

METABOLISMO DO ÁCIDO 7 - ^{14}C - 2,3,5 TRIODO BENZÓICO (TIBA)

EM SOJA (*Glycine max*)*

R. Sant'Anna
A.J. Ohlrogge
J.E. Christian**

1. INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior (2), demonstrou-se a fotodegradação parcial do TIBA aplicado a plantas de soja pela radiação ultravioleta da luz solar, a qual provocou, dentre outros efeitos, a remoção do ^{131}I , da posição 2, com a conseqüente formação de iodeto. Tal fato impediu a detecção e o reconhecimento da fração não radioativa resultante, mais provavelmente, o ácido 3,5 diodo benzóico (3,5 DIBA). Deste modo, tornou-se interessante o emprego do ^{14}C - carboxi - TIBA como alternativa, dando ensejo a um estudo comparativo dos dois tipos de marcações isotópicas. Além disso, o uso de um radiotraçador de longa meia vida, como o C-14, possibilitaria o estudo da radioatividade translocada para as sementes, inegavelmente a parte mais importante da planta sob o aspecto residual.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Num experimento de campo, conduzido em 1965, na Fazenda da Agronomia da Universidade de Purdue, um lote de 650 plantas de soja, variedade Harosoy-63, foi pulverizado no início da floração, com 3,7 litros de uma solução aquosa, contendo 130 ppm de 7 - ^{14}C - TIBA. Cada planta recebeu, teoricamente, 1 mg do composto e 5 μCi de ^{14}C . Após a maturação, as sementes foram colhidas e armazenadas à temperatura ambiente.

Extração. Cinquenta gramas das sementes radioativas foram ho-

* Parte da tese de Ph.D., submetida pelo primeiro autor, em 1967, à Universidade de Purdue, Lafayette, Indiana, E.U.A. Os autores agradecem o suporte financeiro recebido da International Minerals and Chemicals Corp., Skokie, Illinois, e da Rockefeller Foundation, New York, N.Y.

Aceito para publicação em 6-10-1975.

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

mogeinizadas em líquidificador, durante 3 minutos, com 250 ml de etanol a 95%. Completado o volume para 500 ml, o homogenato sofreu agitação magnética, durante 18 horas, para facilitar a extração. Seguiram-se uma filtração, por succão, em funil de vidro sinterizado, e 6 lavagens do resíduo sólido com porções de 30 ml do extrator. Estabeleceu-se, também, um controle, processando-se, de idêntico modo, sementes de plantas não tratadas e adicionando-se ^{14}C - TIBA ao homogenato obtido anteriormente à agitação magnética. Três alíquotas de 2 ml dos extratos alcoólicos foram tomadas para a determinação da atividade do ^{14}C .

Purificação e Hidrólise. Os extratos alcoólicos, após concentração a vácuo até resíduos aquosos, sofreram uma purificação do tipo ácido-base, uma vez que a sua relativa riqueza em óleos impossibilitou o estudo cromatográfico direto. Cada resíduo aquoso teve o seu pH ajustado para 9,0 com NaOH 0,1 N, seguindo-se tripla extração com porções de 15 ml de éter sulfúrico em funil de decantação, obtendo-se o Extrato Etéreo I (fases etéreas combinadas) e a Fase Aquosa I (resíduo aquoso da extração). Esta, por sua vez, após redução do seu pH para 3,0 com ácido acético glacial, sofreu nova tripla extração com éter sulfúrico, rendendo o Extrato Etéreo II e a Fase Aquosa II. Um segundo tipo de controle foi delineado, submetendo-se o ^{14}C - TIBA padrão ao mesmo processo. Coletaram-se 3 alíquotas de 1 ml de cada fase líquida resultante da purificação ácido-base, para cômputo da atividade do ^{14}C . Para o estudo hidrolítico, tomaram-se 3 alíquotas de 100 ml de cada extrato alcoólico; as duas primeiras foram refluxadas com 10 ml de HCl conc. e 5 g de KOH, respectivamente, durante 24 horas, enquanto a terceira, usada como tal, serviu como ponto de referência. Seguiram-se uma concentração a vácuo até 10% do volume original e o processo de purificação.

