

BRASSINOSTERÓIDES: UM NOVO GRUPO DE FITO-HORMONAS

Pedro Abreu

Dept. de Química, Fac. de Ciências e Tecnologia da Univ. Nova de Lisboa, Quinta da Torre, 2825, Monte da Caparica, Portugal

Recebido em 20/11/90

Methods are presented for detection, isolation and characterization of brassinosteroids from plant sources. The screening of brassinosteroids in fungi suggests, on the basis of results of the rice lamina inclination bioassay, the occurrence of these growth substances in the species *Phellinus pini*.

INTRODUÇÃO

Em 1979, um novo produto natural de actividade biológica marcante no crescimento de plantas, foi isolado do pólen da Colza (*Brassica napus*): o brassinólido (BL)¹. Tratou-se do primeiro esteróide natural com o anel B constituído por uma lactona, e dois grupos diol vicinais no anel A (2 α e 3 α) e na cadeia lateral (22R e 23R). Até à data foram isolados mais de 30 compostos de estrutura correlacionada com o Brassinólido, denominados brassinosteróides (BRs) (Fig.1)². A respectiva seqüência biossintética a partir dos fitosteróis parece ser a seguinte: hidroxilação da cadeia lateral \rightarrow introdução do glicol vicinal no anel A \rightarrow formação da cetona em C-6 do anel B \rightarrow alquilação em C-24 \rightarrow formação da lactona no anel B por oxidação tipo Baeyer-Villiger.

A descoberta do Brassinólido veio culminar mais de 10 anos de pesquisa de substâncias promotoras de crescimento em extractos de pólen de origem diversa, no âmbito de projectos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). O conjunto de resultados obtidos em diferentes sistemas de testes de actividade biológica apontam para uma função reguladora dos brassinosteróides no crescimento e divisão celulares, distinta da de outras substâncias de crescimento conhecidas. Se bem que o mecanismo de acção dos BRs esteja ainda por elucidar, estes são já considerados um 6^o grupo de fito-hormonas, a acrescentar às auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ác. abscísico.

Após o isolamento do brassinólido e subsequente síntese dos BRs e análogos, ensaios realizados em diversos tipos de culturas deram indicações prometedoras da utilização destes compostos na agricultura. No Japão, universidades estatais (Tóquio, Nagoia) e sector privado (Fuji e Nissan Chemicals Industries Co.) têm vindo a desenvolver projectos comuns de síntese de BRs destinados a ensaios de campo³.

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BRs

Os brassinosteróides têm uma distribuição generalizada nas plantas, existindo numa gama de concentrações que varia de 10⁻³ a 10⁻⁶ ppm. constituindo os pólenes e as sementes imaturas as fontes mais ricas de BRs (Tabela 1). O brassinólido e a castasterona são os mais comuns e de maior actividade biológica.

Dada a ordem de concentrações dos BRs nas plantas estudadas, o seu isolamento requer processos de extracção em larga escala. Mandava *et al* do USDA processaram 225 kg de

pólen da Colza recolhido das abelhas e obtiveram 10 mg de brassinólido, cuja determinação estrutural foi conseguida por Grove *et al* a partir de 4 mg de produto isolados de 40 kg de pólen. Yokota *et al* referem o isolamento de 120 mg de 25-metil-dolicosterona e 95 mg de castasterona a partir de 136 kg de sementes de feijoeiro⁴ e de 40 kg de galhas de castanheiro⁵ respectivamente. Da espécie *P. vulgaris* foram entretanto detectados mais de 30 BRs ou análogos por cromatografia gás-líquido-espectrometria de massa (GCMS)⁶.

