

I N T R O D U Ç Ã O

É bem conhecido o fato de que compostos fluorescentes podem promover, fotoquimicamente, alterações de vários tipos de moléculas. Limitar-nos-emos aqui à citação de apenas alguns exemplos, como o das modificações determinadas pela luz na molécula do ácido indolil acético (AIA) em presença de cosina, modificações essas que levam à anulação total da atividade promotora de crescimento dessa substância (35). Como foi recentemente descoberto (17), modificações análogas podem ser induzidas por riboflavina (Rbf).

De não menor interêsse é o caso da destruição do ácido ascórbico do leite, quando êste é exposto à luz (30). Depois que Hopkins (26) verificou que Rbf é capaz de foto-sensibilizar a destruição de ácido ascórbico "in vitro", Hand, Guthrie e Sharp (25) puderam demonstrar que a inativação no leite era devida à ocorrência simultânea de Rbf.

O conhecimento de tais fatos nos levou a indagar se a foto-destruição do AIA não seria determinada por outros compostos fluorescentes, de maneira não específica.

Numa publicação preliminar (13) apresentamos dados que confirmam êste ponto de vista, evidenciando a foto-destruição de AIA por pigmentos à base de fluoresceína e pelo sulfato de quinina. Mais recentemente descobrimos que esculina e o 2,3,5-trifenil tetrazol também catalisam a mesma reação (14).

Talvês convenha mencionar aqui, o fato de que êsses resultados permitiram a Ferri e Guidolin (16) demonstrar

que a foto-inativação de veneno botrópico é determinada, também de maneira inespecífica, por vários compostos fluorescentes. E, ainda, que Fonseca Ribeiro e Cardoso (comunicação pessoal) puderam verificar que a supra citada foto inativação de ácido ascórbico é também igualmente catalisada por sulfato de quinina.

De conhecimento geral é, também, o fato de que inúmeros compostos fluorescentes determinam sobre plantas e animais vários efeitos que costumam ser denominados foto-dinâmicos. Sobre este assunto existe vastíssima literatura que não vamos aqui rever. Restringir-nos-emos a somente alguns exemplos de ligação mais íntima com o problema de que nos vamos ocupar. Assim, Metzner (31) verificou que raízes de aveia e outras plantas, tratadas com 1:500.000 de eritrosina, apresentavam fototropismo positivo; tais raízes são, normalmente, a-fototrópicas. Blum e Scott (2) encontraram o mesmo comportamento para raízes de trigo. De outro lado, as observações de Boas e Merckenschlager (5) mostraram que raízes igualmente tratadas perdiam a capacidade de reação geotrópica e Boas (4) verificou que órgãos normalmente fototrópicos como coleoptíles, apresentavam-se a-fototrópicos quando provinham de sementes submetidas a tratamento prévio com tais corantes. Um estudo detalhado sobre o tempo de apresentação e de reação de raízes tratadas foi feito por Mildebrath (32) que verificou uma diminuição de sensibilidade em consequência do tratamento.

Estes efeitos eram explicados, geralmente, como resultantes da oxidação, pelo oxigênio atmosférico, de algum constituinte celular, agindo o corante como foto-sensibilizador (2).

Embora seja universalmente aceito o fato de que auxina desempenha papel de relêvo em reações de crescimento como o geo e o fototropismo, e, embora tenha Boysen-Jensen (7) mostrado que raízes tratadas com eritrosina difundem menos auxina que as não tratadas, ninguém se pronun-

ciou, claramente, sobre a natureza dos fenômenos foto-dinâmicos mencionados. É verdade que Boysen-Jensen se aproximou muito da solução, mas dela depois se afastou ao admitir que o tratamento determina as reações observadas, através de uma diminuição da velocidade de transporte do hormônio. Muito mais afastada da realidade ficou Mildebrath (32) que tentou explicar os fatos observados, através de modificações da quantidade de amido estatolítico e da velocidade de seu deslocamento.

Um último trabalho, o de publicação mais recente, deve ainda ser citado neste conjunto. Trata-se da descoberta feita por Hamner e col. (24) de que beta metil umbeliferona determina acentuada inibição de crescimento tanto de plantas superiores, como de fungos. Os autores, após asseverarem que "Ultraviolet light acts to dwarf plants and apparently interferes with either the manufacture or the movement of natural growth hormones", sugerem a hipótese de que umbeliferona poderia "absorb in the plant large quantities of ultraviolet light, thus interfering with the normal functioning of the growth hormones" (l. c. p. 135). Transcrevemos textualmente as palavras dos autores, para comprovar, de forma indubitável, que a possibilidade, em nossa opinião a mais provável, de que o composto agiria catalisando a foto-destruição do hormônio no interior da planta, não foi tomada em consideração.

O presente trabalho dedica especial atenção ao problema da foto-destruição de ácido indolil acético por compostos fluorescentes. O interesse que estudos neste campo apresentam para a Fisiologia vegetal provém do fato, de que hoje não mais se duvida, de que o ácido indolil acético é, senão o único, o mais importante hormônio de crescimento das plantas em geral. A comprovação bibliográfica desta afirmativa seria extremamente longa, e, por fugir ao interesse imediato do presente estudo, deixa de ser feita. Vários trabalhos já foram publicados, recentemente, com êste propósito e a eles referimos o leitor (6, 10, 11, 40).

MATERIAIS E MÉTODOS

Método biológico:

As experiências preliminares e as que implicam no uso de substâncias coradas foram feitas com o emprego de um teste biológico descrito recentemente por Ferri e Camargo (15).

Sementes de feijão, da variedade conhecida como "feijão taquara" (*Phaseolus vulgaris* L. var. *sub-compressus* Alef.) * eram semeadas em canteiro ao ar livre. Quando as platinhas tinham desenvolvido apenas as duas folhas primárias, isto é, antes do crescimento da primeira folha normal, tri-foliolada, eram usadas. Tais plantas contavam de 2 a 4 semanas de idade. Testes preliminares mostraram que a idade da planta não interferia, qualitativamente, com a resposta, mas modificava-a quantitativamente. Por isso, quando se tratava de obter dados para comparação, somente plantas da mesma idade eram utilizadas.

Uma vez selecionadas as plantas, seus caules eram cortados, rente ao ponto de inserção das folhas primárias e os limbos e suas articulações (pulvini), igualmente removidos. Obtinham-se, deste modo, peças com o formato de Y (Fig. 1) cujos contornos podiam ser facilmente delineados em papel. Os ângulos formados pelas faces internas dos pecíolos convergentes eram medidos nos desenhos, com um transferidor comum.

Três a cinco peças assim preparadas eram submersas em água ou nas soluções a serem experimentadas. Foi constatado que o emprego de maior número de peças, em cada caso, não melhorava sensivelmente os resultados.

Os ângulos eram medidos logo que as peças eram preparadas, antes da imersão. Novas medidas eram feitas depois, a diferentes intervalos. Quando o valor médio final

* A identificação desta planta foi feita por A. Burkart que nos comunicou haver segurança somente quanto à espécie, em vista de serem muito afins todas as suas variedades.

era maior que o inicial, a diferença recebia sinal positivo; no caso contrario a diferença obtida recebia sinal negativo.

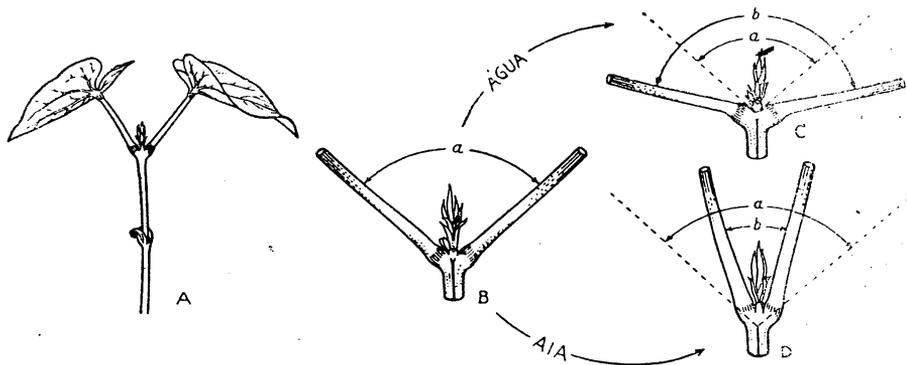


FIG. 1

Plantinha de feijão de 2 semanas mostrando as folhas primárias (A); segmento cortado da mesma, indicando a articulação convergente dos pecíolos no cáule, determinando o ângulo a (B); posto em água o segmento aumenta o ângulo para o valor b (C); em solução de AIA o ângulo a diminui para o valor b (D).

Em cada caso 40 a 50 cc de solução eram empregados, em placas de Petri. As soluções eram preparadas na hora, por diluições convenientes de soluções concentradas mantidas em geladeira.

Tratando-se de um método novo, não controlado por outros autores, achamos indicado realizar uma série de experiências com o fim de evidenciar a correção de sua aplicabilidade em determinações de hormônios de crescimento. Tais experiências procuravam, de outro lado, juntar informações que permitissem elucidar um pouco o mecanismo das respostas observadas. Afim de não perturbar o andamento do assunto central do presente trabalho, decidimos simplesmente aqui enumerar as conclusões essenciais que essas experiências possibilitaram. 1.º — Em água os ângulos acima mencionados sempre aumentam (Fig. 1, C). 2.º — Em presença de AIA êsses ângulos sempre descrecem (Fig. 1, D). 3.º — Este efeito determinado por AIA é específico para hormônios de crescimento, não se tratando nem de uma resposta a alterações osmólicas, nem a variações de pH. 4.º — As reações podem ser observadas dentro de meia

hora ou mesmo num tempo menor. 5.^o — Alterações de iluminação não modificam, qualitativamente, as respostas, mas introduzem alterações quantitativas consideráveis.

Método colorimétrico:

Determinações quantitativas rigorosas de AIA, quando nas soluções que o continham não havia substâncias coradas, foram feitas pela reação de Salkowski.

