

ESTUDO DO METABOLISMO DO ÁCIDO 2(¹³¹I), 3,5 TRIÍODO BENZÓICO
EM SOJA (*Glycine max*)*

R. Sant'Anna
A.J. Ohlrogge
J.E. Christian
C.E. Breckinridge Jr.**

1. INTRODUÇÃO

As primeiras indicações da atividade regulatória em plantas do ácido 2,3,5 triiodo benzóico (TIBA) surgiram, em 1942, do trabalho de ZIMMERMAN e HITCHCOCK (8). Verificou-se, mais tarde, que numerosas espécies de plantas são, morfológica e fisiologicamente, afetadas pelo TIBA. No caso da soja, GALSTON (3) descreve os seguintes efeitos: perda da dominância apical, decréscimo da altura da planta, epinastia das folhas jovens e prematura abscisão das folhas apicais e botões florais. Em adição, GREER e ANDERSON (4) e SHERBECK e OHLROGGE (7) observaram que as plantas de soja, cultivadas em condições de campo e pulverizadas com o TIBA, passaram, precocemente, do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo e apresentaram acréscimo do rendimento em grãos, atribuído às alterações no tamanho e orientação das folhas, assim como na forma da canópia, permitindo mais eficiente utilização da radiação solar. O endurecimento do caule, maior resistência ao acamamento, redução da distância internodal e aumento do número de sementes foram também assinalados pelos mesmos autores.

A potencialidade do uso do TIBA, em escala comercial, para fins de aumento do rendimento em grãos da soja justificou um estudo da sua absorção foliar, distribuição nas diferentes

* Parte da tese de Ph.D., submetida por Renato Sant'Anna, em 1967, à Universidade de Purdue, Lafayette, Indiana, USA. Os autores agradecem o suporte financeiro recebido da International Minerals and Chemicals Corp., skokie, Illinois, e da Rockefeller Foundation, New York, NY.

Aceito para publicação em 13-08-1975.

** Respectivamente, Professor Adjunto da Universidade Federal de Viçosa, Professores da Universidade de Purdue, Lafayette, Indiana, E.U.A., e Professor da Universidade de Arkansas, Little Rock, Arkansas, E.U.A.

partes da planta e metabolização, de modo a tornar possível uma avaliação das suas propriedades residuais. Em trabalho anterior (6), abordou-se, essencialmente, as duas primeiras fases do estudo, através da utilização do ^{131}I , incorporado ao TIBA, como radiotraçador. O presente trabalho representa parte da complementação daquele estudo e visa a determinar o que acontece com o TIBA, quando foliarmente introduzido na planta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Em dois experimentos de campo, conduzidos na Fazenda da Agronomia da Universidade de Purdue em 1964 e 1965, respectivamente, TIBA, marcado com ^{131}I , na posição 2, foi pulverizado num lote de plantas de soja da variedade Harosoy-63, no início da floração, conforme reportado em (6). Trifóleos de algumas plantas foram protegidos contra o tratamento para fins de estudo da radioatividade translocada. Em 1965, no mesmo local, realizou-se um terceiro experimento, no qual o TIBA foi pulverizado no estágio do início do enchimento das vagens. O quarto experimento (1964) consistiu no pincelamento de folhas de plantas de soja, cultivadas em estufa e em início de floração, com uma solução a 0,2% de TIBA, em etanol a 30%. Estudou-se ainda a fotossensibilidade do composto, pincelando-se, com a mesma solução, os quatro trifóleos superiores de duas plantas, no campo; uma das plantas foi imediatamente coberta com plástico negro, a fim de protegê-la contra a radiação solar, enquanto a segunda permaneceu exposta.

As amostras para análise consistiram do material foliar coletado de 10 plantas, tomadas ao acaso, 5 a 7 dias após o tratamento com o TIBA. Para o teste da fotossensibilidade o tempo de coleta foi de 24 horas, com objetivo de evitar sérios distúrbios fisiológicos na planta coberta. No experimento da aplicação tardia, as amostras foram tomadas em definidos intervalos de tempo. Todo o material coletado foi introduzido em sacos plásticos e armazenado em congelador a -50°C , até processamento.

