16,17-diidrobaieran-19-óico (7)

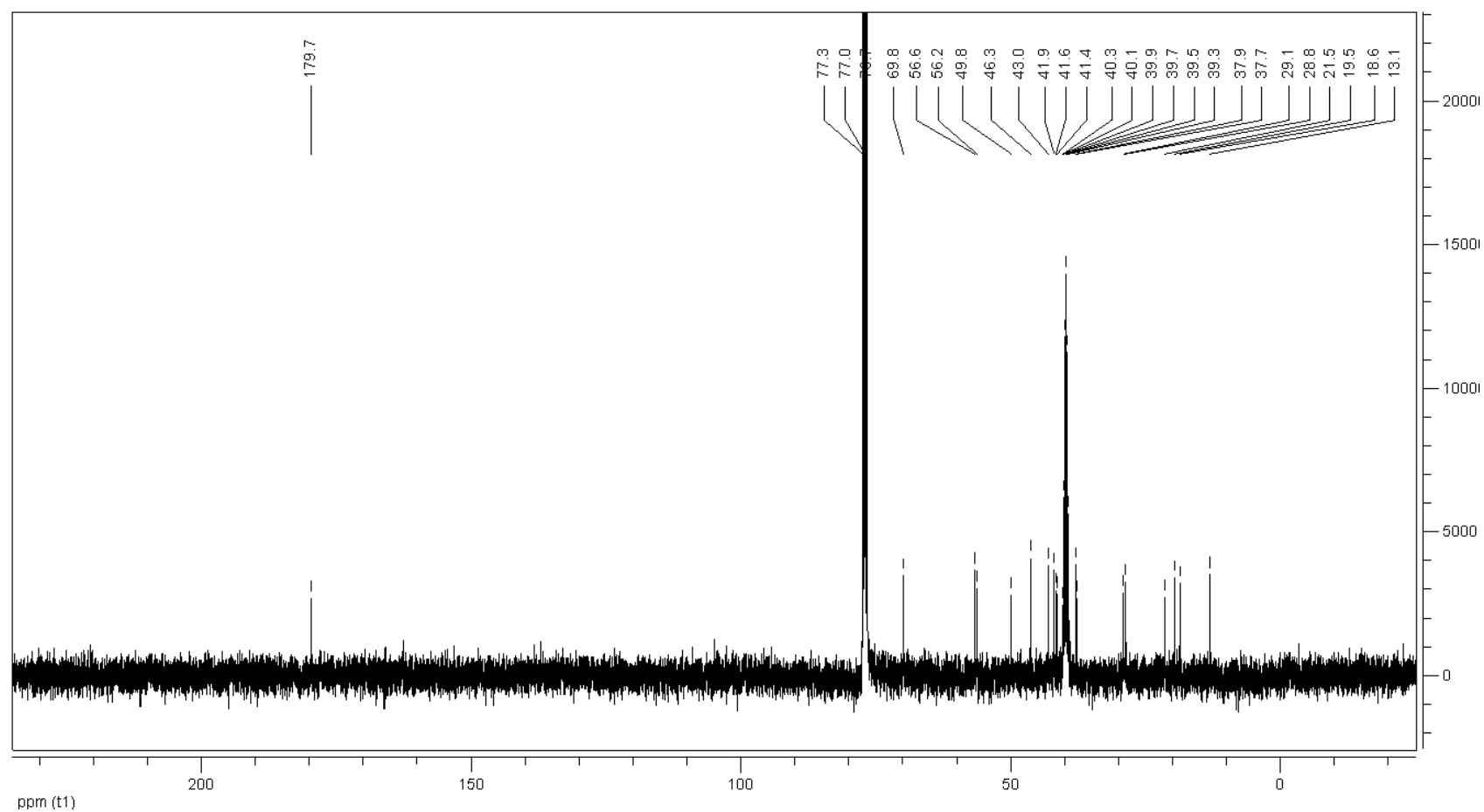


Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para o éster metílico do ácido ent-16,17-diidrobaieran-19-óico (7)