TABELA 1 – Concentrações dos BRs em algumas das plantas estudadas

Composto	Planta	Conc. (ng/kg de tecido)
Brassinólido	<i>Brassica napus</i>	10 ⁵ -10 ⁶
Dolicólido	<i>Dolichos lablab</i>	10 ⁵ -10 ⁶
Castasterona	<i>Zea mays</i>	10 ⁵ -10 ⁶
Dolicosterona	<i>Dolichos lablab</i>	10 ⁴ -10 ⁵
6-Deoxocasterona	<i>Castanea crenata</i>	10 ⁴ -10 ⁵
6-Deoxodolicosterona	<i>Dolichos lablab</i>	10 ³ -10 ⁴
Tifasterol	<i>Typha latifolia</i>	10 ⁴ -10 ⁵
Teasterona	<i>Zea mays</i>	10 ³ -10 ⁴
Homodolicólido	<i>Dolichos lablab</i>	10 ³ -10 ⁴
24-etilbrassinólido	<i>Hydrodyction reticulatum</i>	10 ⁴ -10 ⁵
28-norbrassinólido	<i>Distilium racemosum</i>	10 ² -10 ³
Brassinona	<i>Castanea crenata</i>	10 ⁴ -10 ⁵
24-epicastasterona	<i>Hydrodyction reticulatum</i>	-
24-epibrassinólido	<i>Vicia faba</i>	-
Homodolicosterona	<i>Dolichos lablab</i>	< 1
Restantes	<i>Phaseolus vulgaris</i>	< 10 ³

Um processo de rotina usado no isolamento dos BRs, é ilustrado na Fig. 2.

Todas as fracções resultantes das sucessivas separações cromatográficas são controladas por um teste de actividade biológica – teste da inclinação da lâmina do arroz – e as que apresentam actividade processadas até à obtenção de pequenas fracções enriquecidas em BRs.

ACTIVIDADE BIOLÓGICA DOS BRs

O brassinólido foi testado em diversos ensaios biológicos vulgarmente usados no estudo de substâncias de crescimento: 1^o e 2^o internodos da planta do feijão, cultura em suspensão de células de cenoura, abertura da folha do trigo, extensão do

