

ANA MARIA VIANA

ESTUDOS SOBRE CRESCIMENTO E CONTEÚDO DE ESTEVIOSÍDEO,
AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E PROTEÍNA DE FOLHAS
DE Stevia rebaudiana Bert. EM DOIS FOTOPERÍODOS.

Dissertação de Mestrado Apresentada
ao Departamento de Fisiologia Vegetal
do Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas.

CAMPINAS

Estado de São Paulo

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jacques Robert Metivier, do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pela orientação e auxílio na elaboração desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários e estagiários do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, pelo estímulo e amizade, e a todos que, de uma maneira ou de outra, tornaram possível este trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O princípio doce de <u>Stevia rebaudiana</u> Bert.: o esteviosídeo	1
1.2. Potencial econômico do esteviosídeo.....	6
1.3. Propriedades biológicas do esteviosídeo e de extra- tos de folhas de <u>Stevia rebaudiana</u> Bert.....	7
1.4. Propriedades biológicas do esteviol.....	8
1.5. Outros compostos de <u>Stevia rebaudiana</u> Bert.....	11
1.6. Objetivos do trabalho	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Material	13
2.2. Métodos	13
2.2.a. Condições de Cultivo	13
i. Germinação	13
ii. Condições de Crescimento	13
2.2.b. Medidas de Crescimento	14
i. Altura das plantas	14
ii. Comprimento das folhas	14
iii. Tempo de aparecimento dos pares foliares ..	14
iv. Peso fresco foliar	15
v. Área foliar	15
vi. Peso seco foliar	15
2.2.c. Análises de proteína e açúcar	15
i. Dosagem de proteína	16
ii. Dosagem de açúcar	17

2.2.d. Cromatografia sobre camada delgada.....	18
i. Preparação de Cromatoplasmas	18
ii. Aplicação das amostras	18
iii. Desenvolvimento e revelação das cromatoplasmas	18
2.2.e. Análises dos resultados	19
3. RESULTADOS	20
3.1. Separação e dosagem de esteviosídeo de extratos de folhas de <u>Stevia rebaudiana</u> Bert.....	20
3.1.a. Extração de açúcares solúveis totais	20
3.1.b. Separação de esteviosídeo	21
i. Cromatografia unidimensional	21
ii. Cromatografia bidimensional	21
3.1.c. Dosagem de esteviosídeo	29
i. Tempo de ativação das cromatoplasmas	29
ii. Tempo de eluição	29
iii. Eluição do esteviosídeo	30
3.1.d. Eficiência da glicose como padrão	36
3.2. Estudos sobre o efeito de fotoperíodos no crescimento de <u>Stevia rebaudiana</u> Bert.	40
3.2.a. Aspecto geral das plantas	40
3.2.b. Análise de crescimento	42
i. Altura das plantas	42
ii. Número e tempo de aparecimento de pares foliares	44
iii. Crescimento das folhas	50
iv. Outros aspectos do crescimento das folhas ..	56
3.3. Análises de proteína, açúcares solúveis totais e esteviosídeo em folhas de <u>Stevia rebaudiana</u> Bert.....	61
3.3.a. Análise do nível de açúcares solúveis totais	61

3.3.b. Relação entre proteína e açúcares solúveis totais	66
3.3.c. Variação nos conteúdos de açúcares solúveis totais e proteína durante a ontogenia de folhas de plantas crescidas em DL	77
3.3.d. Efeito de fotoperíodos nos conteúdos de proteína, açúcares solúveis totais e esteviosídeo de folhas	83
i. Conteúdo proteico de folhas de plantas crescidas em DL e DC	85
ii. Nível de esteviosídeo e de açúcares solúveis totais de folhas de plantas crescidas em DL e DC	88
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	95
5. RESUMO	112
6. SUMMARY	114
7. BIBLIOGRAFIA	116

1. INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana Bertoni é uma Compositae originária das regiões montanhosas do nordeste do Paraguai e fronteira com o Brasil (Bertoni, 1889; Bertoni, 1918; Thomas, 1937). Trata-se de planta perene que alcança de 60 a 80 cm de altura e com fotoperíodo crítico de 13 a 14 horas, abaixo do qual floresce, sendo, portanto, planta de dias curtos para floração (Brücher, 1974; Rocha, 1975; Válio & Rocha, 1977; Zaidan et al., 1978).

O estudo desta planta é importante por várias razões:

- a) contém altos níveis de uma substância 300 vezes mais doce que a sacarose, o esteviosídeo, que lhe confere grande potencial econômico pois, não possuindo valor calórico, poderá substituir os adoçantes sintéticos, caso estes sejam proibidos por razões médicas.
- b) embora contraditórios, alguns trabalhos relatam a propriedade anticoncepcional de extratos desta planta, o que reforça sua importância econômica.
- c) a hidrólise do esteviosídeo fornece o esteviol, um diterpeno com semelhanças estruturais às giberelinas e que mostra atividade biológica deste grupo de substâncias reguladoras de crescimento em alguns biotestes.
- d) contém outros compostos que podem assumir importância econômica e auxiliar nos estudos taxonômicos deste grupo.

1.1. O PRINCÍPIO DOCE DE Stevia rebaudiana Bert.:

O ESTEVIOSÍDEO

Antes de ser descrita pela primeira vez, em 1889, o poder

adoçante de Stevia já era conhecido pelos habitantes de sua região de origem, que misturavam fragmentos de caules e folhas secas desta planta às bebidas amargas (Bertoni, 1889; Thomas, 1937; Fletcher, 1955; Brücher, 1974). Por esta razão é conhecida pelas populações indígenas por "Kaa-he-e", denominação guarani, que significa erva-doce (Bertoni, 1889; Thomas, 1937; Fletcher, 1955).

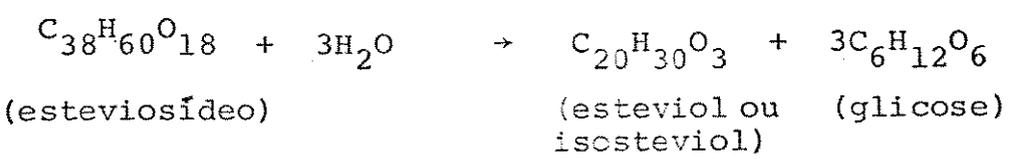
Os estudos sobre a natureza química do princípio doce de Stevia rebaudiana iniciaram-se com Rebaudi, em 1900, que o classificou, erroneamente, como sendo o glicosídeo glicirrizina (Bertoni, 1918; Brücher, 1974). A partir de então, várias tentativas foram feitas por Rasenack, em 1908, e por Dieterich, em 1909, na Alemanha, no sentido de cristalizar e caracterizar este princípio, mas somente a partir de 1931 é que ocorreu real progresso neste campo, resultado das investigações mais detalhadas conduzidas pelos estudiosos franceses Bridel & Lavieille (Bertoni, 1918; Bell, 1954; Wood et al., 1955; Brücher, 1974).

Bridel & Lavieille, através de extração alcóolica-aquosa de folhas, obtiveram um glicosídeo puro, cristalino, o esteviosídeo, na proporção de 60 a 65 g por kg de folhas secas, ou seja, 7% do peso seco das folhas. Para caules este valor foi de 3%. Em pequenas quantidades, este glicosídeo possuía sabor doce, lembrando aquele das folhas, mas em grandes quantidades causava forte sensação de amargor. Verificaram, então se tratar de uma substância 300 vezes mais doce que a sacarose. Estabeleceram que o ponto de fusão desta substância estava entre 238-239 °C, e que era insolúvel em éter de petróleo, clorofórmio, mas solúvel em álcool absoluto, etanol, metanol e água (1 g de esteviosídeo é solúvel em 35 g de álcool 95°, 615 g de metanol 99°, 735 g de acetona, 800 g de água) (Bridel & Lavieille, 1931a; Thomas, 1937).