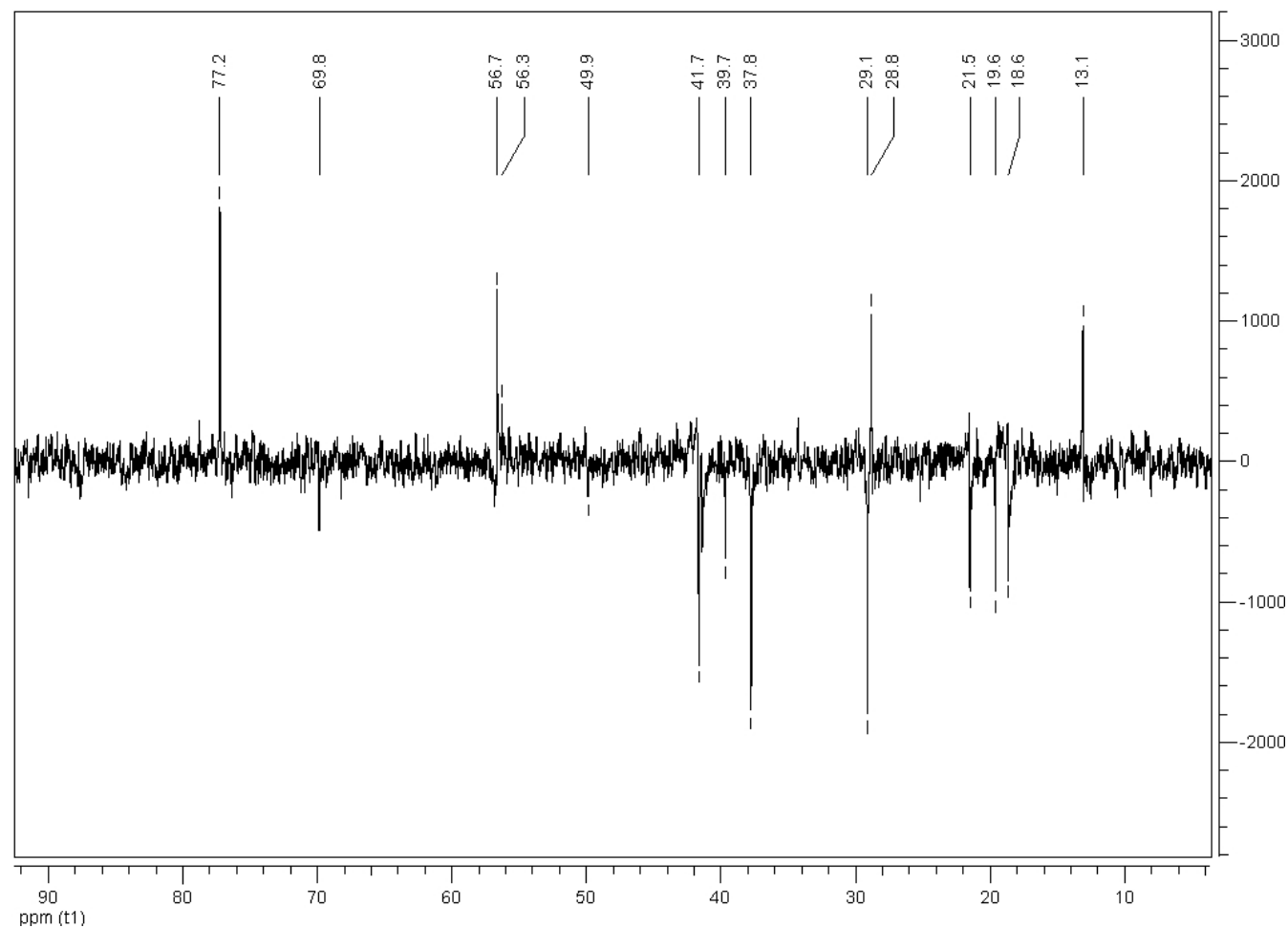


Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C - DEPT (100MHz, CDCl₃) para o éster metílico do ácido ent-16,17-diidrobaieran-19-óico (7)