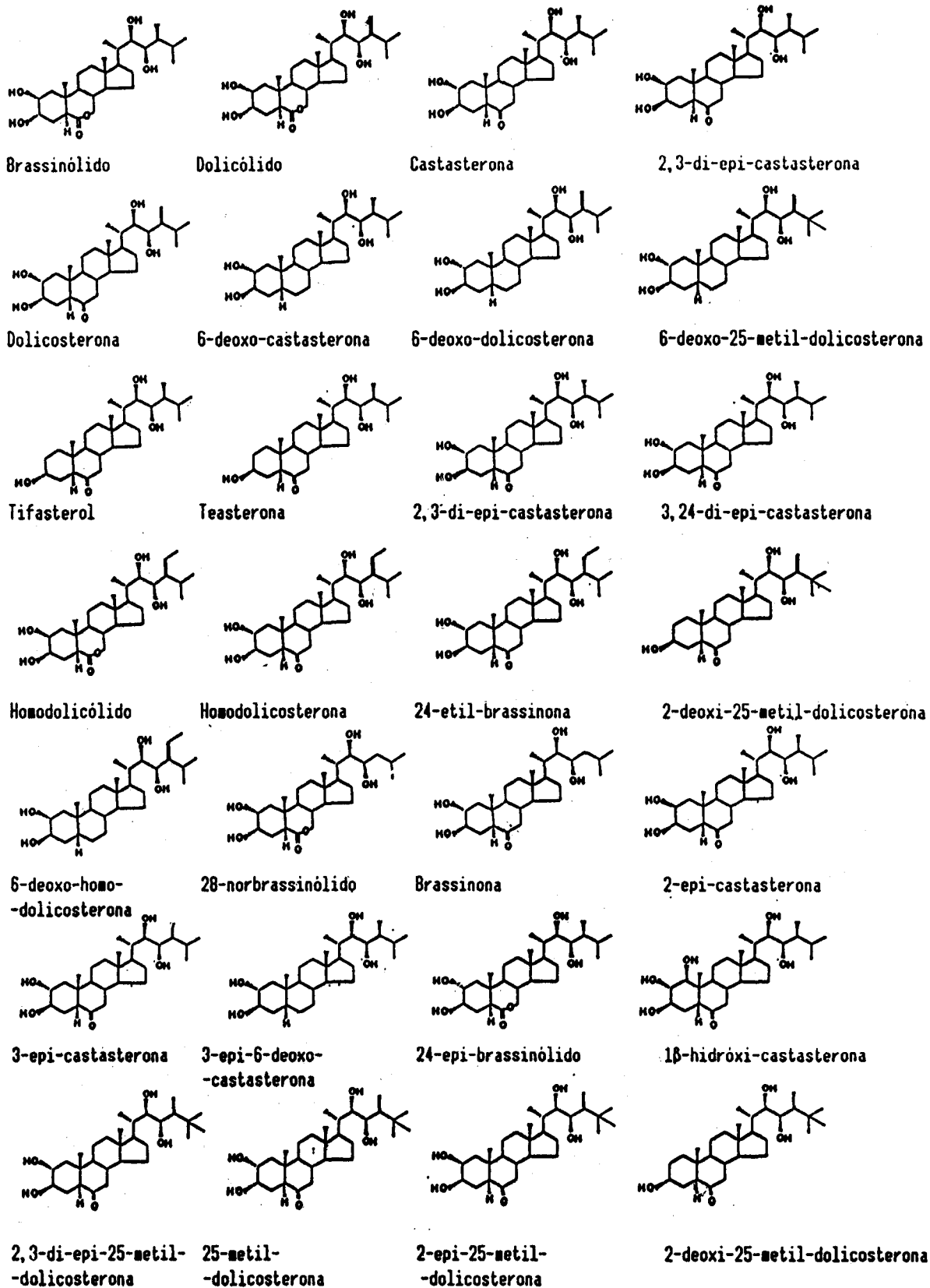


Fig. 1. Brassinosteróides naturais

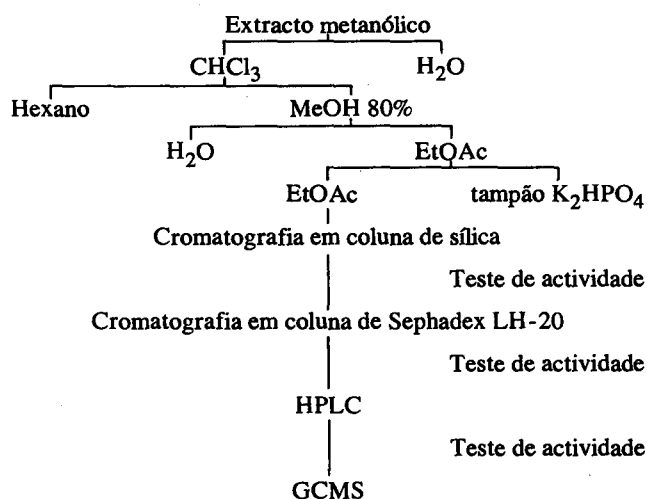


Fig. 2. Isolamento de BRs

mesocotilo do milho e da ervilha, e inclinação da lâmina do arroz, entre outros. Os resultados indicam que o BL possui um largo espectro de actividade, incluindo actividade tipo-giberelina, -auxina e -citocinina, tem provavelmente uma função no controle do RNA e na síntese das proteínas, e interactua com outras fito-hormonas. São conhecidos alguns exemplos de interacções entre fito-hormonas: as auxinas e giberelinas controlam o crescimento celular em rebentos, as giberelinas e citocininas controlam a divisão celular, o ácido abscísico e as giberelinas controlam a germinação das sementes, e o etileno cuja formação é estimulada pelas auxinas, modifica o transporte lateral destas. Se bem que a natureza das interacções com os BRs não esteja ainda esclarecida, elas são determinantes na função fisiológica destes compostos, nomeadamente no controle do crescimento e desenvolvimento da planta.

O teste da inclinação da lâmina do arroz é um ensaio micro-quantitativo específico na detecção de BRs, utilizado no processo de isolamento acima referido⁷. Concentrações de BRs da ordem dos 01 mg/l e até o limite de 0.05 mg/l, podem ser detectadas por este método. O ácido giberélico tem um ligeiro efeito na inclinação da lâmina do arroz a concentrações de 100 mg/l, o ácido indole-acético um efeito cinco vezes menor que o brassinólido, enquanto que as citocininas e o ácido abscísico inibem a inclinação.