A hidrólise do esteviosídeo foi conseguida com ácido sulfúrico 5% em banho maria a 100 °C. Após três horas nestas condições,

obtiveram um produto não glicosídico, que se cristalizava, o esteviol, e outro glicosídico tendo D-glucose como único componente. Verificaram que o sabor extremamente doce desaparecia depois da hidrólise, dando lugar a um sabor pouco açucarado à solução aquosa, conferido pela glicose. A porção não glucídica perfazia 40,38% do esteviosídeo, enquanto a glucídica que permanecia em solução, 67,08% (Bridel & Lavieille, 1931a,b). Estes autores comprovaram ainda a viabilidade da hidrólise enzimática do esteviosídeo pela ação de suco hepatopancreático de Helix pomatia. O açúcar resultante coincidia com o obtido pela hidrólise ácida, porém, o componente não glucídico era um isômero do obtido anteriormente. A fração não glucídica, liberada pela hidrólise enzimática do esteviosídeo, denominou-se esteviol, enquanto que aquela resultante da hidrólise ácida foi denominada isosteviol (Bridel & Lavieille, 1931c; Wood et al., 1955). A hidrólise ácida provocava, portanto, a isomerização do esteviol a isosteviol.

A fórmula da aglicona esteviol foi definida como sendo $C_{20}H_{30}O_3$, e a partir da produção de glicose, após hidrólise do esteviosídeo, os autores deduziram que $C_{36}H_{60}O_{18}$ seria a fórmula do esteviosídeo. Assim, uma molécula de esteviosídeo se constituiria de uma molécula de esteviol ligada a três moléculas de glicose, e a equação proposta para hidrólise seria:



(Bridel & Lavieille, 1931c; Wood et al., 1955).

Com a morte precoce de Bridel, em 1931, encerrou-se a primeira fase da investigação do esteviosídeo. Apenas em 1952 tais estudos foram retomados na América do Norte, por pesquisadores do

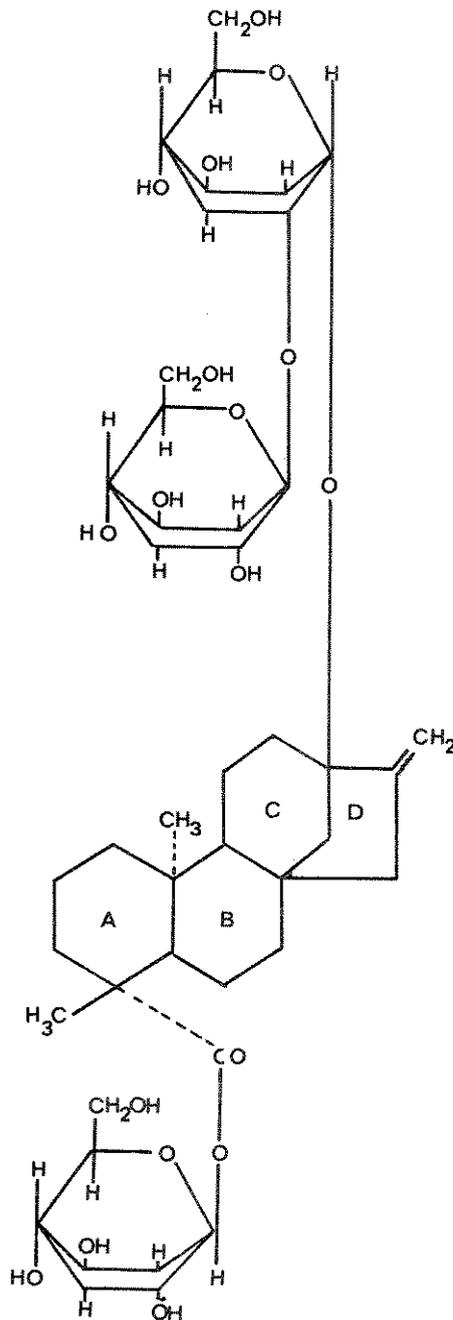
National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases. Naquela época, o interesse pelos produtos naturais era grande, pois vários deles tinham estrutura química útil à síntese de drogas para fins antiartríticos (Fletcher, 1955). Os pesquisadores então, liderados por Fletcher, empenharam-se no estudo do esteviosídeo e embora não encontrassem qualquer poder antiartrítico, os trabalhos elucidaram detalhes da estrutura química desta substância (Anônimo, 1956).

Foram investigados primeiramente, a estrutura e modo de ligação dos açúcares, e em segundo lugar, a aglicona e seus produtos de transformação. Estabeleceu-se que duas unidades de glicose ligam-se entre si de maneira não muito usual na natureza pelo C-2, e em seguida ao oxigênio da aglicona. Este tipo de ligação C-2 entre as moléculas de glicose é conhecido em apenas três casos: em soforose (2-O-β-D-glucopyranosyl-D-glucose) que ocorre como um glicosídeo de campferol em frutos de Sophora japonica; no polissacarídeo de tumores vegetais e na hemicelulose de um tipo de musgo. A outra unidade de glicose liga-se em C-1 com um grupo carboxílico da aglicona, de ligação altamente impedida, por causa da estrutura espacial. Este tipo de ligação até então não havia sido encontrado na natureza (Wood et al., 1955). Assim, a estrutura do esteviosídeo é bastante incomum, o que será discutido posteriormente.

As constatações de que os produtos das hidrólises enzimática e ácida do esteviosídeo, são diterpenóides tetracíclicos ácidos decorreu dos trabalhos de Mosettig & Ness, 1955; Wood et al., 1955; Wood & Fletcher, 1956; Vis & Fletcher, 1956; Djerassi et al., 1956; Dolder et al., 1960; Djerassi et al., 1961; Arya, 1962; Waters et al., 1962; Mosettig et al., 1963). Portanto, apenas em 1963 a estrutura química do esteviosídeo ficou completamente estabelecida. A estrutura do esteviosídeo é ilustrada na Figura 1.

Figura 1:

Estrutura molecular do esteviosídeo.



Peso Molecular do Esteviosídeo	804,90
Peso Molecular do Esteviol	316,44
Peso Molecular do Componente Glicosídico	488,46

1.2. POTENCIAL ECONÔMICO DO ESTEVIOSÍDEO

A idéia da utilização do esteviosídeo como adoçante desprovido de valor calórico (Pomaret & Lavieille, 1931) em substituição ao açúcar de cana, de beterraba e aos adoçantes sintéticos surgiu a partir da II Guerra Mundial (Fletcher, 1955; Anônimo, 1956; Arya, 1962; Bottle, 1964; Parker, 1978). A importância econômica desta substância pode, atualmente, se tornar maior já que os ciclamatos foram proibidos e a sacarina está em vias de ser retirada do mercado (Anônimo, 1977; Cohen, 1978).

O esteviosídeo apresenta algumas vantagens em relação ao açúcar comum e aos adoçantes sintéticos, pois possui poder adoçante extremamente alto, não é fermentável (Bertoni, 1918; Thomas; 1937) e não deixa sabor amargo após ingestão, inconveniente típico da sacarina (Fletcher, 1955). Poderia ser utilizado nas indústrias de conservas de alimentos e bebidas, como adoçante de sucos, doces e refrigerantes. Sendo antifermentável, por causa de sua estrutura química, impediria, vantajosamente a adição de muitos preservativos químicos aos alimentos (Aranda, 1941; Gattoni; 1945).

O interesse industrial pelo esteviosídeo tem sido o fator que mais tem estimulado o cultivo intensivo de Stevia rebaudiana no Japão, Coréia do Sul e mesmo em algumas regiões do Brasil (Felippe, 1977a; Felippe, 1978). No Japão o esteviosídeo é produzido em escala comercial pela Toyo Menka Karisha Co. e estudos tem sido conduzidos sobre a avaliação quantitativa e sensorial desta substância, no sentido de estabelecer sua possível utilização industrial em substituição ao açúcar e sacarina (Isima, 1976; Felippe; 1977b; Parker, 1978).

1.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO ESTEVIOSÍDEO E DE EXTRATOS DE Stevia rebaudiana Bert.

A utilização intensiva do esteviosídeo como adoçante está, em grande parte, na dependência dos estudos dos possíveis efeitos desta substância no organismo humano (Parker, 1978).