Salkowski (34) verificou que AIA reage com FeCl_3 em presença de um ácido mineral desenvolvendo uma coloração vermelha. Mitchell e Brunstetter (33) investigaram detalhadamente essa reação e propuzeram uma técnica para dosagens quantitativas de AIA. Mais tarde Tang e Bonner (36) introduziram certas modificações nessa técnica, estabelecendo as normas seguintes: 1— pipetar 2 cc de solução aquosa de AIA num tubo de ensaio contendo 8 cc de reagente previamente preparado; 2— após 30 minutos à temperatura ambiente, determinar a intensidade de coloração. O reagente é preparado adicionando-se 15 cc de uma solução 0,5 M de FeCl_3 a 300 cc de H_2SO_4 (pêso específico 1,84) e 500 cc de água destilada. Este reagente é estável indefinidamente. A coloração desenvolvida é linearmente proporcional ao conteúdo de AIA na amostra, no intervalo de 5 a 100 γ .

Em nossas experiências as normas estabelecidas por Tang e Bonner (36) foram seguidas. As leituras das intensidades de coloração foram feitas num colorímetro fotoelétrico Kleit-Summerson, usando-se um filtro verde (K.S. n.^o 54). O AIA existente era calculado por referência à cor desenvolvida por soluções de AIA de concentrações conhecidas.

Método fluorométrico:

Determinações da intensidade de fluorescência de soluções de sulfato de quinina foram feitas num aparelho Luminotron 402 EF, adaptado com os filtros primários e secundários convenientes. As cubas empregadas eram de quartzo, de 25 cc. O teor de sulfato de quinina em qualquer amostra era calculado em função de seu grau de fluorescência, por

referência a uma curva padrão estabelecida previamente, por meio de determinações feitas com soluções de concentração conhecida (vide Fig. 5, pág. 27).

RESULTADOS EXPERIMENTAIS E SUA INTERPRETAÇÃO

Depois de desenhadas em papel para obtenção dos ângulos iniciais, as peças preparadas como já foi indicado, foram imersas nas várias soluções. Mantidas em luz difusa, à temperatura ambiente, durante cinco horas, foram essas peças, então, outra vez desenhadas. Medidos os novos ângulos, as diferenças médias em relação aos valores iniciais foram calculadas e com os dados obtidos organizou-se a Tabela 1.

Verifica-se, sem dificuldade, que os segmentos de plantas colocados em água ampliaram seu ângulo médio inicial. O mesmo sucedeu com as peças colocadas em solução de

TABELA 1

Foto-destruição de AIA por Rbf. AIA 25 mg/L, Rbf 10 mg/L.
Duração da experiência, 5 horas.

	Água	AIA	Rbf	AIA + Rbf
Ângulos iniciais	69,5	76,0	71,3	76,3
Ângulos finais	86,3	70,5	98,3	87,8
Diferenças	+ 16,8	- 5,5	+ 27,0	+ 11,5

Rbf. De outro lado, as colocadas em solução de AIA mostraram uma diminuição do ângulo médio inicial. Este efeito, que, como já foi anteriormente mencionado, é específico para substâncias com atividade promotora de crescimento, foi perfeitamente bloqueado pela adição de Rbf à solução contendo AIA.

Como o presente resultado parecesse confirmar a observação de Galston (17), de que Rbf destrói AIA em presença de luz, tornou-se de interesse, agora, ampliar esta experiência, afim de se verificar, se, com êste novo método, seria possível demonstrar também, que Rbf não interferia com a atividade de AIA no escuro. Os resultados da Tabela 2 mostram que de fato êsse é o caso.

TABELA 2

Foto-destruição de AIA por Rbf. AIA 25 mg/L, Rbf 10 mg/L
Duração da experiência, 6 horas.

L U Z			ESCURO	
AIA	AIA + Rbf		AIA	AIA + Rbf
Ângulos iniciais	83,3	71,5	73,3	76,8
Ângulos finais	70,6	87,0	64,6	64,0
Diferenças	- 12,7	+ 15,5	- 8,7	- 12,8

A terceira experiência teve por fim verificar, com o novo método, a observação de Skoog (35), isto é, que AIA é foto-inativado por eosina. A montagem da experiência seguiu os mesmos moldes das experiências anteriores. Os valores finais foram anotados já duas horas após o início da experiência. Os resultados globais figuram na Tabela 3.

Pode-se ver, facilmente, que enquanto que as peças em água aumentaram o ângulo médio entre os pecíolos, as colocadas em solução de AIA diminuíram êsse ângulo, tanto na luz como no escuro. A adição de eosina à água não alterou o comportamento das peças. Adicionada a AIA, no escuro, eosina também não teve efeito e as peças decresceram seu ângulo inicial como se AIA estivesse sozinho. Quan-

do, no entanto, eosina foi adicionada a AIA na luz, o movimento dos peçólos foi completamente revertido. As peças se comportaram como se estivessem em água pura.

TABELA 3

Foto-destruição de AIA por Eosina. AIA 50 mg/L, Eosina 10 mg/L.
Duração da experiência, 2 horas.

	L U Z				ESCURO	
	Água	AIA	Água+Eosina	AIA+Eosina	AIA	AIA+Eosina
Ângulos iniciais	93,1	87,8	92,8	104,0	96,6	84,6
Ângulos finais	144,6	61,5	136,3	154,6	74,1	66,5
Dife- renças	+ 51,5	- 26,3	+ 43,5	+ 50,6	-22,5	- 18,1

Esta experiência foi agora repetida, substituindo-se apenas eosina por fluoresceína. Como se depreende das indicações da Tabela 4 que dispensa maiores comentários, os resultados foram, qualitativamente, os mesmos que os obtidos com eosina e Rbf.

Como eosina e fluoresceína promoviam a mesma foto-inativação de AIA que Rbf com a qual não têm parentesco químico, parecia que esta capacidade de catalisar a foto-inativação de AIA não estivesse ligada a um característico químico, mas sim a qualquer propriedade física comum a essas substâncias. Em virtude do fato de que a fluorescência era a característica mais evidente a ligar estas substâncias, resolvemos testar outros compostos fluorescentes, afim de verificar se possuíam ou não a propriedade, em comum com os compostos antes experimentados, de determinarem a fotoinativação de AIA.

O primeiro composto experimentado foi o sulfato de quinina. Esta substância é incolor mas absorve certos com-

TABELA 4

Foto-destruição de AIA por Fluoresceína. AIA 50 mg/L, Fluor. 10 mg/L. Duração da experiência, 7 horas.

	L U Z			ESCURO	
	Água	AIA	AIA+Fluor.	AIA	AIA+Fluor.
Ângulos iniciais	97,5	100,6	97,1	94,0	97,1
Ângulos finais	131,8	70,8	107,3	40,1	52,5
Diferenças	+ 34,3	- 29,8	+ 10,2	- 53,9	- 44,6

primentos de onda da luz ultra-violeta e fluoresce com uma cor visível. A Tabela 5 reúne os resultados dessa primeira experiência. Verifica-se imediatamente que o sulfa-

TABELA 5

Foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. AIA 25 mg/L, Sulf. Quin. 100 mg/L. Duração da experiência, 3 horas.

	L U Z				ESCURO
	Água	Água+Quin.	AIA	AIA+Quin.	AIA+Quin.
Ângulos iniciais	83,0	83,3	77,3	91,3	110,6
Ângulos finais	127,3	126,3	68,3	119,3	76,3
Diferenças	+ 44,3	+ 43,0	- 9,0	+ 28,0	- 34,3

to de quinina agiu de maneira análoga aos compostos anteriormente citados.

Esta descoberta, além de constituir uma observação inteiramente nova, possibilitou o emprego de uma técnica mais rigorosa na obtenção de valores quantitativos.

Sendo incolor, o sulfato de quinina não deveria interferir com a cor que se desenvolve na reação de Salkowski para determinações de AIA, a menos que quinina desenvolvesse também uma cor qualquer em presença do reagente. Foi constatado que isto não acontece.

Numa experiência preliminar, soluções contendo 12,5 mg/L de AIA foram mantidas no escuro ou à luz, com e sem 12,5 mg/L de sulfato de quinina. Ao fim de 1 hora, 2 cc de solução, em cada caso, foram adicionados a 8 cc de reagente Salkowski. Depois de 30 minutos, para completo desenvolvimento da cor, foram feitas as leituras colorimétricas, nas condições indicadas na descrição dos métodos. As leituras foram feitas contra branco sem ou com sulfato de quinina (2 cc de água ou de solução de sulfato de quinina + 8 cc de reagente), conforme fosse indicado. Leituras feitas com soluções de AIA de concentração conhecida forneceram os elementos para cálculo do teor de AIA nas várias amostras da experiência. Os dados da Tabela 6 representam o resultado desta experiência.

TABELA 6

Foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. Exposição à luz solar, 1 hora. AIA inicial, em todas as provas, 12,5 mg/L.

Sulf. Quin. adicionado mg/L	Condições	Leituras colorimétricas*	AIA destruído %
0	Luz	97	1,03
0	Escuro	98	0
12,5	Luz	2	97,96
12,5	Escuro	98	0

Pode-se ver que a adição de sulfato de quinina promoveu o desaparecimento de 98% do AIA inicial da solução exposta à luz. Todo o AIA foi recuperado da solução em que se adicionou sulfato de quinina no escuro e, também, das soluções, quer mantidas à luz, quer no escuro, na ausência de sulfato de quinina.

* Quando a cor desenvolvida obedece a lei de Beer, como é o caso na presente reação, as leituras no colorímetro foto-elétrico Klett-Summerson são diretamente proporcionais às concentrações.

Os dados indicam que a luz solar com que a solução foi irradiada, por si só é incapaz de destruir AIA, nas condições e no tempo de duração da experiência. Indicam ainda que a destruição de AIA não é uma reação química direta (uma vez que a adição de sulfato de quinina no escuro é ineficiente) mas sim foto-química e exige a presença de um foto-sensibilizador. * Mesmo substâncias incolores podem funcionar como foto-sensibilizadores caso absorvam luz ultra-violeta. O simples fato de uma substância incolor fluorescer à luz solar indica que ela está absorvendo algum comprimento de onda da parte não visível do espectro. A parte da energia absorvida, que não for devolvida com a luz refletida pela substância, pode ser empregada em outros fenômenos que requeiram um suprimento exterior de energia.