2.1. Extração.

Em cada caso, 100g de peso fresco de folhas foram homogeneizadas em liquidificador, durante 30 segundos, com 1 litro de etanol a 95%, transferindo-se os homogenatos obtidos para congelador a -50°C , onde permaneceram durante 24 horas, para tornar mais completa a extração. Seguiu-se uma filtração, por sucção, em funil de vidro sinterizado, lavando-se os resíduos sólidos com pequenos volumes do extrator, até completa ausência de cor verde. Os extratos alcoólicos foram, então, quantitativamente transferidos para frascos plásticos de 1 litro, e os resíduos acondicionados em sacos plásticos. A radioatividade foi medida no Contador de Cintilação Líquida para Pequenos Animais da Universidade de Purdue (PUSAC), previamente calibrado para contagem integral do ^{131}I , mantendo-se a geometria das amostras tão constante quanto possível. As contagens foram realizadas em triplicata, durante um período de 1 minuto cada, corrigindo-se os valores obtidos para a radiação de fundo ("background").

2.2. *Purificação e Hidrólise.*

Os extratos alcoólicos obtidos foram submetidos a uma purificação do tipo ácido-base, adaptada da técnica recomendada por BENNET-CLARK e KEFFORD (1). Concentrou-se cada extrato até resíduo aquoso em evaporador ratativo a vácuo e ajustou-se o seu pH para 8,0 com NaOH 0,1N. Seguiu-se uma tripla extração com porções de 15ml de éter sulfúrico, saturado n'água e isento de peróxidos, em funil de decantação, visando a eliminar clorofila e outras substâncias solúveis em éter. As fases atéreas combinadas (Extrato Etéreo I) e o resíduo aquoso da extração (Fase Aquosa I) foram contados para atividade de ^{131}I no PUSAC, como foi anteriormente descrito. Abaixou-se, então, o pH da Fase Aquosa I para 3,0 com ácido acético glacial e procedeu-se à nova tripla extração com éter, obtendo-se o Extrato Etéreo II e a Fase Aquosa II, cujas radioatividades foram igualmente computadas. Com o objetivo de testar a necessidade da purificação, parte dos extratos alcoólicos foram concentrados e cromatografados diretamente; esses extratos foram ainda submetidos às hidrólises ácida (HCl conc.) e básica (NaOH a 50%), procurando verificar-se a existência de produtos de conjugação do TIBA com componentes celulares.

2.3. *Cromatografia.*

Utilizou-se a técnica cromatográfica em papel Whatman nº 1, do tipo monodimensional ascendente. Diante da alta viscosidade dos extratos concentrados, a inoculação dos diversos tratamentos não foi quantitativa, sendo realizada com bastão de vidro, de ponta afilada. A análise cromatográfica realizou-se, basicamente, nos seguintes extratos de folhas: tratadas com TIBA (SL), não tratadas, mas contendo radioatividade translocada (NL), não tratadas, a cujo homogenato ^{131}I - TIBA foi adicionado (controle: C); mantidas no escuro (DET) e expostas à luz (DEC). Incluíram-se, ainda, os hidrolizados ácidos e básicos dos três primeiros tratamentos, as quatro fases líquidas resultantes da purificação, bem como os inóculos correspondentes ao ^{131}I - TIBA e ao Na^{131}I usado na sua síntese. Os seguintes sistemas de solventes foram testados: isopropanol-amônia-água (10:1:1 v/v/v), propanol-amônia-água (10:1:1 v/v/v), n-butanol-ácido acético-água (4:1:1 v/v/v) e n-butanol sat. com amônia 0,005M. A revelação dos cromatogramas procedeu-se de acordo com a técnica autorradiográfica. As chapas radiográficas foram, deliberadamente, superexpostas à radiação (cerca de 3 semanas), para a detecção de possíveis metabolitos de baixa atividade. Preparou-se, também, um grupo de autorradiografias a baixo tempo de exposição (4-5 dias), de modo a permitir a análise quantitativa das manchas mais radioativas dos cromatogramas, evitando-se, deste modo, a ocorrência de uma extensiva decaída isotópica do ^{131}I . Uma vez localizadas, as manchas radioativas foram cortadas dos cromatogramas e introduzidas num pequeno frasco plástico para a determinação da atividade gama num contador de cintilação sólido, do tipo "poço profundo". Fez-se uso da contagem do tipo integral para ^{131}I , corrigindo-se os valores obtidos para a radiação de fundo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Extração.

Os dados do Quadro 1 revelam ter sido incompleta a extração, inclusive no caso da radioatividade adicionada ao homogenato de folhas não tratadas (C). A reextração com etanol a 95%, o uso de éter sulfúrico e etanol a 80% não melhoraram significativamente o rendimento da extração. Nenhum estudo foi conduzido no resíduo sólido contendo a radioatividade insolúvel.