Os estudos sobre a toxicidade do princípio doce de Stevia iniciaram-se em 1915, com Kobert, que lhe atribuiu propriedades hemolíticas em glóbulos sanguíneos humanos (Kobert, 1915). Estas propriedades, entretanto, não foram confirmadas a não ser quando se trabalhava com esteviosídeo impuro, o que indicava que outras substâncias presentes nas folhas é que seriam responsáveis pelo poder hemolítico verificado anteriormente (Pomaret & Lavielle, 1931). Além disto, foi observado, ainda, por estes dois autores que o esteviosídeo quando ministrado a galinha, cobaia ou coelho, não produzia qualquer efeito tóxico, sendo eliminado muito rapidamente do organismo, sem sofrer modificações, não possuindo, portanto, valor calórico. Desta forma, teria valor medicinal para diabéticos, o que tem sido comprovado em vários testes, como os conduzidos pelo Instituto Biológico Argentino, que lançou, com grande aceitação no mercado, comprimidos de pó de folhas de Stevia com a finalidade de adoçar bebidas para diabéticos (Aranda, 1941; Brucher, 1974). O poder hipoglicemiante de Stevia rebaudiana tem sido constatado para cães e coelhos (Schmeling, 1967; Schmeling et al., 1976).

Os resultados de Pomaret & Lavielle não foram confirmados por Akashi & Yokoyama, em 1975, que verificaram que a administração, por sonda estomacal, de extratos de folhas de S. rebaudiana a ratos, causava dificuldade de movimento nestes animais, seguida de morte, após 2 horas. Quando porém se tratava de esteviosídeo, apesar de ocorrer paralisia, os animais se recuperavam. Concluiu-se, portanto, a possibilidade do pó de Stevia, como adoçante, pro

vocar efeitos deletérios no organismo humano (Felippe, 1977c).

O poder antiandrogênico do esteviol foi estudado por Dorfman & Ness, em 1960. Observaram que o esteviol interferia com a ação de testosterona quando injetado em pintos, apresentando tendência de atividade antiandrogênica. Entretanto, o esteviosídeo não é degradado no organismo, o que elimina a possibilidade de ação do esteviol (Dorfman & Ness, 1960; Rocha, 1975).

A propriedade anticoncepcional de Stevia rebaudiana mereceu vários estudos, mas permanece incerta. O chá de folhas de Stevia que as mulheres indígenas do Paraguai ingerem para controle de natalidade, reduziu de 57 a 79% a fertilidade de ratas (Planas & Kúc, 1968). Tais resultados, entretanto, não foram confirmados por outros autores que testaram o chá e soluções de esteviosídeo, também em ratas, não observando qualquer ação sobre a gravidez das mesmas (Felippe, 1977c).

Permanece, portanto, controverso o estudo sobre a toxicidade do esteviosídeo, mas são evidentes as possibilidades farmacológicas de Stevia rebaudiana.

1.4. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO ESTEVIOL

Sendo o esteviol um diterpeno tetracíclico semelhante estruturalmente às giberelinas, foi postulada por Mosettig a idéia desta substância atuar como este grupo de hormônios vegetais na regulação do crescimento das plantas (Ruddat et al., 1965a). Verificou-se que o esteviol estimulava o alongamento de bainha foliar de mutantes de milho anão d-5 (Ruddat et al., 1963; Nitsch & Nitsch 1965a) e an-1 (Katsumi et al., 1964) da mesma maneira que o ácido giberélico. Em endosperma de cevada provocava hidrólise, repetindo a ação de giberelina (Ogawa, 1975). Foi inativo, ao lado de ou-

tros derivados do caureno (caurenol e ácido caurenóico), interme_{di}ário de biossíntese de giberelinas, em outros testes de alongamento para giberelinas, com mutantes d-4 e d-2 de milho, plântulas de arroz, hipocótilo de pepino, ervilha anã e plântula de ipoméia (Katsumi et al., 1964), an-1 e an-3 de milho, mesocótilo de aveia, hipocótilo de alface, germinação de alface no escuro (Nitsch & Nitsch, 1965a). Outros autores encontraram efeitos positivos no alongamento de hipocótilo de pepino, hipocótilo de alface, crescimento de plantas de feijão e ervilha, e negativos para indução de "bolting" e floração em Kalanchoe gastonis-bonnieri, partenocarpia e alongamento de caule em Stevia rebaudiana (Rocha, 1975; Válio & Rocha, 1976).

A atividade biológica de giberelina, dos derivados do caureno, foi atribuída à ligação etilênica exocíclica (CH₂) do sistema de anéis deste composto. A substituição deste grupo do anel D por outro resulta em composto não biologicamente ativo. Não são importantes a oxigenação em C-19 ou a hidroxilação em C-13 (Katsumi et al., 1964). O isosteviol não foi efetivo nestes testes, provavelmente por possuir arranjo diferente dos anéis C e D (Ruddat et al., 1963).

A atividade biológica do esteviol e das giberelinas reflete semelhanças nos sítios ativos. Entretanto, é possível que tais compostos sejam metabolicamente relacionados, e portanto o esteviol seria convertido em giberelinas (Katsumi et al., 1964).

Várias têm sido as evidências de que esteviol e giberelinas estariam envolvidas na mesma via biossintética. A síntese de esteviol é impedida pelo inibidor da síntese de giberelinas em fungos e plantas superiores, AMO-1618 (cloreto de 4-hidroxi-5-isopropil-2-metil-fenil-trimetil-amonio-carboxilato de l-piperidina), que impede a ciclização do geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) e a consequente formação do caureno (Dennis et al., 1965; Barnes et al.,

1969). As plantas tratadas com este inibidor eram menos doces do que aquelas não tratadas e não incorporaram acetato-2-C¹⁴ em esteviol (Ruddat, 1966). Resultado semelhante foi conseguido com um outro inibidor da biossíntese de giberelinas, o CCC (cloreto de 2-cloroetil-trimetil-amônio), que impede a transformação do transgeranilgeranil pirofosfato a copalil pirofosfato (Shechter & West, 1969), inibindo a síntese do caureno (Cross & Meyers, 1969). CCC reduziu a 41% o conteúdo de esteviosídeo das folhas, paralelamente à redução do nível de giberelinas, em plantas de Stevia (Rocha, 1975). O resultado obtido por Ruddat et al. (1968), reforça o fato de que em plantas superiores o esteviol é convertido em substância de atividade giberelínica. Este autor tratou mutantes de milho d-5 e d-1 com esteviol e observou aumento de giberelinas endógenas nestas plantas.

Dos estudos resultantes de experiências em que foram aplicados às folhas de Stevia, precursores da síntese de diterpenos, marcados com C¹⁴, (acetato-2-C¹⁴, ácido mevalônico-2-C¹⁴, caureno-17-C¹⁴, ácido caurenônico-7-³H₂), estabeleceu-se que a biossíntese do esteviol nesta planta, se dá a partir de acetato, ácido mevalônico, caureno e ácido caurenônico, o mesmo caminho biossintético das giberelinas (Ruddat et al., 1965a; Bennet et al., 1967; Hanson & White, 1968b). Em laboratório a síntese do esteviol foi conseguida a partir do ácido caurenônico (Cook & Knox, 1976).

Experimentos tem sido conduzidos com linhagens de fungos produtores de giberelinas, no sentido de elucidar os produtos do metabolismo do esteviol. O esteviol-C¹⁴, análogo 13-hidroxilado do ácido caurenônico, é metabolizado pelas culturas da linhagem LM-45399 de Gibberella fujikuroi a um composto de propriedades fisiológicas semelhantes às giberelinas, mas de estrutura diferente não sendo, portanto, ácido giberélico, o principal produto metabólico desta linhagem (Ruddat et al., 1965b). Este composto parece

ser o GA₂₀ (Hanson & White, 1968a), mas não há evidências definitivas que confirmem esta fato (Hedden et al., 1978).

A linhagem Bl-41a de G. fujikuroi possui bloqueio entre caurenol e ácido caurenônico, mas fornecendo-se esteviol, este é metabolizado a um intermediário precursor de GA₁, GA₁₈, GA₁₉, GA₂₀ e 13-hidroxi GA₁₂, que também são encontrados em plantas superiores (Bearder et al., 1975; Bearder et al., 1976; Hedden et al., 1978).