Duas novas substâncias fluorescentes, incolores, foram a seguir experimentadas, a esculina e o 2,3,5-trifenil tetrazol.

TABELA 7

Foto-destruição de AIA por Esculina e pelo 2,3,5-trifenil tetrazol.
AIA inicial 25 mg/L. Exposição à luz solar, 30 minutos.

Esculina mg/L	2,3,5-TT. mg/L	Condição	Leituras colorimé- tricas	AIA destruído %
0	0	Luz	180	0
0	0	Escuro	180	0
10	0	Luz	109	39,45
10	0	Escuro	179	0,56
0	10	Luz	10	94,45
0	10	Escuro	178	1,12

Os dados da Tabela 7 resumem os resultados dessas experiências e mostram que ambos os compostos funcionam de modo análogo ao sulfato de quinina. É verdade que esculina parece ser muito menos eficiente.

* Este foto-sensibilizador pode, aliás, ser dispensado, desde que se irradie a solução de AIA com comprimentos de onda que este composto possa absorver (Vide pág. 29).

Tornou-se agora interessante procurar informações sobre as características do processo de foto-destruição de AIA. Talvez pudessem trazer alguns esclarecimentos sobre o mecanismo de tal processo.

Como sulfato de quinina é, dos compostos fluorescentes estudados, um dos mais eficientes no processo, apresentando ainda as vantagens de ser incolor como esculina e o 2,3,5-trifenil tetrazol e de aquisição mais fácil, as observações que se seguem foram feitas especialmente com esse composto.

Uma solução mista de AIA (25 mg/L) e sulfato de quinina (10 mg/L) foi preparada e exposta à luz solar direta. Uma alíquota foi removida no momento da mistura e mantida no escuro para servir de controle. Cada 10 minutos, a partir do instante em que se fez a mistura, 2 cc da solução exposta à luz eram retirados e analisados colorimetricamente afim de se determinar o teor de AIA presente. A experiência durou 70 minutos. O controle, mantido no escuro, permitiu recuperação total, ao fim da experiência, do AIA

TABELA 8

Influência do tempo sobre o curso da foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. AIA 25 mg/L, Sulf. Quin. 10 mg/L. Duração da experiência, 70 minutos.

Tempo em minutos	Leituras colorimétricas	AIA destruído %
0	160	0
10	94	41,25
20	63	60,63
30	36	77,50
40	19	88,13
50	10	93,75
60	5	96,88
70	5	96,88
Contrôle mantido no escuro:		
70	161	0

inicial. Os dados da Tabela 8 representam os valores obtidos. A Fig. 2, construída com esses valores, nos dá uma idéia da grande velocidade da reação: cerca de 40% do AIA inicial é destruído nos primeiros 10 minutos de iluminação,

quasi 80% em meia hora, estando a reação praticamente terminada em 1 hora.

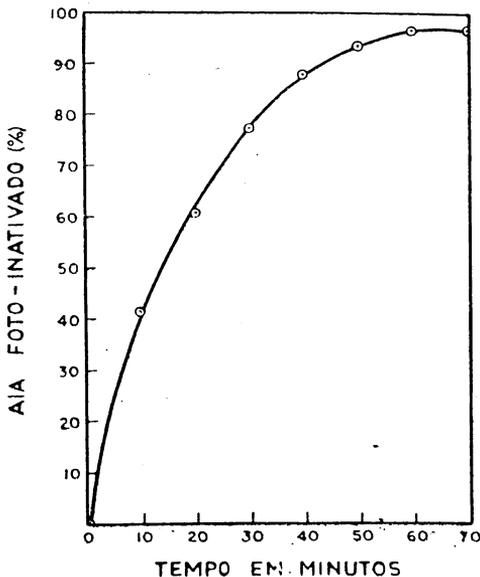


FIG. 2

Curva do tempo de foto-destruição de AIA (25 mg/L) por Sulfato de Quinina (10 mg/L).

A experiência seguinte procurou estabelecer a influência da concentração do foto-sensibilizador no andamento do processo. Soluções contendo 25 mg/L de AIA e concentrações de sulfato de quinina variando entre 0 e 100 mg/L, foram expostas à luz. Ao fim de meia hora foram tiradas amostras de cada destas soluções e o AIA residual determinado nas mesmas. Os dados obtidos figuram na Tabela 9. Com êsses dados construiu-se a Fig. 3 que mostra haver uma proporcionalidade linear entre a razão da reação e o logaritmo da concentração, até o ponto em que esta deixa de ser o fator limitante. Esta observação concorda perfeitamente com a de Galston (17) para Rbf. Êste autor verificou que, com relação ao AIA, a reação será estritamente de primeira ordem, somente em presença de excesso de Rbf.

Para explicar o mecanismo da foto-inativação de AIA catalisada por Rbf, Galston, depois de demonstrar que o

processo é quasi totalmente inibido em condições anaeróbicas, admitiu que a Rbf ativada pela luz funcionaria como um transportador de hidrogênio entre AIA e oxigênio.

TABELA 9

Influência da concentração de Sulfato de Quinina sobre a foto-destruição de AIA. AIA 25 mg/L. Duração da experiência, 30 minutos.

Sulf. Quinina mg/L	Leituras colorimétricas	AIA destruído %
0	182	0
0,1	156	14,29
1,0	63	65,39
10,0	12	93,41
100,0	12	93,41
Contrôle: AIA 25mg/L, sem sulfato de quinina, mantido no escuro durante os 30 minutos da experiência:		
0	183	0

Afim de demonstrar que realmente há um transporte de hidrogênio, da molécula de AIA para a de um acceptor, demonstração essa que não foi feita por Galston, adicionamos à mistura de reação algumas gotas de uma solução

de azul de metileno. A Tabela 10 reúne dados de experiências preliminares que mostram haver, em poucos minutos, desaparecimento da cor azul, fato esse que deve ser explicado pela passagem do corante à leuco-forma, reduzida. Os dados da tabela ainda mostram que, mesmo sem sulfato de quinina, AIA em presença de luz deve liberar hidrogênio, reduzindo o azul de metileno. * A adição de sulfato de quinina apenas acelera essa reação. Um

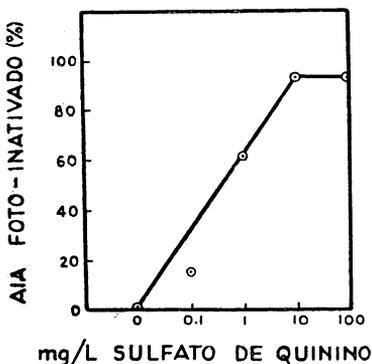


FIG. 3

Efeito da concentração de Sulfato de Quinina sobre a razão de foto-destruição de AIA (25 mg/L). Duração da reação, 30 minutos.

libertar hidrogênio, reduzindo o azul de metileno. * A adição de sulfato de quinina apenas acelera essa reação. Um

* É bem possível que o próprio azul de metileno, absorvendo certos comprimentos de onda da luz visível, funcione como foto-sensibilizador, catalisando a liberação de hidrogênio.

contrôle contendo sulfato de quinina e azul de metileno mostra que sem AIA o azul de metileno não é descorado durante a exposição à luz.

TABELA 10

Libertação de hidrogênio durante a foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. Descoramento de Azul de Metileno. Em cada prova 1 cc sol. azul metil. 0,0025% adicionado.

AIA 400 mg/L	Sulfato de Quinina 100 mg/L	Tempo de descoramento
0 cc	3 cc	não descora
0	3	" "
3	0	6,0 minutos
3	0	6,5
3	3	4,5
3	3	4,5

Algumas experiências adicionais indicaram que com outras substâncias fluorescentes deve sempre haver o mesmo transporte de hidrogênio. Assim o 2,3,5-trifenil tetrazol se comportou de maneira análoga ao sulfato de quinina. Com Rbf a solução inicial que tem côr verde passa, pela exposição à luz, primeiro à côr amarela (pelo desaparecimento da componente azul) e depois fica incolor graças às alterações que a luz normalmente provoca na molécula de Rbf.

Mais algumas experiências, cujos dados figuram na Tabela 11, foram realizadas com o fim de procurar informações sôbre a influência da concentração dos substratos ativos na reação. Essas experiências parecem, no conjunto, não deixar dúvidas quanto ao fato de que o aumento da concentração de AIA diminui o tempo de descoramento do azul de metileno, enquanto que o aumento da concentração de sulfato de quinina torna êsse tempo maior. Isso parece indicar que realmente é AIA a fonte de hidrogênio e que sulfato de quinina funciona como acceptor, competindo com o azul de metileno, quando ambos estão presentes.

TABELA 11

Libertação de hidrogênio durante a foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. Influência das concentrações de AIA e Sulf. Quin. sobre o tempo de descoramento de Azul de Metileno. Em cada prova 1cc. sol. azul metil. 0,0025% adicionado.

AIA mg/L	Sulf. Quinina mg/L	Tempo de descoloramento	
400	200	3 mins.	0 segs.
400	200	2	30
400	200	2	30
TEMPO MÉDIO:		2	40
400	100	2	20
400	100	2	50
400	100	2	30
TEMPO MÉDIO:		2	33
200	100	3	30
200	100	3	0
TEMPO MÉDIO:		3	15
100	100	Máximo descoloramento entre 10 e 15 minutos.	
100	100	Nunca descolorou total- mente.	
TEMPO MÉDIO:		> 10 mins.	
50	100	Máximo descoloramento depois de 15 minutos.	
50	100	Nunca descolorou com- pletamente.	
50	100		
TEMPO MÉDIO:		> 15 mins.	

Uma vez demonstrado, da maneira acima exposta, que o AIA é foto-oxidado quando em presença de compostos fluorescentes, comprovando-se assim a experiência de Skoog (35) com eosina e a de Galston (17) com Rbf, planejamos uma experiência com o propósito de verificar o papel desempenhado pelo oxigênio na reação, quando esta é catalisada por sulfato de quinina. Uma solução mista de AIA (25 mg/L) e sulfato de quinina (10 mg/L) foi dividida em três frações. Uma destas foi guardada no escuro e as duas outras foram expostas à luz. Numa destas últimas foi feito um borbulhamento contínuo de oxigênio contido num balão, enquanto que a outra foi simplesmente mantida ao ar. Depois de 30 minutos as amostras analisadas revelaram os teores de AIA indicados na Tabela 12.