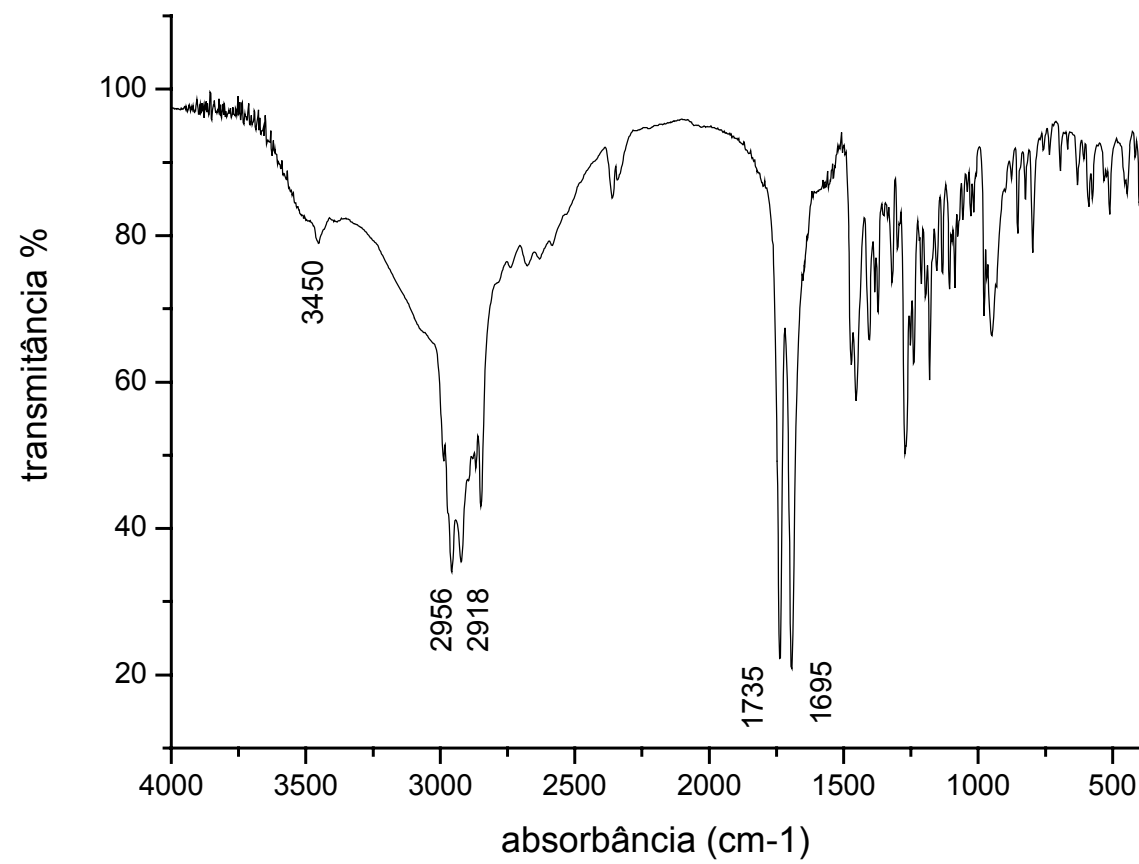


Figura 51: Espectro no IV do isoesteviol (8)