Cromatografia. Desde que a primeira fração etérea obtida do processo de purificação continha a maior parte da radioatividade do extrato das sementes, pretendeu-se separá-la do material lipídico por cromatografia em coluna de alumina. Para esse fim, preparou-se uma camada de alumina (Adsorption: 80-200 mesh, Fisher Scientific Co.) em bureta de 50 ml, com altura útil de 45 cm, empregando-se o n-hexano como solvente de acondicionamento. Alíquotas dos Extratos Etéreos I e II dos diferentes tratamentos foram aplicadas, de cada vez, a uma coluna recém-preparada. Procedeu-se à eluição com uma série de solventes, na seguinte ordem crescente de polaridade: n-hexano, n-hexano + éter sulfúrico (3:1 e 1:1 v/v); éter sulfúrico; etanol; etanol + ácido acético (9:1 v/v) e etanol + amônia conc. (9:1 v/v). Os volumes usados, arbitrariamente escolhidos, foram: 70, 45, 65, 50, 75, 35 e 35 ml, respectivamente. Utilizou-se um fluxo de 0,5 ml/min, recolhendo-se frações de 12 ml. Alíquotas de 2 ml de cada fração coletada tiveram determinadas as suas atividades de ^{14}C .

Testou-se, também, a separação em colunas de Sephadex LH-20 (25-100 μm , Pharmacia Fine Chemicals, Co.), de 95 cm de altura útil e diâmetro interno de 1,2 cm, preparadas em etanol a 95%. As amostras injetadas corresponderam aos extratos alcoólicos concentrados dos tratamentos. Efetuou-se a eluição com etanol

a 95%, num fluxo de 0,4 ml/min, recolhendo-se 110 frações de 13 ml, em cada caso. Aliquotas de 2 ml das frações eluidas tiveram, então, as suas radioatividades medidas.

Contagem por Cintilação Líquida. As contagens foram realizadas no TRICARB (Packard Instrument Co.), um contador de cintilação líquida de pequeno volume interno, com largura de janela ajustada entre 100-900 unidades e ganhos de 10% (sols. aquosas) e 15% (sols. de solventes orgânicos). Cada amostra foi contada por um período de 10 minutos, corrigindo-se os valores obtidos para a extinção (técnica do padrão interno) e radiação de fundo. O líquido de cintilação para a contagem das soluções aquosas consistiu do sistema XDC (xileno-dioxano-cellosolve 1:3:3 v/v/v), contendo 1% de 2,5 difeniloxazol (PPO) e 0,5% de dimetil 1,4 bis-2- (5 feniloxazolil) - benzeno (dimetil POPOP). A mistura tolueno-cellosolve (1:1 v/v), adicionada de PPO (0,4%) e dimetil POPOP (0,01%) serviu para as medições das soluções de solventes orgânicos. Em todos esses casos utilizou-se um volume constante de 15 ml do líquido de cintilação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração. A extração alcoólica solubilizou apenas 65% da radioatividade das sementes das plantas tratadas com o TIBA (T), e cerca de 90% para o controle (Quadro 1), comportamento semelhante ao observado no trabalho com o $^{2-131}$ I - TIBA.

A atividade residual do material sólido, embora importante, não foi matéria de investigações posteriores.

QUADRO 1 - Rendimento percentual da atividade do ^{14}C pela extração com etanol a 95%

Tratamento	Percentagem de extração
T (sementes radioativas)	65,1 ^a \pm 5,0(3) ^b
C (controle)	89,3 ^c \pm 2,3(3)

^a baseado no valor de 2.734 cpm/g de semente encontrado por Spitznagle et alii (3)

^b número de repetições da extração

^c percentagem de recuperação da atividade adicionada.

Purificação. Quase 70% da radioatividade do extrato das sementes radioativas (T) foram carreadas para o Extrato Etéreo I a pH 9,0, conjuntamente com substâncias de natureza lipídica (Quadro 2). Para o ^{7-14}C - TIBA padrão (C₁), o valor foi de apenas 1,6%. Tudo indica, portanto, a presença em T de compostos de baixa polaridade, possivelmente conjugados do TIBA.