TABELA 12

Influência de Oxigênio na foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. AIA 25 mg/L, Sulf. Quin. 10 mg/L. Tempo de exposição à luz, 30 minutos.

Condições	Leituras colorimétricas	AIA destruído %
Ar-Escuro	179	0
Ar-Luz	7	96,09
O ₂ -Luz	110	38,55

Como se vê, o resultado obtido foi absolutamente inesperado. O enriquecimento da solução em oxigênio determinou uma queda da porcentagem de foto-destruição de AIA, de 95 para 40 aproximadamente.

Para controlar este resultado surpreendente, realizamos experiências operando no sentido oposto, isto é, procurando empobrecer de oxigênio o meio. Uma solução mista análoga a da experiência anterior foi igualmente dividida em três frações. Uma, para servir de controle foi mantida no escuro. A segunda fração foi exposta à luz, ao ar, e a terceira, igualmente exposta à luz, sofreu um contínuo borbu-

lhamento de nitrogênio suprido por um balão. A análise colorimétrica das amostras tomadas dessas soluções, ao fim de 40 minutos, permitiu a construção da Tabela 13.

TABELA 13

Influência de Oxigênio na foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. AIA 25 mg/L, Sulf. Quin. 10 mg/L. Tempo de exposição à luz, 40 minutos.

Condições	Leituras colorimétricas	AIA destruído %
Ar-Escuro	175	0
Ar-Luz	74	57,72
N ₂ -Luz	24	86,29

Houve, como se vê, plena confirmação do resultado anterior.

Apesar de termos tido a cautela de fazer o nitrogênio passar por dois frascos lavadores contendo solução de pirogalol alcalino, para retenção de qualquer resto de oxigênio que por ventura houvesse de mistura com o nitrogênio, no balão, resolvemos fazer mais um contrôlo destes resultados. Para a experiência seguinte usamos recipientes especiais (Fig. 4) consistindo de um pequeno Erlenmeyer em cujo interior se encontrava soldada, ao fundo, uma cuba menor, também de vidro, cilíndrica. A solução de AIA era posta na cuba interna, a de sulfato de quinina na parte externa. O frasco era fechado com rolha esmerilhada, munida de uma torneira e de um tubo ao qual se podia adaptar uma bomba de vácuo. Depois de obtido o melhor vácuo possível (1 mm) a torneira era fechada, o frasco desligado da bomba e a mistura das soluções feita por inclinação conveniente do frasco. No momento em que se fazia a mistura, expunha-se o sistema à luz direta. Preparavam-se, simultaneamente, misturas de AIA e sulfato de quinina para tratamento com oxigênio, para exposição ao ar e para manuten-

ção, também ao ar, no escuro. Os resultados de uma experiência assim montada, de 15 minutos de duração, figuram na Tabela 14, enquanto que a Tabela 15 apresenta um resumo de várias experiências realizadas sobre este ponto.

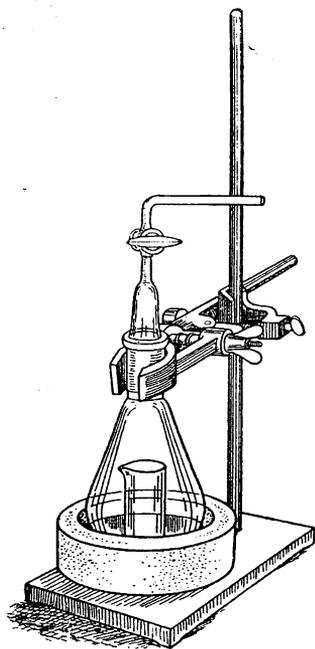


FIG. 4

Frasco usado para manter separadas as soluções enquanto se rarefia a atmosfera interna. Por inclinação conveniente a solução posta na cuba cilíndrica menor era misturada com a solução externa, depois de feito o vácuo

Apesar da grande variação dos resultados, parece não haver dúvida quanto ao fato de que, realmente, o enriquecimento do meio com oxigênio é prejudicial à reação. Esta é, de fato, sensivelmente melhorada pelo afastamento parcial do oxigênio presente, devido ao borbulhamento de nitrogênio na solução. Os resultados menos coerentes são os obtidos com o vácuo, o que não é difícil de se compreender, em vista do fato de que numa experiência pode-se ter conseguido manter um bom vácuo durante todo o tempo, enquanto que em outra, esse vácuo pode não se ter mantido tão bem, no frasco, após sua separação da bomba.

A tabela acima contém duas colunas auxiliares, uma indicando a hora em que a experiência foi executada, a outra dando a duração da mesma. Pareceu-nos conveniente incluir estes dados, porque, sem dúvida, a quantidade e a qualidade dos raios ultra-violeta que atingem a mistura de reação exposta à luz serão dos fatores que mais contribuem para as oscilações dos valores obtidos. Em dias sucessivos e também em horas diferentes do mesmo dia, oscilações consideráveis, qualitativas e quantitativas, devem se verificar, com relação às radiações ultra-violeta contidas na luz solar.

Em vista dos resultados surpreendentes obtidos e acima enumerados, resultados êsses em flagrante desacordo com

TABELA 14

Influência de Oxigênio na foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. AIA 25 mg/L, Quin. 10 mg/L. Tempo de exposição à luz, 15 minutos.

Condições	Leituras colorimétricas	AIA destruído %
Ar-Escuro	162	0
Ar-Luz	80	50,62
O ₂ -Luz	139	14,20
Vácuo-Luz	49	70,38

os obtidos por Galston para a foto-inativação de AIA induzida por Rbf, resolvemos repetir, com esta substância, algumas das experiências descritas.

TABELA 15

Influência de Oxigênio na foto-destruição de AIA por Sulfato de Quinina. AIA 25 mg/L, Sulf. Quin. 10 mg/L. Resumo de várias experiências. Os valores indicados representam % do AIA inicial.

Hora do dia	Tempo de exposição	Nitrogênio	Vácuo	Ar	Oxigênio
10	30	86,3	—	57,7	—
10	30	84,1	—	51,6	—
10	40	—	91,7	96,1	38,6
10	15	—	70,4	50,6	14,2
10	15	—	89,7	89,7	35,1
15	20	—	30,0	35,7	10,2
15	30	—	57,4	46,8	13,5

Como se pode constatar pela Tabela 16, os resultados que conseguimos com Rbf, confirmam os de Galston. O borbulhamento de oxigênio na mistura de reação não prejudi-

ca o andamento desta. O fato de também não aumentar a velocidade da reação, talvez deva ser explicado admitindo-se que a quantidade de oxigênio normalmente existente no ar já é tão grande que esse fator não pode ser limitante.

TABELA 16

Influência de Oxigênio na foto-destruição de AIA por Rbf.
AIA 25 mg/L, Rbf 10 mg/L. Tempo de exposição à luz, 25 minutos.

Condições	Leituras colorimétricas	AIA destruído %
Ar-Escuro	175	0
Ar-Luz	23	86,80
O ₂ -Luz	22	87,43

Em face desses resultados devemos admitir que a foto-destruição de AIA não é exatamente o mesmo processo, quando catalisada por substâncias diferentes. Trata-se, no caso da catálise por sulfato de quinina, como pela Rbf, de fenômenos de oxidação. Mas, enquanto que no último caso parece haver, finalmente, uma transferência de hidrogênio recebido do AIA pela Rbf, para o oxigênio atmosférico, no caso da catálise por sulfato de quinina deve faltar este último passo.

Que o oxigênio não tome parte numa reação de oxidação compreende-se sem dificuldade. Mas que ele prejudique essa reação, isso constitui um problema inteiramente novo que agora procuramos compreender.

A primeira possibilidade que nos ocorreu foi a de que o oxigênio pudesse agir como inibidor da fluorescência do sulfato de quinina. Para controlar isso executamos a seguinte experiência. Preparamos uma solução de quinina básica, em ácido sulfúrico 0,1N, com a concentração de 10 mg/L. Ao grau de fluorescência desta solução, medido num aparelho Lumetron convenientemente equipado, deu-

se o valor 100. Em seguida, três alíquotas desta solução foram tomadas. Numa se fez borbulhamento de oxigênio, na outra borbulhou-se nitrogênio, enquanto que a terceira foi simplesmente deixada ao ar. Depois de 30 minutos o grau de fluorescência destas soluções foi medido e comparado com o padrão. Os resultados foram, respectivamente, 99,5, 100 e 100, indicando que a fluorescência da quinina não foi, em absoluto, alterada pelos diversos tratamentos.

A segunda possibilidade que nos ocorreu para tentar explicar o decréscimo causado pelo oxigênio, da foto-destruição de AIA por sulfato de quinina, foi a de que talvez houvesse formação de um composto qualquer entre oxigênio e quinina, a qual ficaria, em consequência, impedida de funcionar como acceptor de hidrogênio. A ser isto verdade, o borbulhamento precoce de oxigênio na solução de sulfato de quinina, isto é, antes da mistura com AIA para exposição à luz, deveria ser tão prejudicial ao andamento da reação, quanto o borbulhamento feito na mistura, durante a exposição.

Para controlar essa possibilidade a seguinte experiência foi realizada. Uma solução de sulfato de quinina foi preparada e dividida em duas frações. Uma foi deixada num frasco lavador aberto, ao ar. A outra, posta também num lavador, sofreu, durante 3 horas, borbulhamento de oxigênio. Em seguida os dois frascos foram deixados abertos, ao ar, lado a lado. Vinte e quatro horas após, uma solução de AIA foi preparada e adicionada a cada das soluções de quinina, nas quantidades necessárias para que, no final, ambas as soluções contivessem AIA e sulfato de quinina, nas concentrações de 25 e 10 mg/L, respectivamente. O mesmo se fez, simultaneamente, com uma solução de Rbf. Depois de feita a mistura, as soluções foram expostas à luz durante 30 minutos. Ao fim deste prazo procedeu-se à análise colorimétrica. Os resultados que figuram na Tabela 17 indicam que no caso da catálise por Rbf, a oxigenação antes da mistura não prejudica o andamento da reação, o que era espe-

rado, em vista dos resultados anteriores. De outro lado, a tabela mostra que no caso de sulfato de quinina, a oxigenação anterior é tão prejudicial quanto a feita durante a reação.