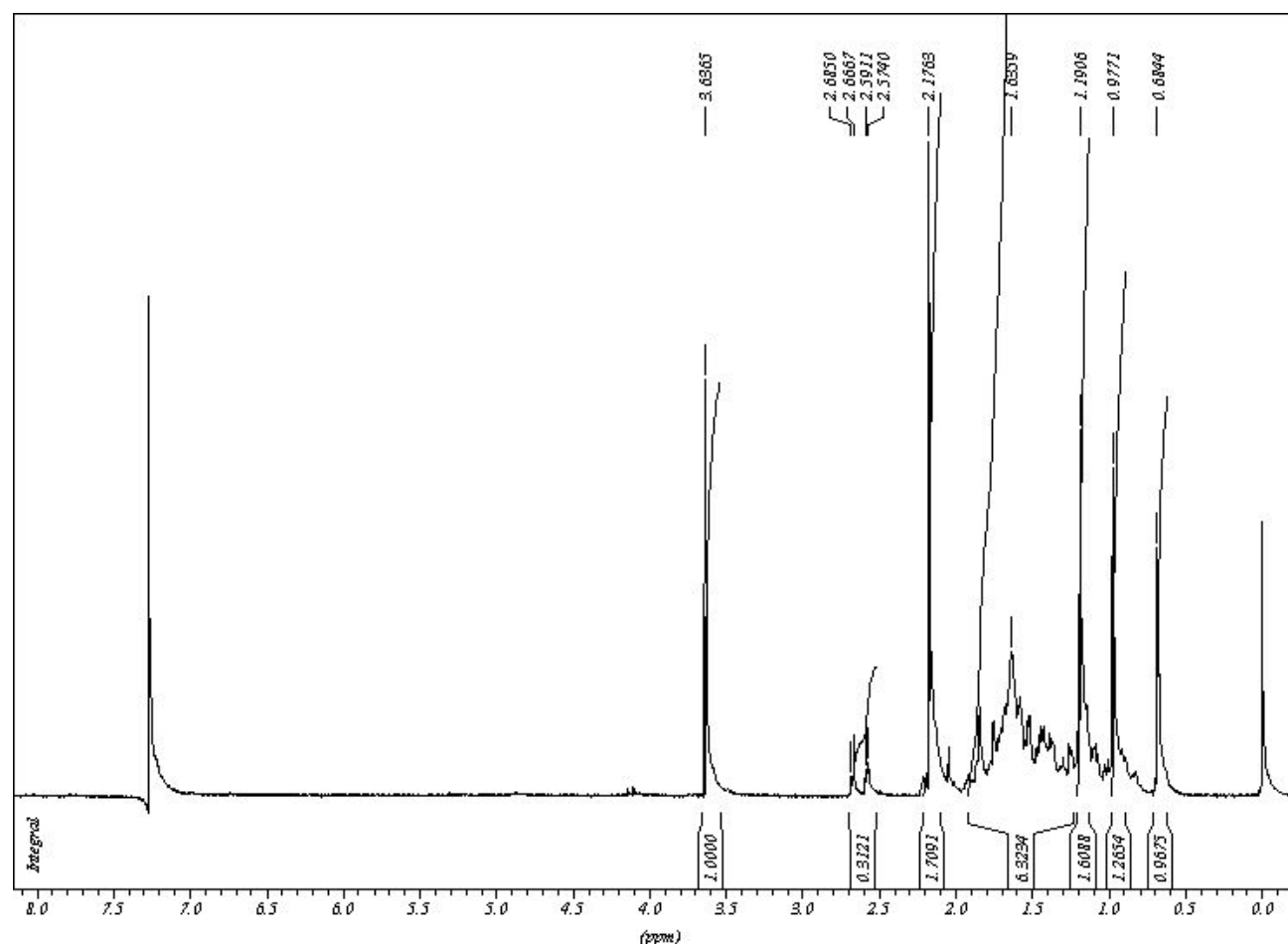


Figura 52: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico do isoesteviol (8)