QUADRO 1 - Rendimento percentual da extração da atividade do ^{131}I com etanol a 95%

Tratamento	% de extração
SL ^a	71,7
NL ^a	52,5
C	88,0
DET ^b	83,4
DEC ^b	84,3

^a Amostras coletadas 7 dias após aplicação do TIBA

^b Amostras coletadas 1 dia após aplicação do TIBA

A diferença observada para os tratamentos SL e C pode ser atribuída a várias possíveis causas: maior conversão do TIBA em derivados insolúveis em álcool no primeiro caso, um aumento percentual da fração insolúvel nas folhas tratadas, em consequência da parcial mobilização da atividade solúvel para outras partes da planta, ou, ainda, maior quantidade de atividade solúvel por grama de tecido foliar (atividade específica) no controle, admitindo-se igual "fixação" da radioatividade nos dois tratamentos. Os valores mais elevados dos tratamentos DEC e DET, em relação ao SL, parecem indicar uma dependência do tempo do processo de mobilização e/ou um efeito de maior atividade específica. Essa última possibilidade poderia, igualmente, justificar o baixo rendimento conseguindo para o tratamento NL, que contém apenas radioatividade translocada.

A Figura 1 mostra um declínio aparentemente exponencial do rendimento da extração em função do tempo decorrido após aplicação do TIBA (experimento da pulverização tardia). Partindo de um valor de $84,0 \pm 3,0\%$ para a amostra colhida 12 horas após aplicação do composto, o rendimento atingiu $33,9 \pm 2,4\%$, decorridas 3 semanas. O controle (TIBA adicionado ao homogenato de plantas não tratadas) forneceu $92,7 \pm 0,3\%$. Pode-se explicar a queda observada através da mobilização gradativa da

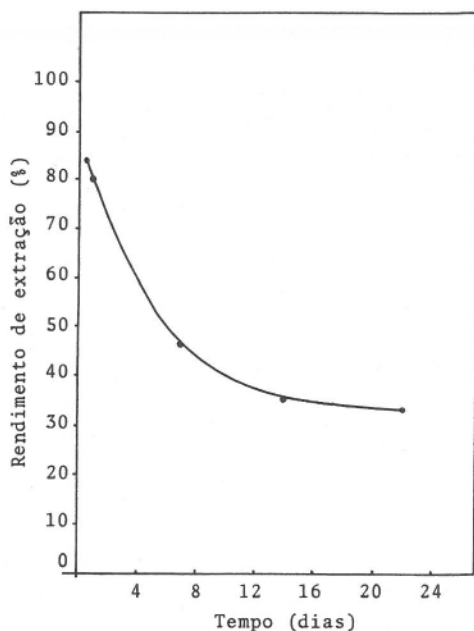


FIGURA 1 - Influência do tempo decorrido após aplicação do TIBA no rendimento da extração da atividade do ^{131}I com etanol a 95% (médias de 3 repetições).

atividade solúvel para outros sítios da planta ou, então, por um aumento da "fixação" da radioatividade com o tempo.

3.2. Purificação.

O Quadro 2 mostra que a relação da distribuição da radioatividade do ^{131}I entre a Fase Aquosa I e o Extrato Etéreo I foi maior para o controle (C), em comparação aos tratamentos SL e NL, sugerindo, nesses últimos, a presença de uma fração menos polar que o TIBA. Quando idêntica confrontação é estabelecida para a Fase Aquosa II e o Extrato Etéreo II, nota-se, claramente, uma recuperação da radioatividade na fase orgânica substancialmente maior para o controle (C). Esta diferença de comportamento pode ser explicada em termos dos distintos graus de desidetação do TIBA, na posição 2, pela radiação ultravioleta da luz solar. Enquanto nas folhas tratadas com TIBA, no campo, houve ampla oportunidade para uma extensiva ação fotolítica no composto, com a conseqüente liberação de iodeto marcado, o efeito foi muito menos acentuado em condições de estufa, diante da ação retentora da radiação UV da cobertura de vidro, e extremamente diminuto, em condições de laboratório (caso do controle). Observe-se que o mesmo fenômeno racionaliza as diferenças obtidas para o tratamento SL, nas duas condições de

QUADRO 2 - Distribuição percentual da atividade do ^{131}I nas fases líquidas resultantes do processo de purificação ácido-base

Fase/tratamento	SL	NL	C
Fase Aquosa I	80 ^b -75 ^c	74 ^c	85
Extrato Etéreo I	20-25	26	15
Fase Aquosa II ^a	62-33	20	5
Extrato Etéreo II ^a	38-67	80	95

^a % da radioatividade remanescente na Fase Aquosa I

^b Folhas tratadas com TIBA em condições de campo

^c Folhas com TIBA em condições de estufa

cultivo das plantas. Ressalte-se que, nas condições de acidez prevalentes na segunda extração etérea, o TIBA é francamente solúvel em éter, ao passo que o iodeto permanece na fase aquosa.