TABELA 17

Influência do borbulhamento de Oxigênio nas soluções de Rbf e Sulfato de Quinina sobre a capacidade de foto-destruir posteriormente AIA. AIA 25 mg/L, Rbf e Sulf. Quin. 10 mg/L. Tempo de exposição à luz, 30 minutos.

Mistura de reação	Leituras colorimétricas	AIA destruído %
AIA-Escuro	164	0
Rbf-oxig.-Luz	7	95,74
Rbf-ar-Luz	6	96,35
Sulf. quin.-oxig.-Luz	88	46,35
Sulf. quin.-ar-Luz	59	64,03

A Tabela 18 apresenta, em conjunto, os resultados de três experiências feitas de maneira análoga, apenas com variações quanto ao tempo de duração do borbulhamento, ou quanto ao tempo de repouso entre o borbulhamento e a mis-

TABELA 18

Influência do borbulhamento de Oxigênio nas soluções de Rbf e Sulfato de Quinina sobre a capacidade de foto-destruir posteriormente AIA. AIA 25 mg/L, Rbf e Sulf. Quin. 10 mg/L. Resumo de 3 experiências. Os valores indicados representam % do AIA inicial.

Mistura de reação	AIA destruído %		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Rbf-Ar	95,4	95,9	100,0
Rbf-Oxig.	95,9	97,9	100,0
Sulf. quin.-Ar	64,1	94,5	93,6
Sulf. quin.-Oxig.	46,4	79,9	74,2

tura com AIA, ou, finalmente, ao tempo de exposição à luz. Na tabela só aparecem os resultados finais, isto é, as porcentagens de AIA inicial destruído em cada caso.

Não há dúvida, pois, quanto a existência de um efeito prejudicial do oxigênio sobre a reação em presença de sulfato de quinina. Embora seja arrojado afirmar categóricamente que se processe uma ligação de qualquer natureza entre oxigênio atmosférico e quinina impedindo-a de funcionar mais tarde como acceptor de hidrogênio, os resultados obtidos parecem ao menos acenar a essa possibilidade. *

Outro ponto do problema, que resolvemos considerar, foi verificar se, durante a reação haveria um consumo de quinina. Indicações nesse sentido foram buscadas com o método fluorométrico. Preparou-se uma solução de quinina básica, de teor conhecido, em ácido sulfúrico 0,1 N, isento de gases dissolvidos. Várias diluições dessa solução foram feitas. As medidas do grau de fluorescência deram os valores da Tabela 19, com os quais se construiu a curva pa-

TABELA 19

Fluorescência de Quinina em H_2SO_4 0,1 N.

Quinina mg*	Leituras fluorométricas
0,4	100,0
0,3	84,0
0,2	62,5
0,1	34,5
0,05	17,0

* Os valores aquí indicados referem-se ao teor de quinina em amostras de 25 cc.

drão da Fig. 5. Pode-se verificar que a curva, na sua quasi totalidade, indica uma relação linear entre grau de fluorescência e teor de quinina. Para completa segurança tra-

* Que quinina pode ser oxidada não há dúvida. A literatura menciona a possibilidade de sua oxidação com permanganato, a frio, com formação de ácido fórmico e também a formação de óxidos de quinina em presença de água oxigenada (41, pág. 418).

balhamos com concentrações de quinina que caíam na metade inferior da curva.

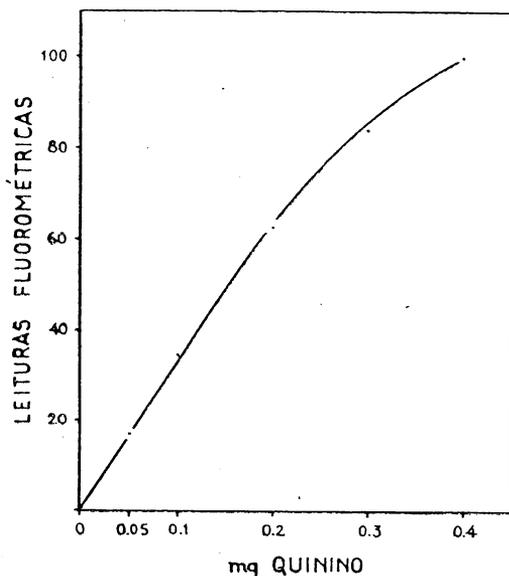


FIG. 5

Curva de fluorescência de quinina em H_2SO_4 , 0,1 N. Em abscissa teor de quinina em amostras de 25 cc.

Foi preparada uma solução (em ácido sulfúrico 0,1 N) contendo 25 mg/L de AIA e 5 mg/L de quinina. Uma alíquota foi imediatamente removida para o escuro. Outra foi exposta às radiações ultra-violeta emitidas pela lâmpada do próprio aparelho Lumetron, sem emprego de nenhum filtro. A intervalos de alguns minutos, fazia-se a leitura da fluorescência dessa solução, a partir do momento da mistura, antes da irradiação, até cerca de 70 minutos após o início. Os dados obtidos figuram na Tabela 20. Com eles foi construída a Fig. 6 onde se observa uma queda da fluorescência, rápida a princípio, mais lenta depois, até cessar quasi, ao fim de aproximadamente 1 hora de irradiação. A alíquota mantida no escuro foi retirada ao fim de 52 minutos e sua fluorescência medida indicou um valor de 44, praticamente idêntico ao inicial, 45. Essa amostra foi ago-

ra deixada à luz difusa natural, do laboratório. Dez minutos após, nova leitura fluorométrica indicou um valor de 39, comparavel ao valor de 37,5 obtido para a solução irradiada com ultra-violeta durante 9 minutos.

TABELA 20

Queda da fluorescência de uma solução contendo AIA 25 mg/L e Sulfato de Quinina 5 mg/L, em virtude de irradiação com luz ultra-violeta. Duração da experiência, cêrca de 70 minutos.

Tempo de irradiação em minutos	Leituras fluoro-métricas	Equiv. de Quinina mg/L
0	45,0	5,000
3	42,0	4,666
6	39,5	4,388
9	37,5	4,166
13	35,0	3,888
19	33,5	3,722
22	32,5	3,611
25	31,5	3,500
28	29,5	3,277
31	29,0	3,222
34	28,0	3,111
37	27,0	3,000
40	26,5	2,944
43	25,5	2,833
46	25,0	2,777
49	24,0	2,666
52	24,5	2,722
58	24,0	2,666
64	23,5	2,611
67	23,0	2,555

Ao retirarmos a amostra do escuro, fizemos uma prova qualitativa de AIA, com o reagente de Salkowski. Desenvolveu-se intensa côr rosa. A mesma prova feita com a amostra irradiada não desenvolveu praticamente côr alguma.

Se compararmos a curva da queda de fluorescência da mistura irradiada, com a curva de foto-destruição de AIA (Fig. 2 pág. 15) verificaremos que elas praticamente se sobre-

põem em seu andamento. A diminuição da fluorescência é muito rápida no início, como muito rápida também é a destruição de AIA; ambos os processos assumem um curso cada vez mais lento e após 50 minutos de irradiação, quando praticamente todo o AIA foi destruído, o grau de fluorescência da mistura fica constante e ambas as curvas assumem agora um trajeto quasi horizontal.

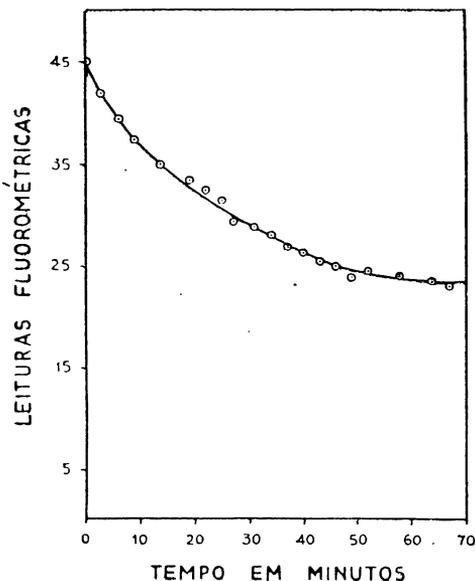


FIG. 6

Influência de tempo sobre a fluorescência de uma solução contendo AIA (25 mg/L) e Quinina (5 mg/L), irradiada com luz ultra-violeta.

Se isso indica que durante a reação há realmente um consumo de quinina, não podemos dizer. É possível que isso se dê, mas não é também impossível que haja, durante a reação, formação de um composto qualquer que exerça um efeito inibidor sobre a fluorescência de quinina.

Devemos agora voltar nossa atenção para um ponto já mencionado em rodapé à pág. 13. Trata-se do fato de que para foto-destruir AIA, a presença de um foto-sensibilizador

não é indispensável. Desde que se irradie a solução de AIA com luz conveniente, isto é, com comprimentos de onda que o composto possa absorver, sua destruição rápida poderá ter lugar.

Foram preparadas soluções contendo 25 mg/L de AIA e contendo ou não 10 mg/L de sulfato de quinina. Aliquotas dessas soluções foram mantidas no escuro, em luz solar direta, ou irradiadas com a luz ultra-violeta emitida por uma lâmpada "Mineralight". A partir do momento da mistura, cada 10 minutos, amostras eram tiradas das várias soluções para determinação de AIA. A experiência durou 90 minutos. Os dados obtidos permitiram a construção das curvas da Fig. 7.