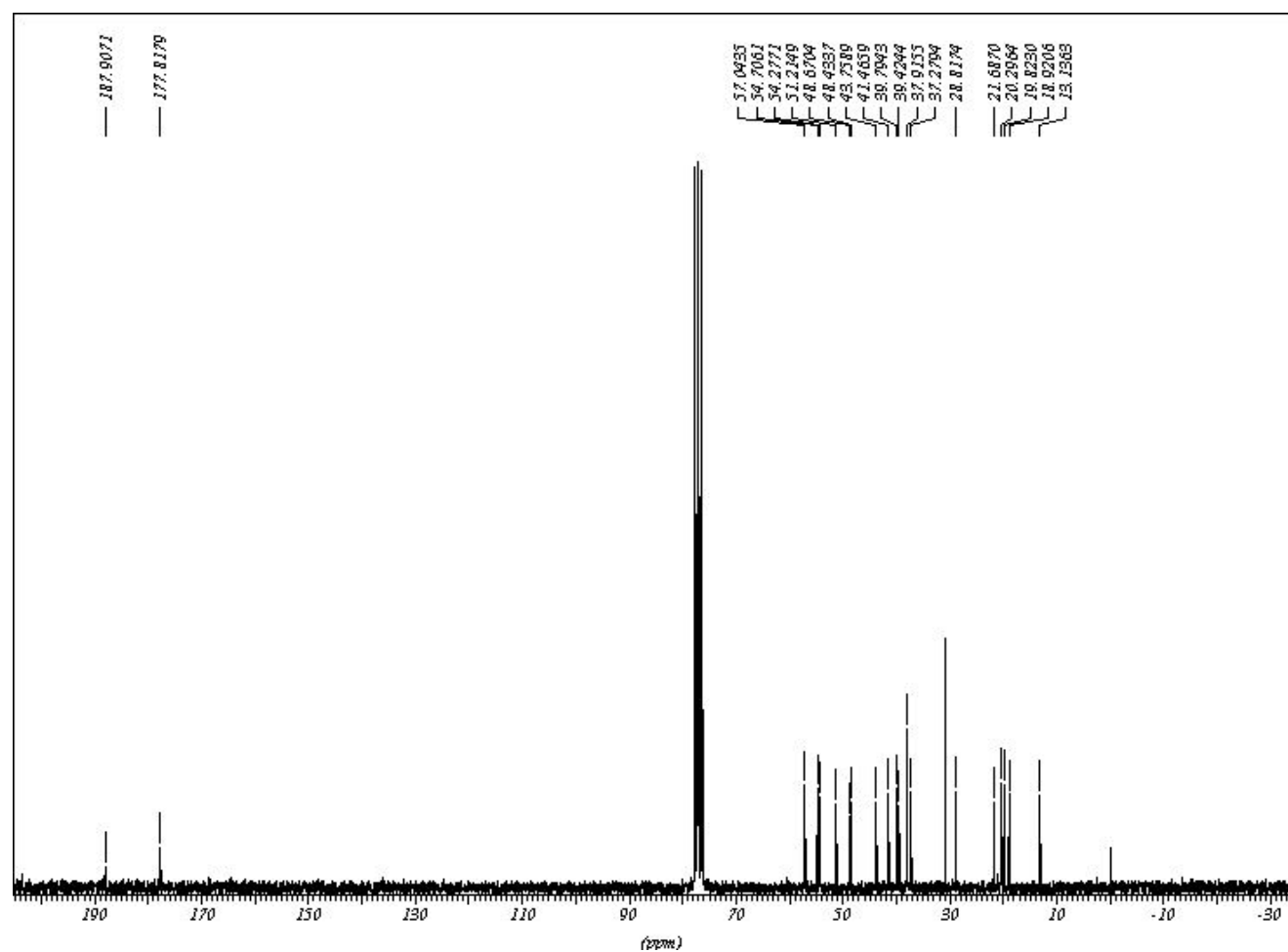


Figura 53: Espectro de RMN ^{13}C (200MHz e 50MHz, CDCl_3) para o éster metílico do isoesteviol (8)