Desta maneira, também em fungos, o esteviol é convertido em substância de atividade giberelínica. Em Stevia, entretanto, não desempenha papel de giberelinas. É o que pode ser deduzido diante da inatividade, e em certos casos, da propriedade inibitória desta substância no alongamento do caule destas plantas (Rocha, 1975). Como a ocorrência do esteviol parece ser restrita a Stevia rebaudiana (Lang, 1970), é mais provável que nesta planta seja um caminho alternativo para a síntese de giberelinas, ou apenas um ramo terminal, a partir do ácido caurenônico, não relacionado com o caminho biossintético subsequente das giberelinas (Hedden et al., 1978).

1.5. OUTROS COMPOSTOS DE Stevia rebaudiana Bert.

Além do esteviosídeo, outros glicosídeos de esteviol têm sido isolados de folhas de Stevia, como traços de esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A (2% do peso seco), rebaudiosídeo B (0,07% do peso seco) menos doce que o anterior, e dulcosídeos A e B, 30 vezes mais doces que a sacarose (Sakamoto et al., 1975; Kohda et al., 1976; Yamasaki et al., 1976; Kobayashi et al., 1977). Estes glicosídeos diferem do esteviosídeo quanto à natureza do açúcar em questão, ou quanto ao tipo de ligação entre o açúcar e o esteviol. Estes glicosídeos

também são promissores do ponto de vista econômico.

Outros compostos têm sido isolados de plantas dos gêneros Stevia e Eupatorium e são interessantes do ponto de vista taxonômico, por exemplo, o isolamento de metilripariocromeno de S. serrata composto que não ocorre em S. paniculata Lag., S. purpurea Peas, S. ovata Lag. e S. rebaudiana Bertoni, mas ocorre em Eupatorium riparium sugere que S. serrata seja colocada no gênero Eupatorium (Kohda et al., 1976; Yamasaki et al., 1976).

1.6. OBJETIVOS DO TRABALHO

Dada a importância econômica do esteviosídeo, neste trabalho tentou-se desenvolver um método para determinação quantitativa deste glicosídeo e verificar que condição fotoperiódica favorece a produção de esteviosídeo pelas folhas e o crescimento de Stevia rebaudiana. Durante o desenvolvimento do projeto, tentou-se ainda verificar os níveis de açúcares solúveis totais e proteínas foliares em dias curtos e longos e como estes parâmetros variam durante a ontogenia das folhas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Utilizaram-se neste trabalho plantas Stevia rebaudiana Bertoni, originárias do Paraguai e crescidas em condições naturais no jardim do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP, ou em Câmaras de crescimento com fotoperíodo controlado.

O esteviosídeo puro, também empregado, foi cedido gentilmente por E. Angelucci do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL).

2.2. MÉTODOS

2.2.a. Condições de Cultivo

i. Germinação

Dos aquênios das plantas crescidas em condições naturais foram selecionados os escuros, que segundo Felipe et al. (1971) apresentam 50% de viabilidade. A seguir, foram colocados para germinar em placas de Petri com papel de filtro, em câmaras com temperatura constante de 25° C e luz contínua, condições estas que favorecem a germinação (Felippe & Lucas, 1971; Felipe et al., 1971).

ii. Condições de Crescimento

As plantas obtidas, dez dias após a sementeira, e contendo somente o par de folhas cotiledonares, foram plantadas em areia e man

tidas em câmaras com temperatura de 29 ± 2 °C, intensidade luminosa de $0,089 \text{ cal/cm}^2/\text{min}$ fornecida por lâmpadas incandescentes e fluorescentes, e reguladas de modo a manter fotoperíodo de 8 horas (Dias Curtos = DC) ou de 16 horas (Dias Longos = DL) em ciclos de 24 horas. Em condições de DL as plantas permanecem vegetativas e em DC são induzidas a florescer (Rocha, 1975; Válio & Rocha, 1977).

Após 60 dias, quando as plantas apresentavam aproximadamente 10 cm (em DL) ou 5 cm (em DC) de altura, foram replantadas em potes plásticos contendo 450 cm^3 de solo e mantidas nas respectivas condições em que se encontravam anteriormente. No período em que permaneceram em areia, as plantas receberam quinzenalmente 20 ml de solução nutriente de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938).

2.2.b. Medidas de Crescimento

As seguintes medidas de crescimento foram feitas para este trabalho:

i. Altura das Plantas

A altura da planta foi tomada do nível do solo ao ápice do eixo principal.

ii. Comprimento das Folhas

Marcou-se o par de folhas imediatamente abaixo do par mais jovem e procedeu-se à medida do comprimento de todas as folhas que se desenvolveram a partir do par marcado.

iii. Tempo de Aparecimento dos Pares Foliares

Para não danificar o ápice as folhas foram consideradas

apenas quando atingiam 2 mm de comprimento.

iv. Peso Fresco Foliar

O peso fresco das folhas foi determinado imediatamente após a colheita, utilizando-se balança analítica Sartorius, em mg até a segunda casa decimal.

v. Área Foliar

Obteve-se a área foliar através de desenho do contorno da folha em papel, posterior recorte, pesagem em balança analítica e leitura contra gráfico de peso(mg) x área(cm²) obtido a partir de pesagens de porções de áreas conhecidas do mesmo papel utilizado para o desenho.

vi. Peso Seco Foliar

Após a determinação do peso fresco e área foliar, as folhas foram postas para secar por 24 horas em estufa a 80 °C, após o que determinou-se o peso seco, em mg, até a segunda casa decimal, utilizando-se balança analítica Sartorius. Folhas secas foram marcadas e guardadas em envelopes de papel, em dessecador, para posterior análise.

2.2.c. Análises de Proteína e Açúcar

Folhas frescas de plantas crescidas em condições de DL, DC ou naturais foram colhidas e após a determinação do peso fresco e área foliar, foram cortadas pela metade longitudinalmente, seguin

do a nervura principal. Uma das metades foi imediatamente extraída em 5 ml de hidróxido de sódio 0,1M, para dosagem de proteína e a outra colocada em estufa a 80 °C para secagem e posterior análise de peso seco, açúcares solúveis totais ou esteviosídeo.

i. Dosagem de Proteína

Utilizou-se, para dosagem de proteína, o método de Lowry, empregando-se reagente de Folin Ciocalteu (Lowry et al., 1951).

Após a completa homogeneização do tecido em hidróxido de sódio 0,1M, o material foi centrifugado e ao sobrenadante adicionou-se igual volume de ácido tricloroacético 15%, em baixa temperatura. Após 20 minutos procedeu-se a nova centrifugação a 3.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e as proteínas precipitadas foram suspensas em volume conhecido de hidróxido de sódio 0,1M.

Simultaneamente preparou-se o padrão de proteína, utilizando-se albumina de soro bovino (BSA, Sigma Chemical Co., 96-99% de albumina) em concentrações de 0 a 200 µg de proteína.

Às amostras e ao padrão de BSA, ambos em igual volume, adicionaram-se 5 ml de solução alcalina de cobre e tartarato de potássio e sódio (3g de carbonato de sódio em 95,5 ml de hidróxido de sódio 0,1M; 2 ml de solução de tartarato de potássio e sódio 10% em hidróxido de sódio 0,1M; 1 ml de solução de sulfato de cobre 10%). Deixou-se repousar por 15 minutos, após o que adicionaram-se 0,5 ml de reagente de Folin 50% (reativo de Folin Ciocalteu, Queel Indústrias Químicas S.A.). Aguardaram-se 30 minutos para estabilização da cor. Uma vez processada a reação procedeu-se à leitura das densidades ópticas das amostras em espectrofotômetro Tec nolab (modelo UV-16B) a 620 nm.

ii. Dosagem de Açúcar

Tecidos secos de folhas inteiras ou de metades foram extraídos para açúcares solúveis totais, segundo o método de Bielecki & Turner(1966).