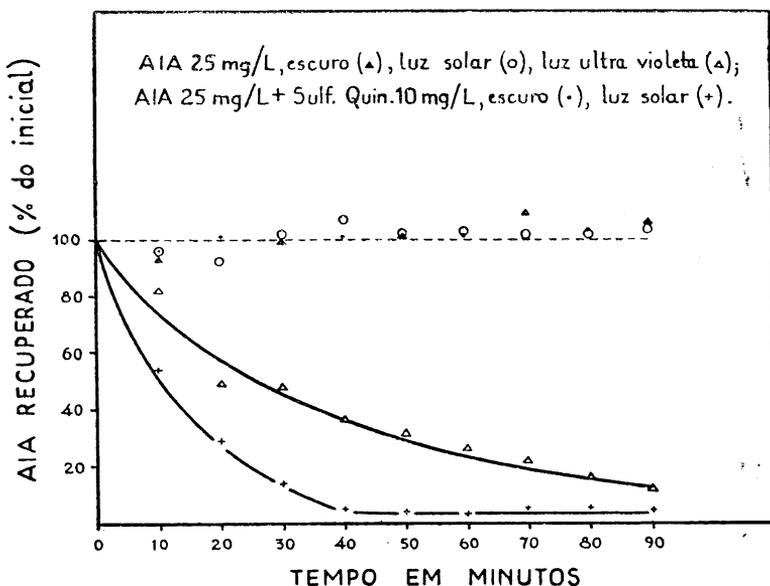


FIG. 7

Curvas de foto-destruição de AIA (25 mg/L) submetido aos vários tratamentos indicados na figura.

Verifica-se imediatamente que o conteúdo de AIA permaneceu inalterado quando a solução foi mantida no escuro.

ro, com ou sem quinina, e, ainda, quando foi exposta à luz solar, na ausência de quinina. Enquanto isso, a solução sem quinina, irradiada com ultra-violeta, decresceu consideravelmente o teor de AIA. Isso parece indicar que a luz solar com que a solução foi irradiada não continha os comprimentos de onda que podiam ser absorvidos por AIA, motivo pelo qual essa luz não podia ser eficiente na destruição do composto. A curva inferior da figura mostra claramente que a adição de quinina torna eficiente essa mesma luz. Isso porque quinina pode absorver certos de seus comprimentos de onda. Vê-se mesmo que na presença do foto-sensibilizador a reação à luz solar é até muito mais rápida que à luz ultra-violeta, sem sensibilizador.

No decurso deste trabalho pudemos verificar que a mistura de reação (AIA-sulfato de quinina), inicialmente incolor e sem cheiro, aos poucos, após exposição à luz, ia se turvando ao mesmo tempo que adquiria um cheiro de fezes que se tornava cada vez mais acentuado. A turvação indica que estava sendo formado um composto menos solúvel em água. Esta substância podia ser removida com éter, que, evaporado, deixava um resíduo pardo-avermelhado. Se a solução, tornada turva (branco-leitosa) pela irradiação, continuasse muito tempo ainda exposta à luz, precipitava-se uma substância parda e ao mesmo tempo, o cheiro de fezes desaparecia quasi completamente.

Embora não tivessem sido feitas experiências sistematizadas com o fim de identificar os produtos e conhecer o mecanismo químico da foto-inativação de AIA catalisada pelos compostos fluorescentes, as observações acima mencionadas parecem estar sugerindo que, no curso da reação, há inicialmente formação de compostos como escatol e indol, o que indicaria um ataque à cadeia lateral da molécula de AIA. Finalmente, os anéis livres de indol, ou se romperiam, ou seriam condensados, de uma ou de outra forma originando novos produtos.

DISCUSSÃO

A descoberta de Skoog (35) de que eosina determina a foto-destruição de AIA e a de Galston (17) de que a mesma reação pode ser catalisada por Rbf, já foram várias vezes mencionadas. Nossas atuais experiências, realizadas, ao menos em parte, com técnica diversa das empregadas por êsses autores, confirmam os achados de ambos. De outro lado, essas experiências permitiram, pela primeira vez, verificar que além das substâncias mencionadas, sulfato de quinina, esculina e o 2.3.5-trifenil tetrazol são capazes de exercer a mesma catálise.

Como os compostos mencionados pertencem a diferentes grupos químicos, não parece razoavel procurar estabelecer qualquer correlação entre o efeito que determinam e um de seus característicos químicos. Há, porém, uma propriedade física muito evidente, comum a todos êsses compostos, a fluorescência. Nossos dados mostram, de maneira indubitavel, que todas as substâncias fluorescentes experimentadas são ativas na foto-destruição de AIA. Êsses dados não permitem, porém, afirmar que haja uma relação de causa e efeito entre fluorescência e capacidade de catalisar a reação estudada. E' bem possivel que se trate de fenômenos coincidentes mas independentes. A mesma particularidade de organização molecular que garante a fluorescência, conferiria à molécula, ao mesmo tempo, a capacidade de catalisar alterações foto-químicas de vários compostos.

De qualquer modo, o que nossas observações permitem é a conclusão de que a destruição foto-química de AIA é um fenômeno catalisável inespecificamente por várias substâncias.

Que se trata de uma reação foto-química capaz de se desenrolar mesmo na ausência de sensibilizadores, mostram as experiências em que há destruição pronunciada do AIA submetido à luz ultra-violeta. Essas observações permitem concluir que o AIA será foto-inativo sempre que for exposto a radiações que possa absorver, desde que estas possuam um conteúdo energético adequado. A presença do foto-sen-

sibilizador é exigida, apenas quando o AIA é irradiado com comprimentos de onda que êle não pode absorver.

Também não é obrigatório, como o demonstram nossas observações, que o foto-sensibilizador tenha uma côr própria. Desde que êle possa absorver algum comprimento de onda da luz incidente, com quantidade de energia suficiente, poderá induzir a reação. E' o caso de sulfato de quinina, de esculina e do 2,3,5-trifenil tetrazol que absorvem na região do ultra-violeta e fluorescem com uma côr visível.

Essa primeira parte dos nossos trabalhos parece permitir a conclusão de que os inúmeros efeitos foto-dinâmicos descritos pelos diversos autores já citados (2, 3, 4, 5, 7, 24, 31, 32), devem ser interpretados à base de destruição de auxina (AIA) induzida pelo emprego de compostos fluorescentes. Esta interpretação é, realmente, nova. Os autores que mais se aproximaram da mesma foram Blum e Scott (2) que afirmaram que o tratamento de raízes com eritrosina promovia os conhecidos efeitos foto-dinâmicos, graças à oxidação de um determinado constituinte celular. Não foi, todavia, esclarecido qual seria êsse constituinte. E Boysen-Jensen (7), embora tivesse verificado que de órgãos de plantas provenientes de sementes tratadas com eritrosina se difundia menos auxina, não concluiu por uma destruição de hormônio ativada pelo tratamento, mas sim por uma diminuição da velocidade de seu transporte. Ainda recentemente, como também já citamos, Hamner e col. (24) deixaram de levar em conta, para explicarem os efeitos obtidos com o tratamento de plantas por umbeliferona, a possibilidade do composto induzir a foto-destruição do hormônio, fixando luz ultra-violeta.

Devemos lembrar que Galston (17), após verificar que Rbf induzia a foto-oxidação de AIA "in vitro" e sabendo, por pesquisas anteriores (20), que segmentos de epicótilos de ervilha estiolada tinham o crescimento inibido por Rbf em presença de luz mas não no escuro, compreendeu que tal reação poderia ter um significado fisiológico em fenômenos de crescimento foto-induzidos. E, para demonstrar essa pós-

sibilidade, Galston e Baker (21) realizaram um estudo detalhado que ofereceu as seguintes informações essenciais: 1 — Rbf determina a foto-inativação de AIA; 2 — o suco concentrado de tecidos (epicótilos de ervilha estiolada) contém algo capaz de determinar a foto-inativação de AIA; em vista do fato de que os vários comprimentos de onda agem de maneira análoga na foto-inativação de AIA, quer seja esta induzida pelo suco, quer pela Rbf, Rbf deve ser o componente do suco responsável pela sua capacidade de induzir a decomposição de AIA; 3 — em órgãos fototrópicos (coleoptiles de *Aveia*) há Rbf e auxina; esta auxina, difundida para bloquinhos de agar, pode aí ser destruída rapidamente pela luz, após adição de Rbf; 4 — a ação dos vários comprimentos de onda sobre o fototropismo (de coleoptiles de *Aveia*) segue uma curva que se sobrepõe ao espectro de absorção de Rbf e à curva de ação dos vários comprimentos de onda na foto-destruição de AIA catalisada por Rbf.

Diante dessas informações, sentiram-se os autores autorizados a admitir que a foto-inativação de auxina, induzida por Rbf, possa ser um fenômeno importante na fisiologia normal da planta.

Nossas presentes observações parecem estender a outros compostos fluorescentes, esta possibilidade de participação em reações fisiológicas normais. Para tanto é indispensável, naturalmente, demonstrar que o composto invocado a participar de uma determinada reação, ocorre no órgão interessado e que os comprimentos de onda que tal composto é capaz de absorver podem penetrar na planta, até o ponto em que esse composto normalmente se localiza. Como inúmeros compostos fluorescentes são de ocorrência normal, em diversos órgãos de muitas plantas (23), essa hipótese não parece inteiramente destituída de propósito.

E' natural que as observações de Galston e col. (17, 18, 20, 21) levassem a uma revisão dos conceitos que se tinham sobre certos fenômenos de crescimento induzidos pela luz, como é o caso do fototropismo. Aceitava-se geralmente que os carotenoides agissem como foto-receptores no fototropismo. As indicações em que se apoiava este ponto de vista

eram, essencialmente de três categorias: 1 — β -caroteno ocorre em órgãos foto-sensíveis como coleoptiles (9,39) e esporangióforos de *Pilobolus* e *Phycomyces* (9); 2 — a curva de ação dos vários comprimentos de onda no fototropismo (de coleoptiles de Aveia) é muito semelhante ao espectro de absorção de β -caroteno; 3 — β -caroteno foi indicado como capaz de sensibilizar a foto-inativação de auxina α pura (29).

O terceiro argumento em favor do β -caroteno como participante das reações foto-induzidas perdeu muito de sua força, uma vez que hoje em dia domina a idéia de que a auxina das plantas superiores é, como a das inferiores, principalmente ácido indolil acético (6, 10, 11, 40). De outro lado, as pesquisas citadas de Galston e col., embora não removam a possibilidade de que β -caroteno participe de tais reações, mostram que Rbf é, ao menos, tão indicada como β -caroteno, para participar das mesmas. Aliás, num trabalho muito recente, Galston e Bandurski (cit. in 18 e 19) mostram que certo mutante de milho, em que os carotenoides faltam quasi completamente (existem no máximo com 1% da concentração normal), a curvatura fototrópica é praticamente normal. O conteúdo de Rbf d'êste mutante é normal. Se estas observações não excluem perfeitamente a possibilidade de participação do caroteno no fototropismo normal, mostram, ao menos, de maneira muito convincente, que outras substâncias podem funcionar como foto-receptores.