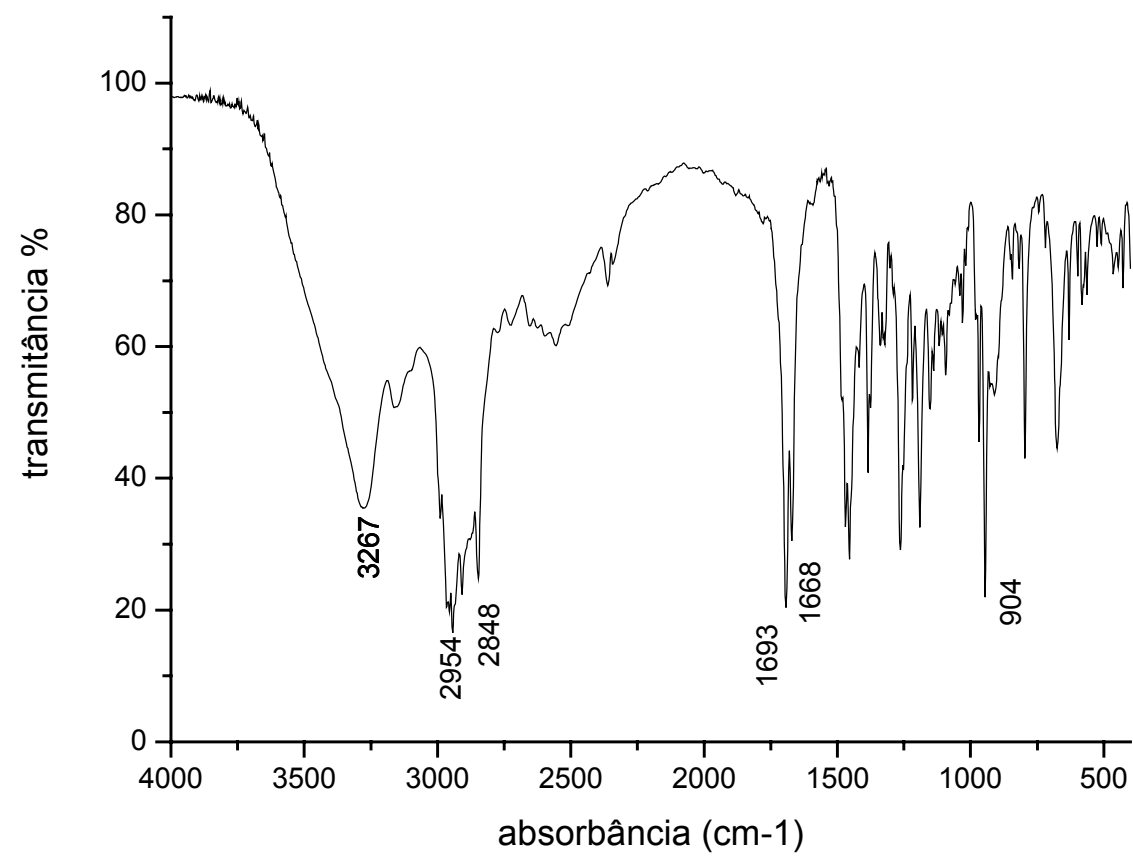


Figura 54: Espectro no IV ácido da oxima do isoesteviol(9)

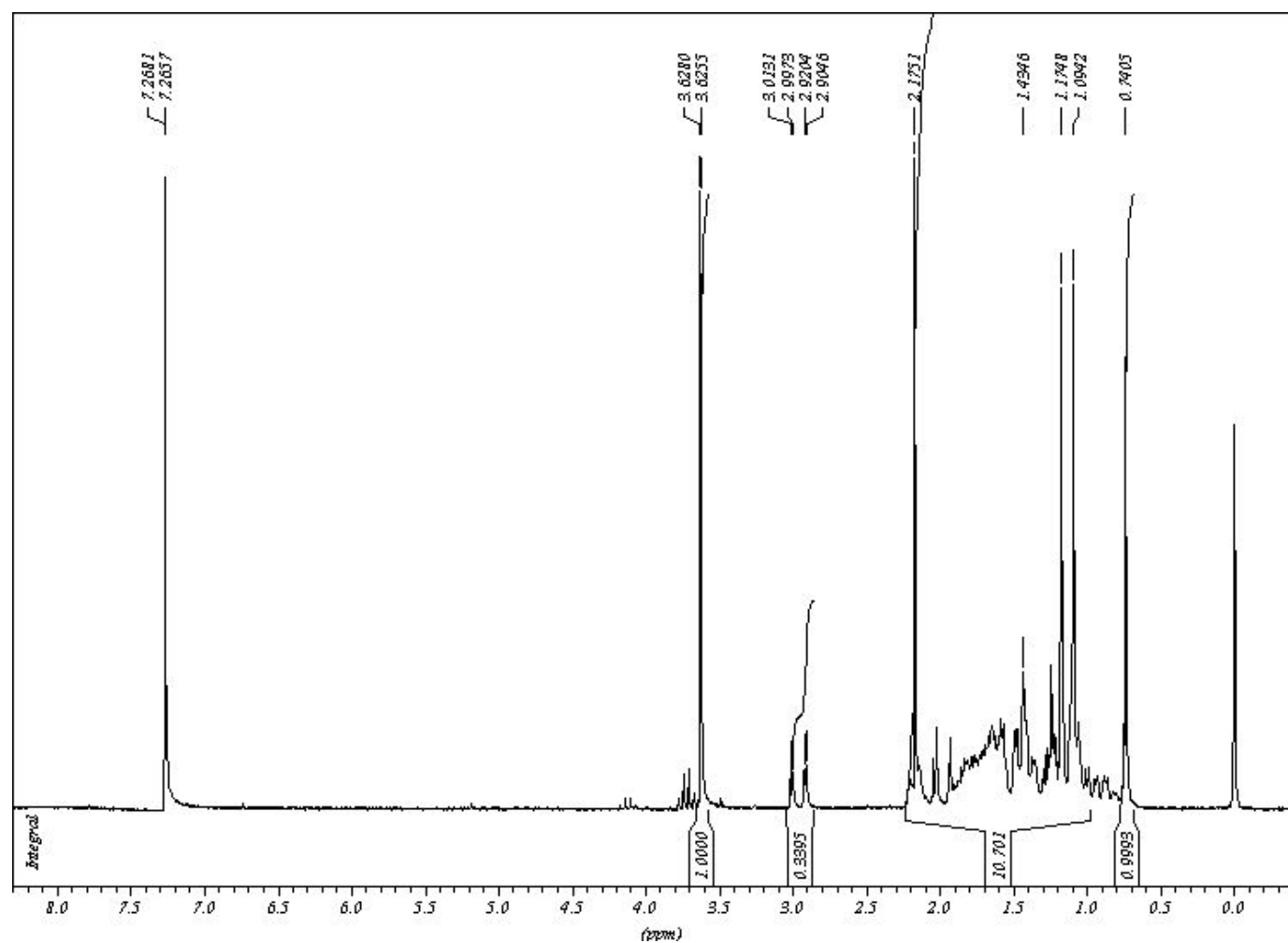


Figura 55: Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do isoesteviol (9)