No caso do controle (C), a percentagem da radioatividade na primeira fase orgânica foi também elevada; contudo, o seu

nível caiu para quase um terço do valor original quando uma alíquota do extrato alcoólico foi utilizada ao invés do extrato integral concentrado; o mesmo fenômeno não se repetiu para o caso das sementes radioativas (T). É provável que, no controle, tenha ocorrido a formação de artefatos pouco polares, cuja quantidade dependeu da concentração do TIBA e de componentes celulares desconhecidos. Com relação ao Extrato Etéreo II, a recuperação da radioatividade a pH 3,0 foi maior em C do que em T, sugerindo a presença, nesse último, de compostos mais polares que o próprio TIBA.

QUADRO 2 - Distribuição percentual da atividade do ^{14}C nas fases líquidas resultantes do processo de purificação ácido-base

Fase/tratamento	T	C	C_1
Extrato Etéreo I	69,6 (68,6) ^a	47,8 (17,0)	1,6
Fase Aquosa I	30,4 (31,4)	52,2 (83,0)	98,4
Extrato Etéreo II	87,7 ^b	97,2	-
Fase Aquosa II	12,3	2,8	-

^a valores obtidos com alíquotas dos extratos alcoólicos concentradas para o mesmo volume final dos extratos integrais.

^b percentagem da radioatividade remanescente na Fase Aquosa I.

Hidrólise. O Quadro 3 mostra que a hidrólise ácida promoveu enriquecimento da atividade de ^{14}C no Extrato Etéreo I: 4,2% para T e acima de 40% para C. Supõe-se que o tratamento ácido aumentou, de alguma forma, a disponibilidade de substâncias capazes de reagir com o TIBA, formando produtos de grande solubilidade em eter. Por outro lado, a hidrólise básica reduziu a atividade da fase etérea para valor praticamente igual ao encontrado para o 7 - ^{14}C - TIBA (C_1), sugerindo uma ação hidrolítica em produtos de condensação do TIBA. Pode-se concluir, também, que os ácidos graxos não incorporaram ^{14}C em quantidades significantes.

Cromatografia. A cromatografia em coluna de alumina do Extrato Etéreo I a pH 9,0, correspondente ao tratamento T, deu origem a 3 picos radioativos: X, Y e Z, contendo, respectivamente, 45; 36, e 13% do total da radioatividade eluída (Figura 1). Atribuiu-se um caráter não polar a X, não retido pela coluna; leveamente polar para Y, eluído pela mistura n-hexano e eter sulfúrico, e mais polar para Z, removido pelas misturas etanol + ácido acético e etanol + amônea. O 7 - ^{14}C - TIBA padrão e o Extrato Etéreo II renderam apenas Z, quando cromatografados nas mesmas condições; isto permitiu a identificação provisória de Z como TIBA livre ou TIBA associado com compostos bastante relacionados, como o 3,5 DIBA e o 2,5 DIBA.

O Extrato Etéreo I do controle apresentou as mesmas frações radioativas, com a seguinte distribuição percentual da radioa-

tividade: 1,5; 58,8 e 33,5%, para X, Y e Z, respectivamente.

QUADRO 3 - Distribuição percentual da atividade do ^{14}C no extrato etéreo I e na fase aquosa I dos extratos alcoólicos concentrados e seus hidrolizados.^a

Tratamento/fase	Extrato etéreo I	Fase aquosa I
T (s/hidr.)	68,6	31,4
T (hidr. ác.)	72,8	27,2
T (hidr. básc.)	1,8	98,2
C (s/hidr.)	17,0	83,0
C. (hidr. ác.)	56,2	43,8
C. (hidr. básc.)	4,1	95,9
C ₁ (s/hidr.)	1,6	98,4