Queremos ainda lembrar que Brauner (8) considerou dois grupos de pigmentos como podendo intervir no fototropismo das articulações (pulvini) das folhas de feijão: a clorofila que seria responsável pela absorção da luz vermelha e os carotenoides que responderiam pelas reações promovidas pelas radiações azuis. Após demonstrarmos a existência de quantidades relativamente grandes de auxina e Rbf nas articulações de feijão, admitimos que, sem excluir a possibilidade de participação do caroteno no fototropismo das mesmas, era necessário considerar-se também, a possibilidade alternativa da participação de Rbf (12).

Estas considerações não deveriam terminar sem que antes fosse feita menção das experiências de van Overbeek (37) que verificou que coleóptiles de Aveia mostram redução de crescimento após iluminação, somente quando crescendo com auxina *a* ou *b*, mas não com AIA. Mas, como já foi salientado por Galston (19), van Overbeek usou "coarse corn meal" como fonte de auxina *a*, por não dispor desta na forma pura. O autor aceitou como auxina *a* a auxina presente nesse material, em virtude do trabalho de Kögl, Erxleben e Haagen Smit (28), mas hoje sabemos que o endosperma de milho contém grande quantidade de AIA (1). Assim, concordamos com Galston (19) em que é possível interpretar os dados de van Overbeek simplesmente em termos de destruição de AIA.

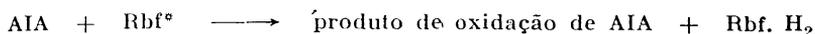
Queremos ainda lembrar que há pouco mais de 10 anos, ao fazer uma revisão de literatura sobre o fototropismo, van Overbeek (38) referiu-se a um trabalho de Kögl (27) sobre o mecanismo da inativação de auxina *a* pura pela luz ultra-violeta, nos seguintes termos: "Kögl, in studying the chemistry of inactivation of pure auxin *a* and *b* in ultra-violet light, found that the substances are in equilibrium with their lactone. Lactones, which are also active, are changed by the ultra-violet light into the inactive *lumi auxin a lactone*. Kögl suggested that a similar change in molecular structure might take place in plants when exposed to visible light. This would explain why auxin-*a* is destroyed by light and indoleacetic acid is not; the latter can not form a lactone" (l. c. pág. 667).

Estamos certos de que o próprio van Overbeek hoje não endossaria essas idéias que, além de não terem sido confirmadas, uma vez que foi demonstrado que AIA pode ser facilmente foto-inativado, não são também muito lógicas, pois implicam numa afirmativa bem clara de que só compostos que podem formar lactonas são passíveis de destruição pela luz.

Passemos agora às considerações que dizem respeito ao mecanismo das alterações foto-químicas induzidas na

molécula de AIA em presença dos compostos fluorescentes.

Já foi mencionado que em todos os casos parece tratar-se de uma oxidação. Nêsse particular, nossas observações coincidem com as de outros autores como as de Skoog (35) para eosina e Galston (17) para Rbf. Êste último autor, verificando que em atmosfera de árgon, a foto-inativação de AIA por Rbf caía do valor de 95,5% para 11,6%, acreditou poder escrever as seguintes reações para representar o processo:



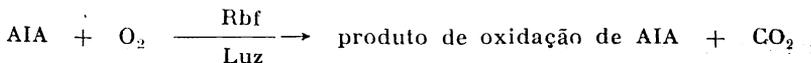
($h\nu$ = energia absorvida e Rbf° = riboflavina ativada).

Assim, a Rbf ativada funcionaria como um transportador de hidrogênio entre AIA e oxigênio.

Parece ter ficado claro, de nossas experiências, que não será com todos os compostos fluorescentes que êste último passo da reação se verifique. Ao menos com relação ao sulfato de quinina, parece fora de dúvida que o oxigênio prejudica sensivelmente a reação. Êste fato é evidentemente incompatível com a idéia de que o oxigênio funcione como um acceptor final do hidrogênio fixado pela quinina.

Galston não demonstrou a libertação de hidrogênio por AIA. Essa demonstração é, no entanto, muito facil, utilizando-se de mistura com os componentes da reação (AIA-composto fluorescente) algumas gotas de azul de metileno, como fizemos em nossas experiências.

Baseado em medidas manométricas que mostraram que aproximadamente 1 mol de O_2 é absorvido e 1 mol de CO_2 é libertado, por mol de AIA destruído, Galston admittiu ainda poder escrever o seguinte:



Que o mecanismo não deve ser, obrigatoriamente, o mesmo em todos os casos, mostra já, de modo bem claro, o trabalho de Gordon e Weber (22) sobre a inativação de AIA promovida por irradiação com raios X. Esses autores indicam que em excesso de oxigênio a inativação é devida essencialmente à abertura do anel, enquanto que em baixa tensão de oxigênio a razão de inativação é muito pequena e a degradação ocorre especialmente por ataque à cadeia lateral.

Nossas observações neste ponto foram apenas acidentais, não tendo ainda sido realizadas experiências sistematizadas, para uma tentativa de esclarecimento do mecanismo da destruição, nem de reconhecimento dos compostos que se formam durante a reação. Em todo o caso, as observações já mencionadas sobre a formação de um composto pouco solúvel em água, com forte cheiro de fezes, que finalmente desaparece quando a exposição à luz se prolonga, havendo então formação de um precipitado pardo, quase sem cheiro, levam-nos a admitir, ao menos provisoriamente, a hipótese de que no caso da foto-inativação catalisada por sulfato de quinina, ocorra primeiro um ataque à cadeia lateral, havendo formação de compostos como escatol e indol. Se mais tarde haveria condensação de vários anéis livres de indol, possibilidade aventada por Galston (18), ou ruptura de anel com formação de compostos do tipo de antranilatos, segundo suposição de Gordon (informação pessoal), que se baseou em medidas espectrofotométricas, não podemos decidir.

A Gordon verificou que da solução irradiada com raios X, em presença de ar, desaparece o máximo de absorção de 280 m μ . que é característico para AIA e outros derivados do indol substituídos na posição 3. Ao mesmo tempo um novo máximo aparece na região de 255 m μ . Este máximo sugere fortemente a presença de compostos como antranilatos, fenonas e ácidos fenil-alquil carboxílicos que poderiam surgir por ruptura do anel pirrólico na posição alfa.

Em experiências preliminares nossas, foi possível verificar que o espectro de absorção do ultra-violeta, da mis-

tura AIA-sulfato de quinina, realmente se modifica consideravelmente, após exposição da mistura a radiações ultra-violeta. Pudemos constatar que, neste caso, há também o aparecimento de um novo máximo de absorção, na região indicada por Gordon.

Para finalizar esta apresentação, gostaríamos de destacar as duas conclusões — entre algumas que, a nosso ver, é possível tirar — às quais emprestamos maior importância: 1 — a inativação de AIA pela luz, em presença de compostos fluorescentes, resulta de alterações foto-químicas catalisadas por esses compostos, de maneira inespecífica; 2 — AIA deve ser o constituinte celular interessado nos fenômenos foto-dinâmicos induzidos nas plantas por compostos fluorescentes, que assim ágem através de sua destruição.

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho só foi possível graças à colaboração de inúmeras pessoas e Institutos. O Dr. Rubens S. Pereira prestou auxílio inestimável nas determinações foto-colorimétricas e o Dr. Germinio Nazário, do Instituto Adolfo Lutz, nas medidas fluorométricas. O Dr. A. Burkart do Instituto de Botanica Darwinion (Argentina), identificou a espécie de feijão empregada nos testes biológicos. A riboflavina usada foi gentilmente cedida pelo Dr. Mario Augusto Pereira, do Instituto Pinheiros, a esculina, pelo Dr. Germinio Nazário e o 2,3,5-trifenil tetrazol pelo Dr. Luiz F. G. Labouriau, do Instituto Oswaldo Cruz (Manguinhos). Os desenhos foram executados por D. Maria José Guimarães. Finalmente, os Profs. Dorival F. Ribeiro, da Faculdade de Medicina Veterinária, Heinrich Hauptmann e Felix Rawitscher ofereceram valiosas sugestões e conselhos.

A todos consignamos aqui nosso profundo reconhecimento.

R E S U M O

Sabe-se que compostos fluorescentes são capazes de determinar, foto-quimicamente, alterações de várias substâncias. Conhecem-se também muitos efeitos foto-dinâmicos de tais compostos sobre plantas e animais. Até o presente, porém, não foi definido claramente qual o mecanismo de ação dessas substâncias.

Descobriu-se recentemente que riboflavina (Rbf) é capaz de destruir o fito-hormônio ácido indolil acético (AIA), em presença de luz mas não no escuro. Já se sabia que eosina determina o mesmo fenômeno.

O presente trabalho mostra que muitos outros compostos são capazes de catalisar a mesma reação. Entre esses compostos figuram o sulfato de quinina, a esculina e o 2,3,5-trifenil tetrazol.

Tratando-se de substâncias pertencentes a diversos grupos químicos, não parece razoável procurar uma relação entre um certo caráter químico e a capacidade de foto-inativar AIA. Como todos os compostos estudados apresentam em comum a propriedade da fluorescência, é possível que a capacidade de induzir a foto-destruição de AIA seja um atributo geral de tais compostos, sem que, necessariamente, haja uma relação de causa e efeito entre fluorescência e dita atividade.

E' possível que os efeitos foto-dinâmicos induzidos em plantas com substâncias fluorescentes se exerçam através da inativação de AIA.

Como substâncias fluorescentes ocorrem, em grande número, naturalmente, nas plantas, é possível que muitas delas desempenhem um papel fisiológico em reações de crescimento determinadas pela luz.

Quanto ao mecanismo químico da foto-inativação de AIA, parece tratar-se, em todos os casos, de um processo de oxidação, por transferência de hidrogênio. Em alguns casos esta é favorecida por oxigênio (Rbf) enquanto que em outros é prejudicada (sulfato de quinina). E' possível que

neste caso se forme um composto entre oxigênio e quinina a qual então ficaria impedida de funcionar como aceptor de hidrogênio.