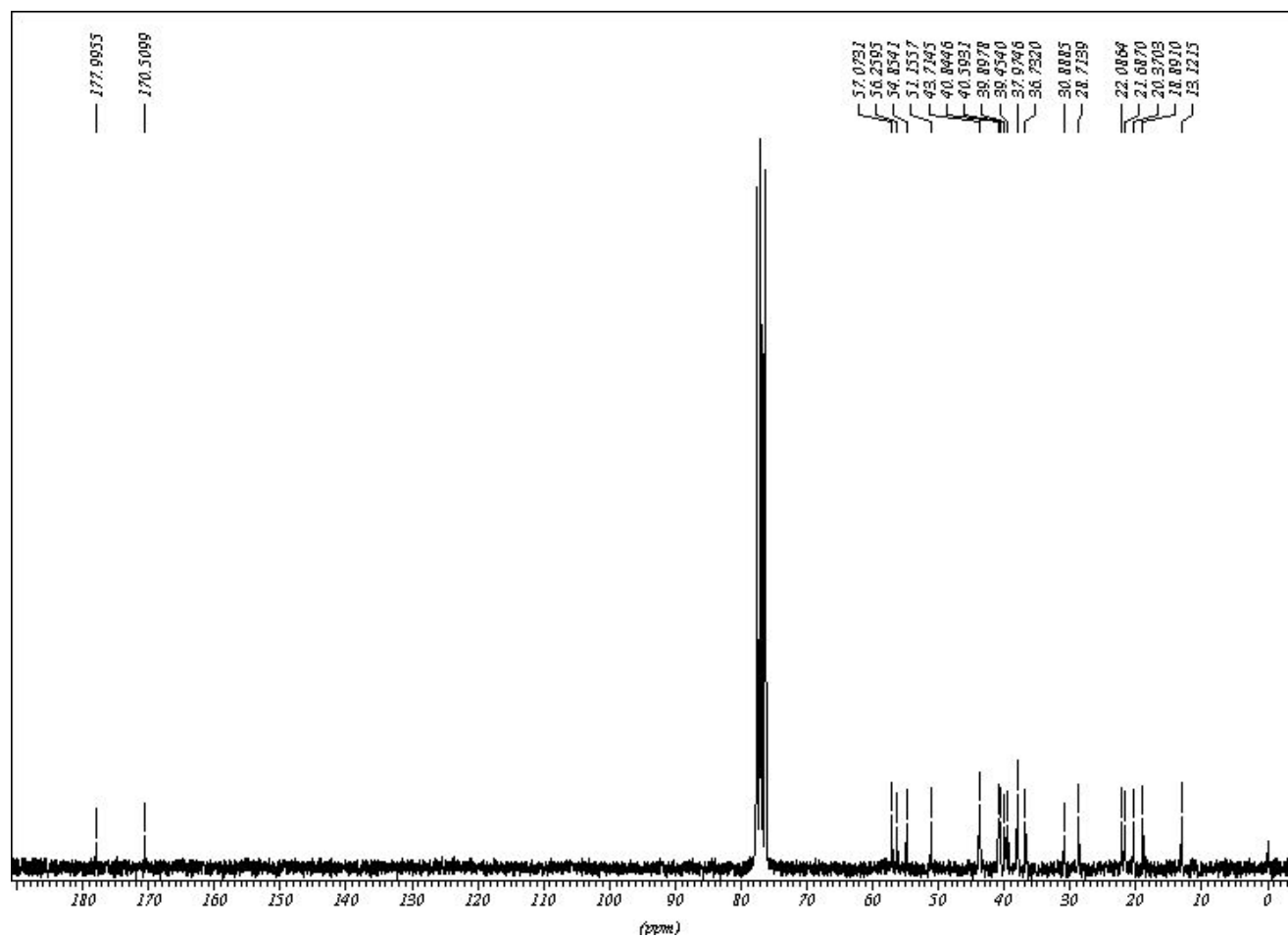


Figura 56: Espectro RMN ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o éster metílico da oxima do isoesteviol (9)