A figura 3 ilustra este ensaio. Sementes de arroz (*Oryza sativa*) recém germinadas são plantadas em agar onde crescem durante 7 dias. Os segmentos das folhas resultantes, que con-

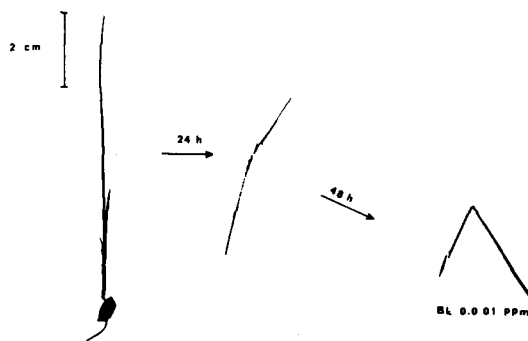


Fig. 3. Teste da inclinação da lâmina do arroz

sistem na lâmina, nodo e bainha são cortados e colocados em água durante 24 horas, e seguidamente numa solução das amostras a testar durante 48 horas. O crescimento celular do nodo, induzido pelos BRs, provoca a inclinação da lâmina. O ângulo entre a lâmina e a bainha, comparado com o resultado do teste feito com padrões, dá uma indicação da actividade das amostras.

Numa prospeccão por nós efectuada de BRs em fungos (até à data não há referência de isolamento de BRs em fungos) foram encontrados índices de actividade na espécie *Phellinus pini* (fig. 4) que deixam antever a presença de BRs.

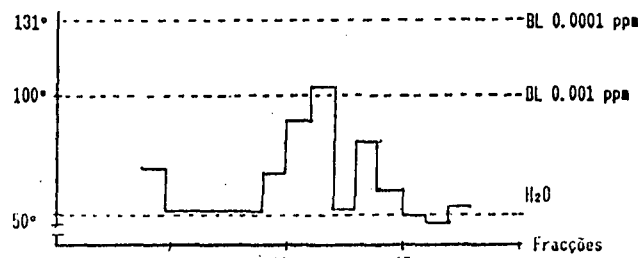


Fig. 4. Distribuição da actividade do fungo *Phellinus pini* após separação em coluna de Sephadex LH-20

RELAÇÃO ESTRUTURA-ACTIVIDADE

Os testes da inclinação da lâmina do arroz realizados com diversos padrões sintéticos de diferentes núcleos e cadeias laterais⁸ (Fig. 5) apontam para os seguintes requisitos estruturais condicionantes da actividade biológica: 1. glicol cis-vicinal em C-2 e C-3 do anel A e em C-22 e C-23 da cadeia lateral; 2. junção trans dos anéis A/B; 3. função cetona ou lactona no C-6 do anel B; 3 α -alquilação em C-24.

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS BRs NATURAIS

A identificação e quantificação dos BRs nos extractos naturais, exceptuando os casos em que o seu isolamento permite a completa caracterização estrutural, tem sido feita por GCMS e por SIM ("Single Ion Monitoring") das fracções activas resultantes da separação por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

A separação duma mistura de 10 BRs por HPLC está ilustrada no cromatograma da Fig. 6, onde se regista a larga diferença de retenção dos dois epímeros em C-24 do homobrasinólido (homólogo 29-metil do BL)⁹. A derivatização dos BRs com ácido dansilaminofenilborónico (DABA) tem sido usada recentemente em HPLC com detecção fluorimétrica, com um limite de detecção de 25 pg por BR¹⁰. A separação de BRs que diferem apenas na configuração absoluta de um ou mais carbonos do núcleo ou da cadeia lateral é conseguida igualmente em cromatografia gás-líquido¹¹.

As fracções são seguidamente derivatizadas por bismetanolboronação dos glicóis viciniais e trimetilsilação dos grupos hidroxilo, e os tempos de retenção e fragmentações em GCMS comparadas com as de amostras autênticas.

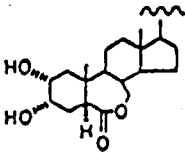
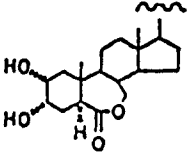
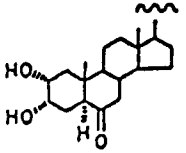
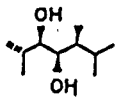
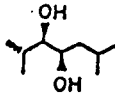
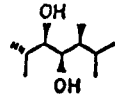
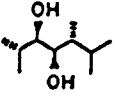
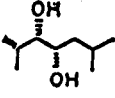
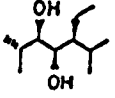
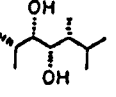
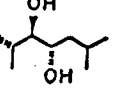
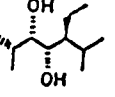
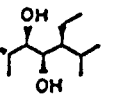
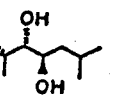
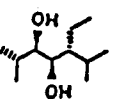
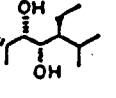
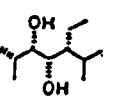
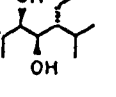
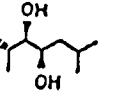
Composto	Actividade relativa	Composto	Actividade relativa	Composto	Actividade relativa
					