3.3. Cromatografia.

O radiocromatograma da Figura 2 revela o comportamento cro-

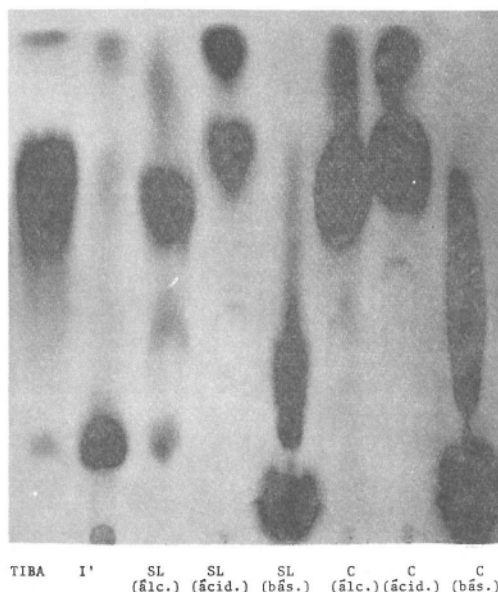


FIGURA 2 - Radiocromatograma dos extratos alcoólicos concentrados das folhas e de seus hidrolizados ácidos e básicos. (Sistema de solventes: n-butanol sat. com amônia 0,005M).

matográfico dos extratos alcoólicos concentrados e seus hidrolizados ácidos e básicos, ^{131}I - TIBA e Na^{131}I , no sistema de solventes de maior poder de resolução. Constatou-se, de início, a presença de impurezas radioquímicas no TIBA e no radioiodeto. Uma das impurezas do TIBA foi, preliminarmente, identificada como iodeto, já que seus Rf coincidiram nos 4 sistemas de solventes empregados. Segundo os dados do Quadro 3, o TIBA apresentou cerca de 93% de pureza radioquímica; o radioiodeto, menos de 60%.

O extrato alcoólico do tratamento SL apresentou mancha de iodeto muito mais densa que o controle, indicando ter ocorrido a remoção de iodeto marcado do TIBA; uma porção substancial do TIBA permaneceu inalterada ou em mistura com o 2,5 DIBA, indistinguível do primeiro nas condições da separação cromatográfica. De fato, conclui-se do Quadro 3 a ocorrência de um decréscimo de 50% do nível percentual do TIBA do tratamento SL, quando comparado com o controle (C), ao passo que aumentaram, significativamente, os teores de iodeto e de dois

QUADRO 3 - Distribuição percentual da atividade do ^{131}I nas principais áreas radioativas dos cromatogramas dos extratos de folhas

Tratamento	TIBA	Iodeto	X_1	X_2
^{131}I -TIBA	93,2 \pm 1,2(6) ^a	1,9 \pm 0,4(6)	2,4 \pm 0,4(6)	1,8 \pm 0,8(3)
Na^{131}I	-	56,9 \pm 3,0(6)	8,4 \pm 2,8(6)	-
C	93,4 \pm 0,2(4)	1,9 \pm 0,8(4)	3,8 \pm 0,2(4)	1,4(2)
SL	50,4 \pm 5,6(7)	24,2 \pm 2,2(7)	9,9 \pm 1,0(7)	13,5 \pm 3,3(3)
DEC	73,6 \pm 2,7(6)	16,0 \pm 3,0(6)	5,4 \pm 1,3(6)	4,0(2)
DET	91,0 \pm 0,7(6)	3,3 \pm 0,5(6)	4,2 \pm 0,5(6)	2,2(2)

^avalores entre parênteses indicam número de repetições.

compostos desconhecidos X_1 (Rf maior que o do TIBA) e X_2 (Rf entre os do TIBA e iodeto). Nota-se, ainda, que as composições percentuais do ^{131}I -TIBA e do controle foram essencialmente iguais, significando uma prática inalterabilidade do TIBA adicionado ao homogenato das folhas não tratadas durante todas as fases do processo.