Procedeu-se à homogeneização do tecido em 10 ml da mistura metanol:clorofórmio:água(12:5:3), após o que adicionaram-se 2 ml de clorofórmio e 3,5 ml de água, o que provoca a formação de uma fase aquosa e outra orgânica. No caso dos experimentos, em que se visava também a análise do esteviosídeo, o volume desta solução foi reduzido, mas mantendo-se as mesmas proporções. O volume final foi agitado e centrifugado durante 5 minutos a 5.000 rpm para completar a separação das fases. Da fase superior, aquosa, que contem os açúcares solúveis totais, foram retiradas amostras, que foram diluídas em água, nas proporções de 1:5 e 1:10. Nas análises de esteviosídeo, 200 μ l, desta mesma fase, foram aplicados em cromatoplacas de silicagel.

Para determinação quantitativa dos açúcares solúveis totais e esteviosídeo, utilizou-se o método da antrona(Yemm & Willis, 1954).

Soluções padrão de dextrose(Dextrose anidro-pó, "Baker Analyzed" Reagente, J.T. Baker Produtos Químicos Ltda.) ou esteviosídeo puro, de concentrações variando de 0 a 200 μ g/ml, foram obtidas por diluição das respectivas soluções estoque em água bi-destilada.

O volume da amostra a ser dosado, 0,5 ml foi adicionado a 1 ml de solução de antrona(Sigma Chem. Co.) 0,2% em ácido sulfúrico 98%(Umbreit & Burris, 1964). O volume final foi imediatamente agitado e aquecido em banho maria a 100 °C por 3 minutos. A leitura das densidades ópticas das amostras realizou-se em espectrofo-

tômetro TecnoLab (modelo UV-16B) a 620 nm.

2.2.d. Cromatografia Sobre Camada Delgada

i. Preparação das Cromatoplasmas

Sobre placas de vidro de dimensões de 20x20 cm ou 10x20 cm espalhou-se, de maneira usual, uma camada de 0,5 mm de suspensão de silicagel G (Typ 60, Merck) na proporção de 1:2 (g de sílica: ml de solução aquosa de ácido bórico 0,2%). A seguir, as placas foram expostas ao ar para secagem.

ii. Aplicação das Amostras

Alíquotas de solução aquosa de esteviosídeo puro ou de extratos de folhas (50 a 200 μ l) foram aplicadas com micro-seringa sobre as cromatoplasmas. As aplicações foram feitas 2,5 cm acima do bordo inferior da placa e não ultrapassaram 0,5 cm de diâmetro.

Tentou-se diminuir o volume de aplicação das amostras, utilizando-se o solvente 1,4 dioxano, em que o esteviosídeo é livremente solúvel, mas houve interferência deste solvente nos resultados colorimétricos dos padrões.

iii. Desenvolvimento e Revelação das Cromatoplasmas

Após a aplicação, as cromatoplasmas foram colocadas em cubas de vidro (22 x 22 x 10 cm) fechadas e contendo os sistemas de solventes, para o desenvolvimento ascendente por percurso de 16 cm, a partir do ponto de aplicação. O desenvolvimento realizou-se em temperatura ambiente de 25 °C.

Concluído o desenvolvimento, as placas foram expostas ao ar, para secagem, pulverizadas com solução de antrona 0,2% em ácido sulfúrico 98% (Umbreit & Burris, 1964) ou de naftalindiol-(1,3) (20 mg de naftalindiol, 10 ml de etanol e 0,2 ml de ácido sulfúrico 98%) (Lato et al., 1968a,b), e aquecidas por 5 a 10 min a 100-110 °C.

2.2.e. Análises dos Resultados

Os experimentos foram planejados de modo a fornecerem repetições suficientes para aplicação da estatística.

Uma modificação do teste t, para amostras pares, sugerido por Youden & Beale (1934, in Snedecor & Cochran, 1967), que analisaram metades de mesmas folhas de fumo infectadas ou não por vírus, foi aplicada aos experimentos de determinação de açúcares solúveis totais em metades frescas e secas de folhas.

A análise de variância foi utilizada nos experimentos de recuperação de esteviosídeo cromatografado em função do tempo de eluição, tempo de aparecimento de pares foliares em DL e DC, níveis de açúcares solúveis totais e esteviosídeo em DL e DC.

A análise de regressão linear foi utilizada para estudo das relações entre conteúdo de proteína, açúcares solúveis totais, esteviosídeo, peso seco, peso fresco e área foliar.

No decorrer do trabalho adotou-se a seguinte simbologia para exprimir os níveis de significância dos valores obtidos:

*** $p < 0,001$

** $p < 0,01$

* $p < 0,05$

N.S. = Não Significativo

3. RESULTADOS

3.1. SEPARAÇÃO E DOSAGEM DE ESTEVIOSÍDEO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE Stevia rebaudiana Bert.

Os experimentos, descritos nesta seção, objetivaram desenvolver um sistema para determinação quantitativa, em μg , de esteviosídeo.

A quantificação precisa do nível endógeno de esteviosídeo de extratos de folhas requer:

- a) extração dos açúcares solúveis totais.
- b) separação e identificação do esteviosídeo dos demais açúcares presentes nos extratos.
- c) dosagem do esteviosídeo isolado.

3.1.a. Extração de Açúcares Solúveis Totais

A extração de açúcares solúveis totais das folhas foi realizada segundo o método descrito no item 2.2.c.ii de Material e Métodos. Os extratos então obtidos foram utilizados na dosagem de açúcares solúveis totais e isolamento de esteviosídeo.

3.1.b. Separação do Esteviosídeo

O emprego de cromatografia sobre camada delgada, neste trabalho, foi adotado por várias razões. Primeiramente pela rapidez em relação a outras técnicas cromatográficas e à existência de trabalhos recentes, bem sucedidos, sobre a separação de misturas complexas de carboidratos através de cromatografia sobre camada

delgada. Em segundo lugar pela existência de um método envolvendo cromatografia unidimensional sobre camada delgada para a separação de esteviosídeo.

i. Cromatografia Unidimensional

Cromatoplaças de 20 x 10 cm, contendo aplicações (80 µl) de solução aquosa de esteviosídeo puro ou de extratos de folhas, foram desenvolvidas de modo ascendente em vários sistemas de solventes (Tabela 1).

Pode ser visto pela Figura 2A que, dependendo do sistema, a mobilidade do esteviosídeo puro variou, assim como a concentração das manchas. Os sistemas de solventes que mostraram melhores resultados foram os 5, 7 e 9, seguidos por 1, 2, 8, 10 e 12. Os demais resultaram em manchas difusas. Enquanto em alguns destes sistemas as manchas obtidas para esteviosídeo puro foram concentradas, todos os desenvolvimentos de extratos (Figura 2B) resultaram em separação incompleta ou manchas difusas, devido à interferência entre os açúcares e à presença de caudas difusas. Sistemas contendo metanol produziram manchas difusas (sistemas 6, 10, 11, 14), enquanto que sistemas contendo piridina (sistema 2), metanol e clorofórmio ou acetona (sistemas 8, 4) não separaram completamente os vários açúcares presentes nas folhas. Entretanto, sistemas contendo isopropanol, particularmente com ácido acético, aumentaram a eficiência da separação, produzindo manchas concentradas, de mobilidade variável.

ii. Cromatografia Bidimensional

Diante da baixa eficiência do desenvolvimento unidimensional na separação do esteviosídeo de extratos, procedeu-se ao desen

Tabela 1

Valores de R_f de esteviosídeo em vários desenvolvimentos unidimensionais nos sistemas de solventes 1 - 15.