	100		5		50
	10		1		50
	5-10		0.1		0.5
	100		0.05		1
	50	—	—		0.5
	10	—	—		5

Fig. 5. Actividade relativa do BL e análogos no teste da inclinação da lâmina do arroz

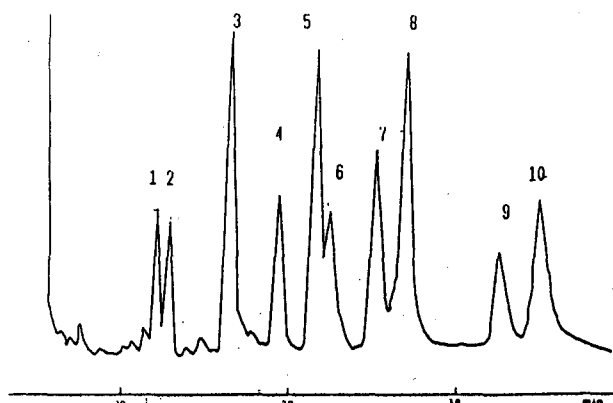


Fig. 6. HPLC de fase inversa de BRs. Coluna Develosil ODS 5 μ m, 6x200 mm, MeOH 70%, fluxo 1.5 ml/min. 1. (24S)-homobrassinólido; 2. Dolicolído; 3. Homodolicolído; 4. Dolicoesterona; 5. Brassinona; 6. Brassinolído; 7. 25-metil-dolicoesterona; 8. Homodolicoesterona; 9. (24R)-homobrassinólido; 10. Castasterona.

A quantificação por SIM é feita a partir das curvas de calibração obtidas por injeção de quantidades conhecidas de amostras autênticas, comparando a área dos picos correspondentes aos iões seleccionados (Fig. 7)⁵.

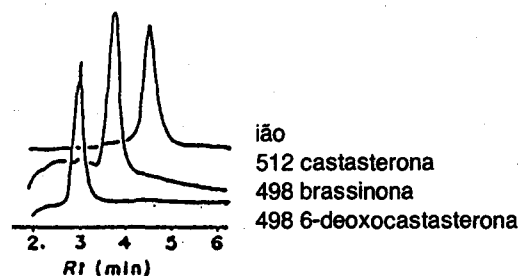


Fig. 7. Perfil do SIM duma mistura de castasterona, brassinona e 6-deoxycastasterona obtido por selecção dos iões moleculares dos respectivos derivados bismetanoboronatos

APLICAÇÕES AGRÍCOLAS DOS BRs

As aplicações práticas dos BRs na agricultura têm sido avaliadas pelo aumento dos rendimentos, resistência ao stress ambiental e a doenças das colheitas.

Os primeiros ensaios de campo e em estufa foram conduzidos pelo USDA em vegetais e colheitas de raiz (rábano, alface, feijão, pimenta, batata, trigo, cevada, mostarda). Os BRs são adicionados ao solo em concentrações de 10^{-3} ppm- 10^{-6} ppm e incorporados pelas raízes, ou usados sob a forma de "spray". Os exemplos seguintes ilustram alguns resultados prometedores da aplicação dos BRs na agricultura^{1,12,13}: 1. as uvas resultantes de vinhas pulverizadas com uma solução de BL apresentam bagos maiores e mais doces e com um maior período de conservação. 2. a produção de pastagens verdes aumenta de 7% em massa quando tratadas com 10^{-4} ppm de BL. 3. o crescimento das plantas do arroz e do tabaco é acelerado por tratamento das sementes com homobrassinólico. 4. o tratamento das culturas de alface, cevada e batatas com BRs resulta num aumento de rendimento das colheitas (6-40%) e do seu peso fresco. 5. as colheitas de arroz, pepino e beringelas resistem melhor ao frio (temperaturas inferiores a 10°C) quando previamente tratadas com BL. 6. a resistência das culturas de arroz as infecções patogênicas aumenta quando o tratamento com fungicidas e combinado com o BL. Um efeito sinérgico semelhante verifica-se com os herbicidas, onde a inibição fotossintética causada por estes é atenuada pelo BL.