Em experimento semelhante, BLACKMAN e SARGENT (2) detetaram a presença de ^{131}I -TIBA e de uma pequena quantidade de radioiodeto nos cromatogramas de extratos de *Lemna minor*, conquanto em plantas de centeio e tomateiro, tratadas com o ^{131}I -TIBA, MUNAKATA e NAKAI (5) encontraram apenas o TIBA inaltera-

do.

A hidrólise ácida dos extratos alcoólicos concentrados provocou um decréscimo no nível de iodeto, o oposto ocorrendo para X_1 . Já o tratamento básico degradou, parcialmente, o TIBA, rendendo iodeto e outros compostos radioativos não identificados, além de causar o quase desaparecimento de X_1 .

Quando as fases líquidas resultantes do processo de purificação foram cromatografadas, X_1 não foi detectado na Fase Aquosa I, mas apareceu no radiocromatograma do Extrato Etéreo I, o que lhe forneceu características de baixa polaridade ($R_f \sim 1$). A Fase Aquosa II revelou mancha de iodeto mais intensa do que a do TIBA, contrariamente ao observado para o Extrato Etéreo II, comportamento em perfeito acordo com as naturezas polares distintas dos dois compostos.

Uma vez que a separação cromatográfica dos extratos alcoólicos concentrados diretamente inoculados no papel resultou adequada, a despeito do elevado teor em clorofila e de substâncias lipídicas, abandonou-se o trabalho de purificação, eliminando-se, destarte, o inconveniente do fracionamento da radioatividade pelas várias fases líquidas.

Comparando-se os níveis de iodeto (Figura 3 e Quadro 3) nos

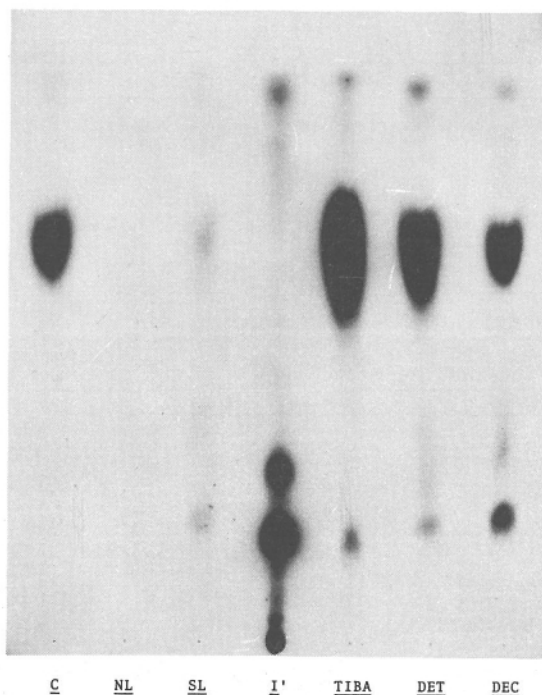


FIGURA 3 - Radiocromatograma de vários extratos alcoólicos concentrados de folhas. (Sistema de solventes: n-butanol sat. com amônia 0,005M).

tratamentos DET (planta coberta), DEC (planta exposta) e C (controle), nitidamente se demonstra que o processo de desiodetação do TIBA, na posição 2, é, essencialmente, se não totalmente, provocado pela radiação ultravioleta da luz solar. A intensidade do fenômeno parece ser dependente do tempo de exposição, a julgar-se pelos níveis de iodeto em DEC (16,0%) e SL (24,2%), cujas plantas foram expostas à radiação solar por 1 e 7 dias, respectivamente.

Como o iodeto, X_1 e X_2 foram detetados também no ^{131}I -TIBA e no controle, propõe-se terem sido os mesmos produtos da fotólise do TIBA e não verdadeiros metabolitos.