Sistemas de Solventes	R_f (x100)
1. Isopropanol:ácido acético: água (4:1:5)	86
2. n-butanol:piridina:água (6:3:3)	84
3. acetato de etila:ácido acético: água (6:3:2)	78
4. n-butanol:acetona:água (4:5:1)	76
5. n-butanol:ácido fórmico:água (6:3:3)	74
6. n-propanol:metanol:água (8:1:1)	72
7. n-butanol:acetato de etila: isopropanol:água (35:100:60:30)	68
8. clorofórmio:metanol:água (15:10:2)	56
9. n-butanol:acetato de etila:água (4:1:5)	56
10. n-butanol:metanol:água (8:1:1)	52
11. clorofórmio:metanol (6:4)	50
12. n-butanol:acetato de etila:isopropanol:água (200:100:70:35)	48
13. n-butanol:acetato de etila:isopropanol:ácido acético:água (7:20:12:7:6)	36
14. metanol:clorofórmio:amonia(28 Be) (6:4:0,7)	26
15. n-butanol:benzeno:ácido fórmico:água (100:19:10:25)	19

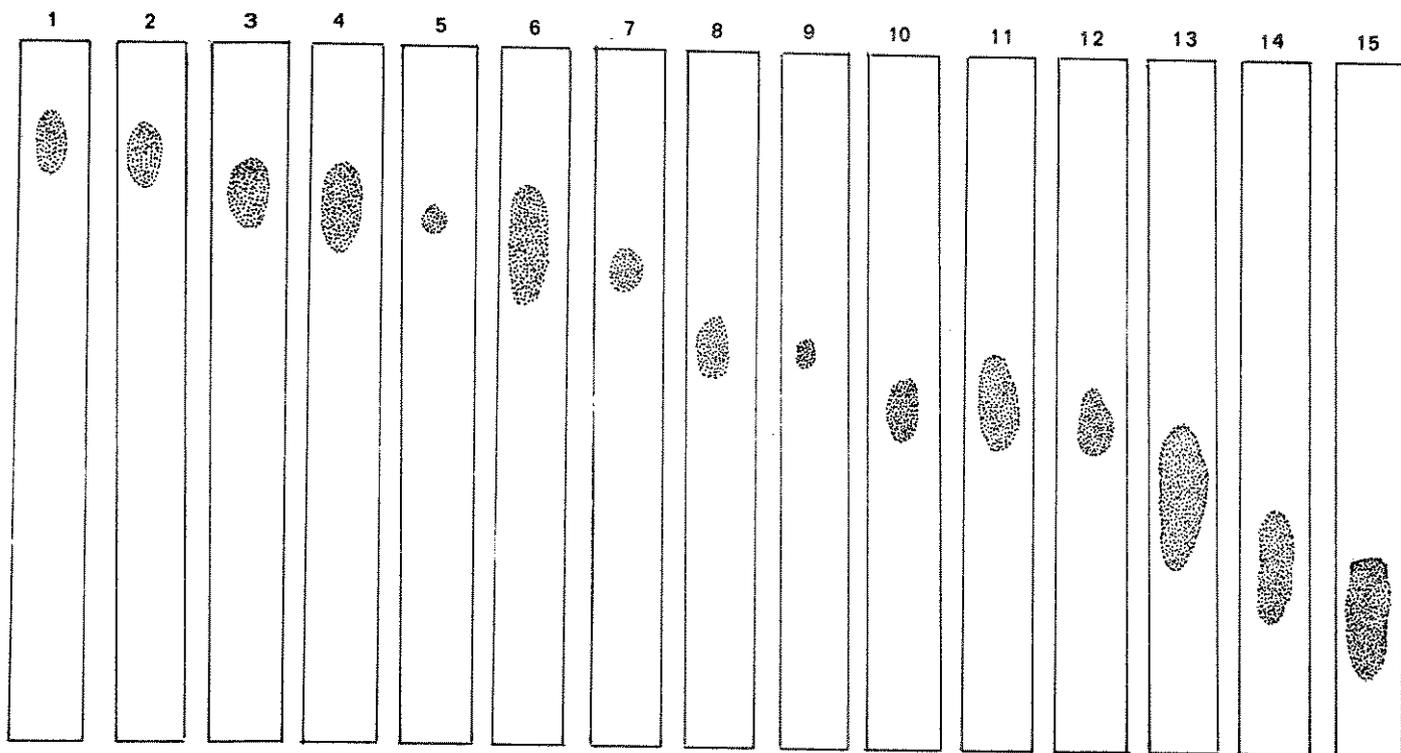
Figura 2. A.

Resultado do desenvolvimento unidimensional de este viosídeo puro nos sistemas de solventes dados na Tabela 1. O número sobre cada prancha representa o sistema de solvente correspondente da Tabela 1. Os R_f obtidos foram ordenados de modo decrescente, da esquerda para a direita.

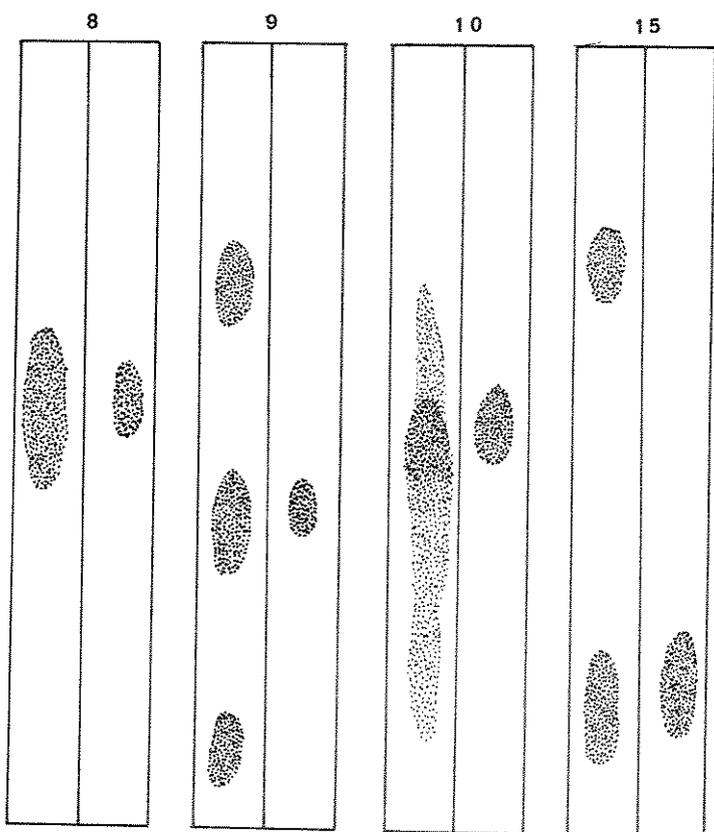
Figura 2. B.

Resultado do desenvolvimento unidimensional de extra^{tos} de folhas de S. rebaudiana (esquerda) e de este viosídeo puro (direita), nos sistemas de solventes 8, 9, 10 e 15 da Tabela 1.

A



B



volvimento ascendente bidimensional, que representa uma técnica cromatográfica mais complexa e precisa envolvendo a mobilidade em dois sistemas de solventes.

Os sistemas de solventes mais eficientes nos testes anteriores (item 3.1.b.i) foram testados em várias combinações. Entre os desenvolvimentos na primeira e segunda dimensão as cromatoplasmas foram expostas ao ar para completa secagem.

Para cada par de sistemas de solventes foram desenvolvidas, dentro de uma mesma cuba, duas cromatoplasmas, uma contendo única aplicação de esteviosídeo puro e outra uma alíquota de extrato. A p^os o desenvolvimento na segunda dimensão procedeu-se à revelação das placas com naftalindiol-(1,3). Detectou-se mancha de cor azul escuro característico para esteviosídeo, e manchas de várias cores, para outros açúcares não analisados, como verde, rosa, alaranjado e mesmo outros tons de azul. Estas manchas correspondem, possivelmente, à eritrose (verde), ramnose e sacarose (rosa), rafinose (alaranjado) e ribose, xilose, arabinose, trealose e lactose (azul esverdeado, azul violáceo, azul acinzentado). A adição de ácido bórico na preparação das cromatoplasmas foi vantajosa, concentrando os açúcares em manchas mais nítidas.