O uso comercial dos BRs na agricultura depende ainda do resultado das investigações em curso sobre a determinação de eventuais efeitos tóxicos ou ambientais, verificação da formação de proteínas/enzimas nas plantas tratadas com BRs e avaliação de eventuais modificações do teor em ácidos orgânicos, lipídios e hidratos de carbono durante o seu crescimento e desenvolvimento, e biossíntese do BRs a partir de esteróis marcados e subsequentes transformações sofridas nas fases de crescimento e desenvolvimento. A incorporação em plantas do brassinólido e castasterona tritizados mostrou que estes BRs são rapidamente metabolizados em substâncias polares, nomeadamente no éster 23 β -glicosídico. Assim, a aplicação prática dos BRs na agricultura requer o desenvolvimento de métodos que impeçam ou retardem a desactivação dos BRs por

conjugação com a glucose, e tornem o efeito destes compostos mais durável¹⁴. A formulação de novos análogos sintéticos dos BRs é uma das soluções encaradas.

AGRADECIMENTOS

O projeto "Detecção e isolamento de brassinosteróides e compostos afins em fungos" foi objecto do contrato de investigação nº 85. CEX. 1 do INIC. Aos Profs. N. Takahashi e T. Yokota agradecem-se as facilidades concedidas durante a estadia no Dpt^o de Química Agrícola da Universidade de Tóquio, e a oferta de amostras de brassinosteróides.

REFERÊNCIAS

1. Grove, M.D.; Spencer, G.F.; Rohwedder, W.K.; Mandava, N.; Worley, J.L.; Warthen Jr., J.D.; Steffens, G.L.; Flippen-Anderson, J.L.; Cook Jr., J.C., *Nature* (London) (1979), **281**, 216.
2. Yokota, T., Takahashi, N.; *Plant Growth Substances*, ed. Springer-Verlag (Berlin) (1985), **129**, Adam, G.; Marquardt, V.; *Phytochemistry*, (1986), **25**, 1787; Singh, H.; Brardwaj, T.R., *Indian J. Chem.* (1986), **25B**, 989; Meudt, W.J., ACS Sympos. Series, (1987), **325**, 53; Mandava, N.B., *Ann. Rev. Plant. Mol. Biol.* (1988), **39**, 23; Ikekawa, N.; Nishiyama, F.; Fujimoto, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, (1988), **36**, 405.
3. Hamada, K., *Food and Fertilizer Book Series*, (1986), **34**, 188.
4. Kim, S.K.; Yokota, T.; Takahashi, N., *Agric. Biol. Chem.*, (1987), **51**, 2203.
5. Arima, M.; Yokota, T.; Takahashi, N., *Phytochemistry*, (1984), **23**, 1587.
6. Yokota, T.; Kim, S.K.; Takahashi, N., *Abstracts of the 16th Intern. Symposium on the Chem. Natur. Prod.* (1988).
7. Wada, K.; Marumo, S.; Abe, H.; Morishita, T.; Nakamura, K.; Uchiyama, M.; Mori, K., *Agric. Biol. Chem.*, (1984), **48**, 719.
8. Takatsuto, S.; Yazawa, N.; Ikekawa, N.; Morishita, T.; Abe, H., *Phytochemistry*, (1983), **22**, 1393.
9. Cromatograma cedido pelo Prof. T. Yokota.
10. Gamoh, K.; Okamoto, N.; Takatsuto, S.; Tejima, I., *Anal. Chem. Acta*, (1990), **228**, 101.
11. Takatsuto, S.; Ying, B.; Morisaki, M.; Ikekawa, N., *J. Chrom.*, (1982), **239**, 233; Takatsuto, S.; Ikekawa, N., *Chem. Pharm. Bull.*, (1986), **34**, 3435.
12. Genma, T., *Chem. Abstracts*, (1990), **112**, 5.
13. Imaoka, A.; Yamanaka, Y.; Akiyama, S., *Chem. Abstracts*, (1990), **113**, 1.
14. Abe, H., *Japan Pesticide Information* (1989), **55**, 10.