4. RESUMO

Plantas de soja da variedade Harosoy-63 foram tratadas com uma solução do ácido 2(^{131}I), 3,5, triiodo benzóico (TIBA) em condições de campo (pulverização) e em condições de estufa (pincelamento). A época de aplicação correspondeu ao início da floração, exceto para o experimento da pulverização tardia, quando coincidiu com o início do enchimento das vagens. A fotodecomposição do TIBA foi testada, protegendo-se uma das plantas tratadas no campo contra a radiação solar. A extração da radioatividade com etanol a 95% rendeu cerca de 70% para as folhas tratadas e quase 90% para o controle, constituído do homogenato de folhas não tratadas mais TIBA. O rendimento da extração alcoólica decresceu exponencialmente com o tempo decorrido após aplicação do TIBA, indicando a importância do mesmo no processo de mobilização ou de "fixação" da atividade solúvel. A purificação do tipo ácido-base aplicada aos extratos alcoólicos revelou diferenças nos coeficientes de partição da radioatividade presente nos tratamentos e no controle, atribuídas à existência, nos tratamentos, de compostos distintos do TIBA, principalmente o iodeto. Os radiocromatogramas dos extratos foliares mostraram 4 áreas radioativas principais: TIBA, iodeto e dois componentes não identificados X_1 e X_2 . A desiodetação do TIBA, na posição 2, tornou-se evidente pelo aumento do nível de iodeto e decréscimo do teor de TIBA nas folhas tratadas, em comparação com o controle. Os níveis de X_1 e X_2 também cresceram. A ação fotolítica dos raios ultravioleta da luz solar, como se demonstrou no teste da fotossensibilidade, foi a principal, se não a única causa do fenômeno, parecendo ser dependente do tempo de exposição. Admite-se que o iodeto X_1 e X_2 são produtos da fotodegradação do TIBA, ao invés de verdadeiros metabolitos.

5. SUMMARY

2(^{131}I), 3,5 triiodobenzoic acid (TIBA) was applied on field and greenhouse grown soybeans (Harosoy-63) by spraying and by leaf brushing, respectively. Time of application corresponded to the onset of flowering, exception for the late spray experiment when it coincided with the pod filling stage. The TIBA photodecomposition was tested by protecting one field treated plant against sunlight. A single extraction with 95% ethanol yielded 70% for the treated leaves and almost 90% for the control, an homogenate of non treated leaves to which labelled TIBA was added. A declining and apparently exponen-

tial relationship was obtained when the yield of the alcoholic extraction was plotted against the time elapsed from spraying, what indicated that time was an important variable in the soluble activity "fixation" or mobilization to other plant parts. The acid-base purification study showed that the radioactivity of the treated leaves and of the control extracts partitioned differently between the organic and the aqueous phases, seeming to indicate the existence of compounds others than TIBA, mainly iodide, in the treated leaves. The radiochromatograms of the leaf extracts revealed the presence of 4 main radioactive spots: TIBA, iodine and 2 unknowns X_1 and X_2 . TIBA deiodination at position 2 became evident by the increased iodide and decreased TIBA levels in the treated leaves as compared with the control. X_1 and X_2 contents also rose. The sunlight UV radiation action, as shown by the photosensitivity test, was the main, if not the only cause, appearing to be time dependent. Iodide, X_1 and X_2 are thought to be TIBA light degradation products rather than true metabolites.

6. LITERATURA

1. BENNET-CLARK, T.A. & KEFFORD, N.P. Chromatography of the growth substances in plant extracts. *Nature* 171: 645-647. 1953.
2. BLACKMAN, G.E. & SARGENT, J.A. The uptake of growth substances. II. The absorption and accumulation of 2,3,5 triiodobenzoic acid by the root and frond of *Lemna minor*. *J. Exptl. Bot.* 10: 480-503. 1959.
3. GALSTON, A.W. Effect of 2,3,5 triiodobenzoic acid on the growth and flowering of soybeans. *Am. J. Bot.* 34:356-360. 1947.
4. GREER, H.A.L. & ANDERSON, I.C. Response of soybeans to triiodobenzoic acid under field conditions. *Crop Sci.* 5: 229-332. 1965.
5. MUNAKATA, K. & NAKAI, A. Absorption and translocation of ^{131}I -2, 3,5 triiodobenzoic acid. *J. Agr. Food Chem.* 7: 176-178. 1959.
6. SANT'ANNA, R., OHLROGGE, A.J., CHRISTIAN, J.E. & BRECKINRIDGE JR., C.E. Foliar absorption and distribution of 2,3,5 triiodobenzoic acid (TIBA) in soybeans (*Glycine max*). *Agr. J.* 62: 731-736. 1970.
7. SHERBECK, T.G. & OHLROGGE, A.J. A study of soybean row spacing and foliar application of 2,3,5 triiodobenzoic acid. Final Report Directed to International Minerals and Chemicals Co., Skokie, Illinois. June, 1965.
8. ZIMMERMAN, P.W. & HITCHCOCK, A.E. Substituted phenoxy and benzoic acid growth substances and the relation of structure to physiological activity. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 12: 321-343. 1942.