Na Tabela 2 estão mencionados os melhores sistemas de solventes encontrados e os respectivos valores de R_f para ambas as dimensões. Como a cromatoplasma foi revelada somente ap^os o desenvolvimento na segunda dimensão, o valor do R_f na primeira foi, necessariamente, uma extrapolação pois assumiu-se que o desenvolvimento da mancha na segunda dimensão foi perpendicular ao da primeira, e que portanto, a distância percorrida pela mancha em relação ao ponto de aplicação, no primeiro desenvolvimento, foi a mesma em que se encontrou ap^os o segundo. Isto talvez explique as pequenas variações de R_f entre esteviosídeo puro e de extratos desenvolvidos na primeira dimensão, comparadas com os R_f na segunda

Tabela 2

Valores de R_f de esteviosídeo puro e de extratos de folhas em vários desenvolvimentos bidimensionais nos sistemas de solventes A-F. O sistema F foi o mais eficiente.

i. desenvolvimento na primeira direção

ii. desenvolvimento na segunda direção

Sistemas de Solventes	R_f (x100)	
	esteviosídeo puro	esteviosídeo de extrato
A. i. n-butanol:ácido fórmico:água (6:3:3)	68	71
ii. n-butanol:ácido acético:água (4:1:5)	43	41
B. i. n-butanol:metanol:água (8:1:1)	51	50
ii. n-butanol:ácido acético:água (4:1:5)	63	55
C. i. acetato de etila:ácido acético:água (8:3:2)	36	25
ii. n-butanol:acetato de etila:isopropanol: água. (35:100:60:30)	48	50
D. i. n-butanol:acetato de etila:isopropanol: ácido fórmico:água. (35:100:60:25:5)	48	32
ii. acetato de etila:ácido acético:água (8:5:2)	65	65
E. i. n-butanol:acetato de etila:isopropanol: água. (35:100:60:30)	52	48
ii. acetato de etila:ácido acético:água (8:3:2)	36	35
F. i. n-butanol:acetato de etila:isopropanol: água: (35:100:60:30)	55	56
ii. acetato de etila:ácido acético:água (8:4:1)	11	12

dimensão, onde o centro da mancha podia ser visto claramente.

Sistemas que deram alta mobilidade ao esteviosídeo, na primeira dimensão, mas baixa na segunda, foram em geral superiores. Isto porque as manchas se tornam mais difusas quando percorrem longas distâncias, principalmente durante o desenvolvimento na segunda dimensão, quando os componentes isolados na primeira, já ocupam uma área maior do que a ocupada inicialmente pela amostra aplicada na origem.

O desenvolvimento bidimensional do esteviosídeo puro resultou em uma única mancha, para cada combinação de sistemas de solventes testada. A concentração da mancha variou de acordo com os sistemas de solventes utilizados (Figura 3 A-F). Com relação às cromatoplasmas contendo extratos, os sistemas que resultaram na mais eficiente separação dos açúcares foram aqueles contendo misturas de isopropanol, acetato de etila, n-butanol e água, na presença de ácido fórmico ou acético, que concentram as manchas em áreas nítidas. Ácido acético apenas no segundo solvente produziu separação mais clara. Este ácido, no primeiro desenvolvimento, dificilmente pode ser removido pela secagem da placa por exposição ao ar, permanecendo adsorvido na sílica ocupando os sítios do gel e interferindo no desenvolvimento na segunda dimensão.

Os sistemas finalmente selecionados para o isolamento do esteviosídeo das folhas foram, para a primeira dimensão, n-butanol: acetato de etila:isopropanol:água(35:100:60:30) e acetato de etila:ácido acético:água(8:4:1), para a segunda. A baixa mobilidade do esteviosídeo, no segundo desenvolvimento, resultou em mancha concentrada, claramente isolada dos demais açúcares.

O processo de desenvolvimento das placas em duas dimensões, incluindo exposição ao ar, para secagem, completou-se em 4 horas e meia, o que representa tempo consideravelmente menor em relação ao consumido para o desenvolvimento de cromatogramas de papel.

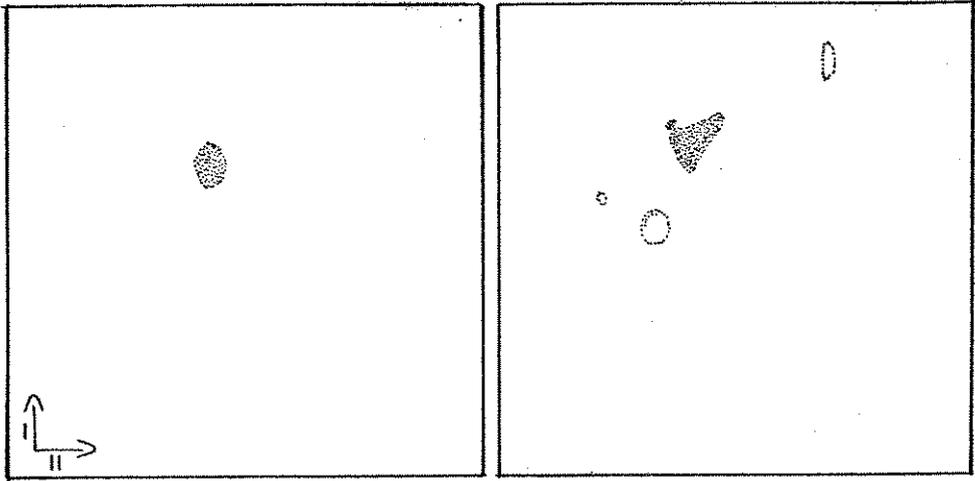
Figura 3:

Resultado do desenvolvimento bidimensional de este-
viosídeo puro (esquerda) e de extratos de folhas de
S. rebaudiana (direita) nos sistemas de solventes (A-
F) dados na Tabela 2. As manchas correspondentes ao
esteviosídeo são as sombreadas.

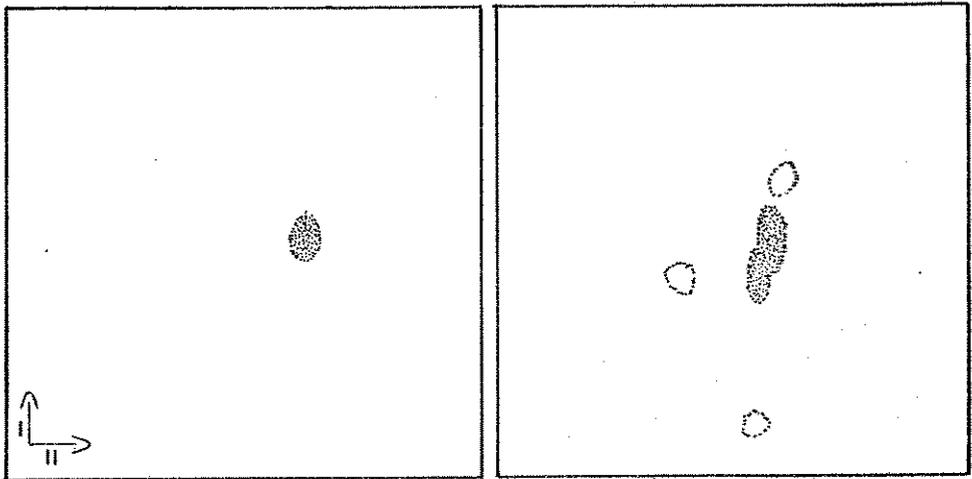
I = desenvolvimento na primeira direção.

II = desenvolvimento na segunda direção.