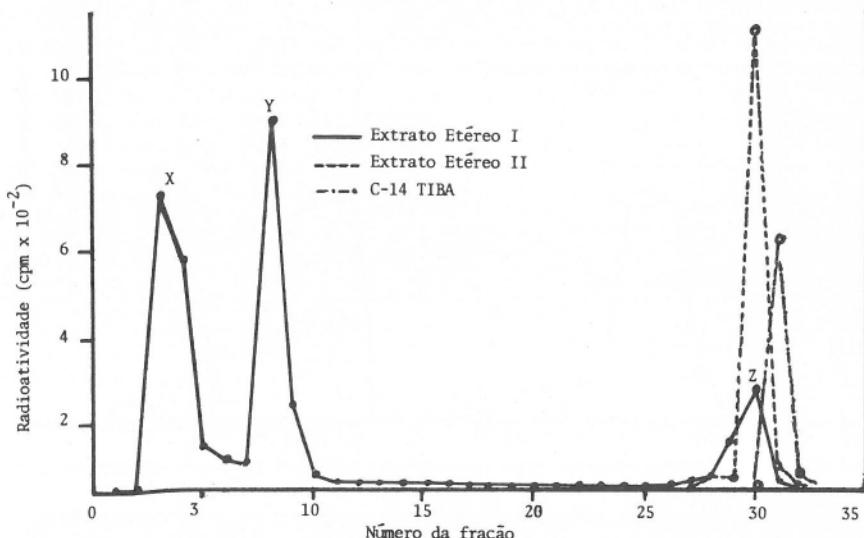


FIGURA 1 - Diagrama de eluição da atividade do ^{14}C dos extratos etéreos I e II das sementes radioativas (T) em coluna de alumina.

Novamente, o Extrato Etéreo II forneceu apenas Z.

Observou-se, posteriormente, que a manutenção dos Extratos Etéreos I à temperatura ambiente, provocou drástica mudança nas atividades relativas das 3 frações radioativas. No caso de T, ocorreu rápido desaparecimento de X em favor de Y e Z. Recromatografando, separadamente, as 3 frações, X se decompôs, parcialmente, em Y e Z; parte de Y forneceu Z, enquanto esse último não se alterou. O controle (C), comportou-se de maneira idêntica. Após repouso de uma noite, somente o pico Z foi detetado. Supondo-se uma hidrólise básica de conjugados do TIBA ou de 3,5 DIBA, X conteria, pelo menos, 2 moléculas do composto, Y uma molécula a menos e Z, o próprio TIBA ou em mistura com o 3,5 e 2,5 DIBA. É bastante provável que os Extratos Etéreos I contivessem, originalmente, apenas X, sendo Y e Z meros artefatos do processo de purificação adotado. Em face da interferência do material lipídico, tornou-se extremamente difícil a caracterização das frações radioativas.

A cromatografia, em Sephadex LH-20, dos extratos alcoólicos não purificados das sementes radioativas (T) e do controle (C) promoveu a eluição de proteínas, lípidos e pigmentos antes de qualquer atividade significante de ^{14}C , o que excluiu aquelas categorias de compostos como possíveis agentes de condensação do TIBA. A Figura 2 revela a separação de duas frações radioativas principais para o extrato das sementes radioativas. Em algumas repetições, o pico II apresentou um início de resolução entre dois outros. Quando o ^{14}C TIBA foi cromatografado com o extrato alcoólico de T, a atividade total da fração I não sofreu alteração sensível, enquanto que, um pico bastante amplo, englobando a posição da fração II, apareceu (Figura 3).

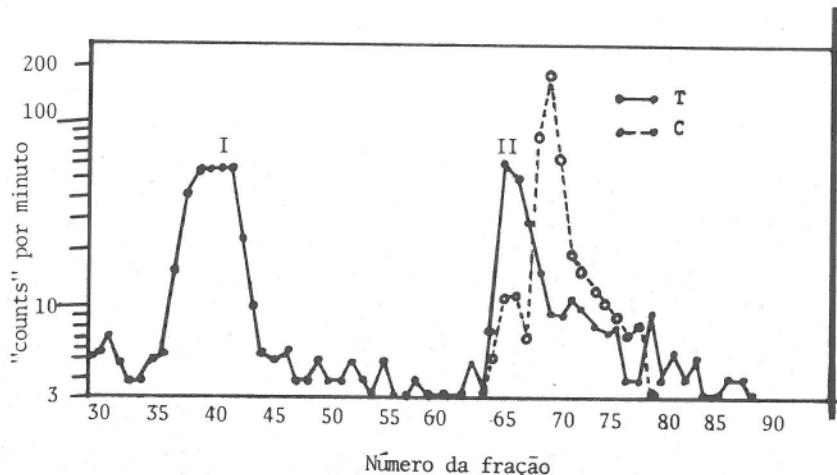


FIGURA 2 - Diagrama de eluição da atividade de ^{14}C dos extratos alcoólicos das sementes radioativas (T) e do controle (C) em coluna de Sephadex LH-20.