A medida que AIA é destruído decresce o grau de fluorescência da mistura AIA-sulfato de quinina. Não sabemos se isto indica modificação da quinina ou formação de um composto que age como inibidor de sua fluorescência.

Exposta à luz a mistura acima, forma-se um precipitado pardo com forte cheiro de fezes que finalmente desaparece se a exposição se prolongar. É possível que na reação se formem primeiro compostos como escatol e indol, por ataque à cadeia lateral do AIA. Haveria depois, ou ruptura do anel, ou condensação de vários anéis livres de indol.

S U M M A R Y

The fact that fluorescent substances may determine photochemical alteration of several kinds of molecules is well known. It is also known that such compounds may induce photo-dynamic effects on both plants and animals. The mechanisms through which these effects are determined, however, are not well established.

It is a fact that both riboflavin and eosin cause the inactivation of indoleacetic acid in presence of light but not in the dark. The present author has shown recently that other fluorescent substances, such as quinine sulfate, aesculin and the 2,3,5-triphenyl tetrazolium, are equally effective in bringing about IAA photo-inactivation. *Chloro*

Since the substances that are active in this reaction belong to several unrelated chemical groups, it does not seem probable that a chemical characteristic should be responsible for the activity. It seems more reasonable to admit that the reaction is of a photo-chemical nature, being catalyzed non-specifically by fluorescent substances in general.

It does not necessarily follow that there is a cause and effect relationship between fluorescence and capacity of in-

ducing IAA photo-inactivation. It may well be that both phenomena having the same cause, are concomittant but independent.

It is the author's belief that the photo-dynamic effects referred to above are exercised through the inactivation of IAA. Since fluorescent substances are frequently found among natural plant substances, it is possible that they play a rôle in growth reactions brought about by light.

As far as the mechanism of IAA photo-inactivation is concerned, it seems to be in every case, an oxidation reaction. In some cases (riboflavin) the reaction is bloked by the absence of air-oxygen. In other instances however (quinine sulfate), air-oxygen has an inhibitory effect on the reaction. The reason for this is not yet well understood.

As IAA is destroyed the fluorecence of the mixture solution (IAA-quinine sulfate) decreases. It is not known whether this is due to an alteration of the quinine molecule or to the formation of some substance that has an inhibitory action on the quinine fluorescence.

Upon exposition to light the mixture solution becomes turbid and acquires the smell of feces. If the exposition is prolonged a brown precipitate is formed and the smell of feces disappears. It is then possible that during the reaction such compounds as skatole and indole are formed by side-chain degradation of the IAA molecule. There would occur later either the opening of the indole ring or the condensation of several free indole rings into a more complex substance.

L I T E R A T U R A

- 1 — BERGER, J. and AVERY, G. S., JR. Isolation of an auxin precursor and an auxin (indoleacetic acid) from maize. *Amer. Jour. Bot.* 31: 199-203, 1944.
- 2 — BLUM, H. F. and SCOTT, K. G. Photodynamically induced tropisms in plant roots. *Pl. Physiol.* 8: 525-536, 1933.
- 3 — BOAS, F. Zur Kenntnis der Eosinwirkung auf das Wachstum der Wurzeln. *Ber. deutsch. bot. Ges.* 45: 61-, 1927.

- 4 — BOAS, F. Eine neue Eosinwirkung auf Pflanzen. Ber. deutsch. bot. Ges. 51: 274-275, 1933.
- 5 — BOAS, F. und MERKENSCHLAGER, F. Reizverlust, hervorgerufen durch Eosin. Ber. deutsch. bot. Ges. 43: 381-390, 1925.
- 6 — BONNER, J. and WILDMAN, S. G. Contributions to the study of auxin physiology. Sixth Growth Symposium, U.S.A. 51-68, 1947.
- 7 — BOYSEN-JENSEN, P. Über Wuchsstoff in Wurzeln die mit Erythrosin vergiftet sind. Planta 22: 404-410, 1934.
- 8 — BRAUNER, L. Untersuchungen über die phototropischen Reaktion des Primärblattgelenks von *Phaseolus multiflorus* in weissem und in farbigem Licht. Rev. Fac. Sci. Istanbul, XIII-B, 3: 211-267, 1948.
- 9 — BÜNNING, E. Phototropismus und Carotinoide. II. Das Carotin der Reizaufnahmezonen von *Pilobolus*, *Phycomyces* und *Avena*. Planta 27: 148-159, 1937.
- 10 — FERRI, M. G. Hormônios e substâncias sintéticas promotoras ou reguladoras do crescimento das plantas. Ciênc. e Cult. I, 3: 75-84, 1949.
- 11 — FERRI, M. G. Síntese, natureza química, modo de ação e inativação dos fitohormônios. Rodrig. 25: 3-18, 1949.
- 12 — FERRI, M. G. Riboflavina e fototropismo das articulações das folhas de feijão. Ciênc. e Cult. II, 3: 206-209, 1950.
- 13 — FERRI, M. G. Fluorescence and photoinactivation of indoleacetic acid. Arch. Biochem. no prelo, 1950.
- 14 — FERRI, M. G. Photoinactivation of the plant hormone indoleacetic acid by fluorescent substances. Nature, no prelo, 1950.
- 15 — FERRI, M. G. and CAMARGO, L. V. C. Influence of growth substances on the movement of the pulvini of the primary leaves of bean plants. An. Acad. Brasil. Ciênc. 22: 161-170, 1950.
- 16 — FERRI, M. G. and GUIDOLIN, R. Fluorescence and photoinactivation of snake poisons. Science, no prelo, 1950.
- 17 — GALSTON, A. W. Riboflavin-sensitized photooxidation of indoleacetic acid and related compounds. Proc. Nat. Ac. Sci., Wash. 35: 10-17, 1949.
- 18 — GALSTON, A. W. Riboflavin, light, and the growth of plants. Science 111: 619-624, 1950.

- 19 — GALSTON, A.W. Phototropism. II. Bot. Rev. 16: 361-378; 1950.
- 20 — GALSTON, A.W. and HAND, M.E. Studies on the physiology of light action. I. Auxin and light inhibition of growth. Amer. Jour. Bot. 36: 85-94, 1949.
- 21 — GALSTON, A.W. and BAKER, R.S. Studies on the physiology of light action. II. The photodynamic action of riboflavin. Amer. Jour. Bot. 36: 773-780, 1949.
- 22 — GORDON, S.A. and WEBER, R.P. The effect of X-radiation on indoleacetic acid and auxin levels in the plant. Resumo apresentado à Seção de Fisiologia da Bot. Soc. of America, Columbus, Ohio, 1950.
- 23 — HAITINGER, M. Die Fluoreszenzanalyse in der Mikrochemie. Emil Haim & Co., Wien und Leipzig, 1937.
- 24 — HAMNER, C.L., SELL, H.M., KLOMPARENS, Wm., and VAUGHN, J. R. Selective inhibition of the growth of green plants and fungi by beta methyl umbelliferone. Bot. Gaz. 112: 135-137, 1950.
- 25 — HAND, D.B., GUTHRIE, E.S., and SHARP, P.F. Effect of oxygen light and lactoflavin on the oxidation of vitamin C in milk. Science 87: 439-441, 1938.
- 26 — HOPKINS, F.G. The influence of lactoflavin as a promoter of the photocatalytic oxidation of ascorbic acid. J. Soc. Chem. Ind. 56: 934, 1937.
- 27 — KÖGL, F. Wirkstoffprinzip und Pflanzenwachstum. Naturwiss. 29: 465-470, 1937.
- 28 — KÖGL, F., ERXLEBEN, H. und HAAGEN SMIT, A.J. Über die Isolierung der Auxine a und b aus pflanzlichen Materialien. IX. Über pflanzliche Wachstumsstoffe. Zeitschr. physiol. Chem. 225: 215-229, 1934.
- 29 — KÖGL, F. und SCHURINGA, G.J. Über die Inaktivierung von Auxin-a-lacton bei verschiedenen Wellenlaengen und den Einfluss von Carotinoiden auf die Lichtreaktion. Zeitschr. physiol. Chem. 280: 148-161, 1944.
- 30 — KON, S.K. and WATSON, M.B. The effect of light on the vitamin C of milk. Biochem. J. 30: 2273-2290, 1936.
- 31 — METZNER, P. Über induzierten Phototropismus. Ber. deutsch. bot. Ges. 41: 268-274, 1923.
- 32 — MILDEBRATH, D. Untersuchungen über die Beeinflussung der geotropischen Reaktion der Wurzeln von Zea Mays nach Vorbehandlung mit Fluoresceinfarbstoffen und Salzen. Bot. Arch. 34: 11-215, 1932.

- 33 — MITCHELL, J.W. and BRUNSTETTER, B.C. Colorimetric methods for the quantitative estimation of indole (3) acetic acid. *Bot. Gaz.* 190: 802-816, 1939.
- 34 — SALKOWSKI, E. Über das Verhalten der Skatolcarbonsäure in Organismus. *Zeitschr. physiol. Chem.* 9: 23-33, 1885.
- 35 — SKOOG, F. The effect of X-irradiation on auxin and plant growth. *Jour. Cell. and Comp. Physiol.* 7: 227-270, 1935.
- 36 — TANG, Y.W. and BONNER, J. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea-seedlings. *Arch. Biochem.* 13: 11-25, 1947.
- 37 — VAN OVERBEEK, J. Growth substances curvatures of *Avena* in light and dark. *Jour. Gen. Physiol.* 20: 283-309, 1936.
- 38 — VAN OVERBEEK, J. Phototropism. *Bot. Rev.* 5: 655-681, 1939.
- 39 — WALD, G. and DU BUY, H.G. Pigments of the oat coleoptile. *Science* 84: 247, 1936.
- 40 — WILDMAN, S.G. and BONNER, J. Observations on the chemical nature and formation of auxin in the *Avena* coleoptile. *Amer. Jour. Bot.* 35: 740-746, 1948.
- 41 — WINTERSTEIN, E. und TRIER, G. *Die Alkaloide*, 2a. ed. Berlin, 1931.