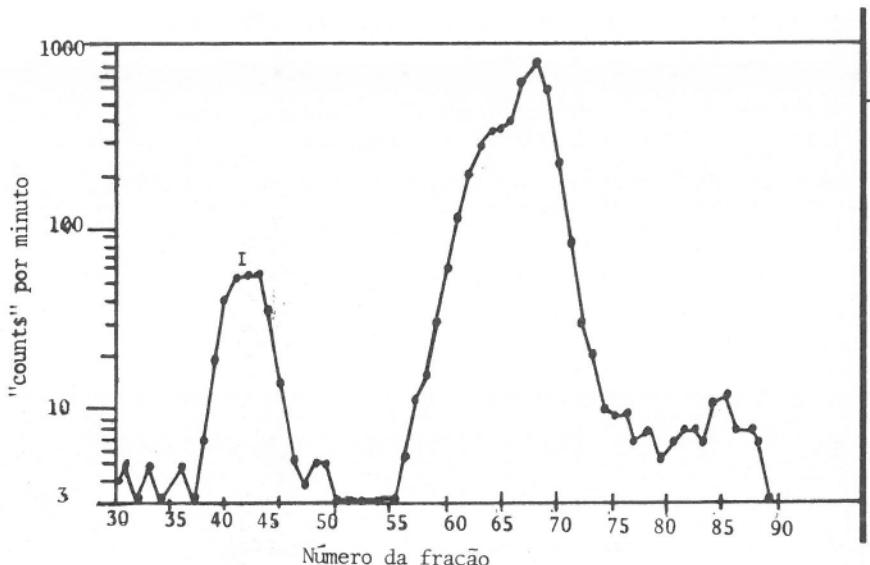


FIGURA 3 - Diagrama de eluição da atividade do ^{14}C da mistura extrato alcoólico das sementes radioativas (T) + 7 - ^{14}C - TIBA em coluna de Sephadex LH-20.

De acordo com a ordem de eluição, a primeira fração radioativa deve corresponder a compostos de peso molecular superior ao do TIBA, mais provavelmente produtos de conjugação do regulador de plantas com componentes celulares. Como a referida fração apresentou cerca de 60% da atividade eluída, admite-se a sua correspondência com aquela de baixa polaridade, contida no Extrato Etéreo I do processo de purificação, bem como com a fração X obtida no estudo anterior. Associando-se essas observações aos resultados do estudo hidrolítico, sugere-se uma estrutura do tipo éster para a mesma. Vale notar que Klaembt (1), ao incubar coleóptilos de trigo com o ácido 7 - ^{14}C - benzóico, isolou vários ésteres da glucose com o composto, tais como β -D-glucose-1-benzoato e D-glucose-6-benzoato, os quais supõe serem produtos de desintoxicação. Por outro lado, Spitznagle et alii (4), pesquisando metabolitos do 7 - ^{14}C - TIBA aplicado à soja, encontraram, para as sementes, 55% da radioatividade na forma de um conjugado não identificado, 26% como TIBA, 11% como 2,5 DIBA e 17,5% como 3,5 DIBA.

Embora o presente trabalho não tenha atingido estádio mais avançado, no que tange à positiva identificação dos metabolitos do TIBA, os resultados alcançados parecem indicar a presença de produtos de conjugação do composto e do TIBA inalterado ou em associação com derivados, tais como o 2,5 DIBA e o 3,5 DIBA, possíveis produtos da sua desiodetação.

4. RESUMO

Em 1965, efetuou-se uma pesquisa de metabolitos do ácido 2, 3, 5 triodo benzóico (TIBA) em sementes de soja obtidas de

plantas pulverizadas, no campo, com uma solução de 7 - 14C - TIBA, no início da floração. Somente 65% da radioatividade total das sementes foi extraída com etanol a 95%. A fração radioativa insolúvel em álcool não foi objeto de investigações posteriores. A purificação do tipo ácido-base realizada nos extratos das sementes radioativas acarretou a transferência de 70% da radioatividade para a fase etérea a pH 9,0, sugerindo a existência de conjugados de baixa polaridade. A hidrólise ácida dos extratos alcoólicos aumentou a fração solúvel em éter, enquanto que, pelo tratamento básico, a atividade decresceu drasticamente para níveis semelhantes aos do TIBA livre. Admite-se que esse último efeito resultou de uma ação hidrolítica sobre conjugados de baixa polaridade. O trabalho cromatográfico em coluna de alumina, embora não tenha separado a atividade do ^{14}C do material lipídico, resolveu-a em 3 picos distintos. Os 2 primeiros degradaram-se com o tempo, em favor do último, o qual coincidiu com o pico do TIBA puro. A cromatografia em gel de Sephadex LH-20 dos extratos alcoólicos das sementes radioativas rendeu duas frações radioativas principais, separadas do material lipídico, proteínas e pigmentos. A primeira fração (pico I) permaneceu praticamente inalterada quando os referidos extratos foram cocromatografados com o composto radioativo puro; a segunda (pico II) foi indistinguível do TIBA. Embora o trabalho não tenha alcançado os estádios finais de caracterização, postula-se uma correspondência do pico I com conjugados do TIBA, do tipo éster, e do pico II com o TIBA livre ou em associação com o 2,5 DIBA e o 3,5 DIBA, produtos de sua desiodetação.

5. SUMMARY

A metabolic study was done in mature seeds of field grown soybeans sprayed with 7 - 14C - 2,3,5 triiodobenzoic acid (TIBA) at the onset of flowering. Seed extraction with 95% alcohol yielded only 65% of the total radioactivity present. No further studies were performed on the ethanol insoluble fraction. Upon acid base purification of the ^{14}C seed extracts, the ether phase (pH 9,0) contained about 70% of the activity suggesting the existence of a low polarity compound(s). Acid hydrolysis of the alcoholic extracts increased the radioactivity in the ether soluble fraction, while the basic treatment decreased it to about the same level as for free TIBA.

The latter behaviour seemed to indicate hydrolysis of a conjugation product(s). Alumina column chromatography was unsuccessful for separating the oil-acticity combination; however, three radioactive peaks were obtained. The first two peaks degraded to form the last one, which coincided with the TIBA peak. When the alcoholic extracts were run in a Sephadex LH-20 column, oils, proteins and pigments separated from the radioactivity. Two main peaks appeared for the ^{14}C seeds extracts. Peak I was essentially unaltered when it was co-cromatographed with the standard ^{14}C - TIBA, Peak II was indistinguishable from the TIBA peak.

Although the work did not reach the final stage of characterization, postulation was made for a conjugate nature of the ester type for peak I and the correspondence of peak II with free TIBA or TIBA in mixture with related compounds, such as

2,5 DIBA and 3,5 DIBA, products of its deiodination.

6. LITERATURA CITADA

1. KLAEMBT, H.D. Induction of growth and the metabolism of growth substances in the cylinder of the coleoptyle of wheat. II. Products of the metabolism of indoleacetic acid and benzoic acid. *Planta* 56:618-631. 1961.
2. SANT'ANNA, R., OHLROGGE, J., CHRISTIAN, J.E. & BRECKINRIDGE JR., C.E. Estudo do metabolismo do ácido 2(I-131), 3,5, benzoíco em soja (*Glycine max*). *Rev. Ceres.* 22(124): 413-422. 1975.
3. SPITZNAGLE, L.A., CHRISTIAN, J.E., OHLROGGE, A.J. & BRECKINRIDGE JR., C.E. Study of absorption, translocation and residue properties of 2,3,5 triiodobenzoic acid in field-grown soybeans. *J. Pharm. Sci.* 57: 764-768. 1968.
4. SPITZNAGLE, L.A., CHRISTIAN, J.E. & OHLROGGE, A.J. Metabolism of the plant growth regulator 2,3,5 triiodobenzoic acid in soybeans. *J. Pharm. Sci.* 58:1234-1237. 1969.