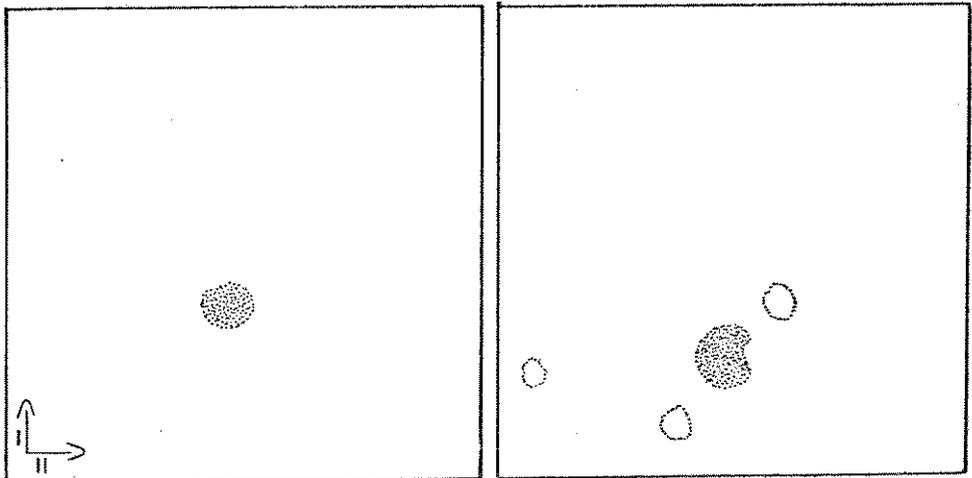
A



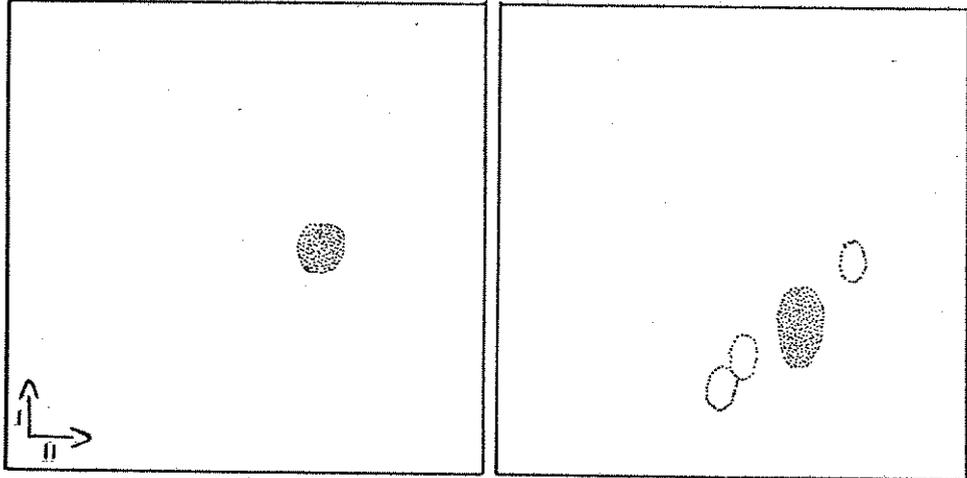
B



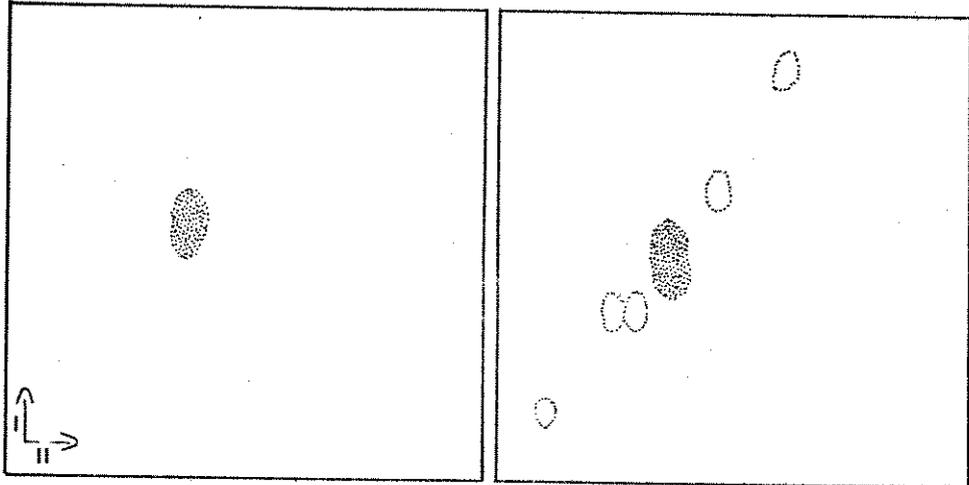
C



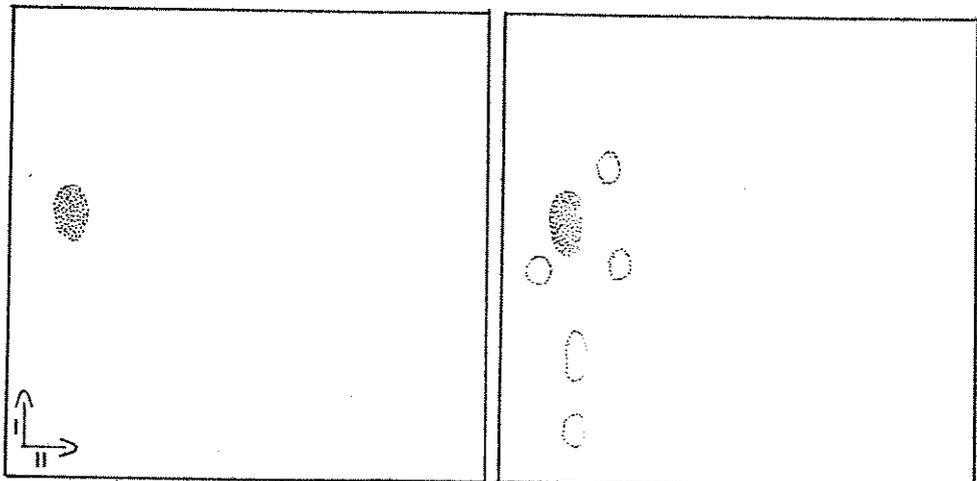
D



E



F



3.1.c. Dosagem de Esteviosídeo

Uma vez desenvolvido um sistema para separação do esteviosídeo, procedeu-se à eluição, para determinação quantitativa.

Testes foram realizados no sentido de verificar os efeitos do tempo de ativação da cromatoplaça e tempo de eluição, na eficiência de recuperação do esteviosídeo pela eluição.

i. Tempo de Ativação das Cromatoplaças

A ativação de cromatoplaças, aquecimento por determinado tempo, é processo usual em cromatografia sobre camada delgada, pois proporciona melhor separação de compostos por tornar a adsorção mais eficiente. Entretanto, no momento da eluição, para determinação quantitativa, a melhor adsorção resulta em recuperação diminuída, pois traços do composto não são facilmente removíveis do gel.

Em experimentos em que placas foram ativadas a 100 °C por 5, 10 ou 20 minutos, anteriormente à aplicação de 200 µg de esteviosídeo, observou-se, após eluição e determinação colorimétrica, que as densidades ópticas das amostras foram inversamente proporcionais ao tempo de ativação. Assim, houve melhor recuperação em placas não ativadas, sendo a ativação por 20 minutos a menos eficiente.

ii. Tempo de Eluição

Experimentos foram conduzidos com o objetivo de se verificar se o período de eluição de 4 horas utilizado por outros pesquisadores poderia ser diminuído, sem prejudicar a recuperação do esteviosídeo cromatografado.

Cromatoplasmas não ativadas receberam 8 aplicações cada, de 200 µg de esteviosídeo puro. Foram desenvolvidas em uma dimensão, no sistema 10 (Tabela 1, Figura 2A). Após a revelação a silicagel contendo a mancha de esteviosídeo foi retirada da placa e eluída em água por 240, 120 ou 30 minutos.

Pela análise dos resultados (Tabela 3A) concluiu-se que após os vários tempos de eluição não houve diferença significativa na recuperação do esteviosídeo. Experimentos utilizando-se tempos de eluição de 30, 60 e 120 minutos (Tabela 3B,C) confirmaram que períodos de eluição superiores a 30 minutos não aumentaram a eficiência de recuperação. Portanto, o tempo de eluição de 30 minutos foi adotado.

iii. Eluição do Esteviosídeo

A quantificação precisa do esteviosídeo de extratos de folhas exigiu o conhecimento da porcentagem de recuperação desta substância após cromatografia sobre camada delgada.

Em experimentos em que esteviosídeo foi eluído, a revelação da placa foi realizada através de pulverização com solução de antrona 0,2% em ácido sulfúrico 98% e aquecimento a 100 °C, por 10-20 minutos. Nestas condições detectou-se claramente mancha de cor azul para o esteviosídeo e uma área de 2 x 2 cm de gel, contendo o esteviosídeo, pôde ser retirada da placa, sem que houvessem perdas. A vantagem deste método de revelação é que a mancha detectada pode ser eluída e dosada imediatamente após revelada, pois o revelador não interfere com a reação colorimétrica. O método de revelação em que se utiliza vapor de cristais de iodo, embora seja adequado para revelar esteviosídeo, é demorado e além disto, traços de iodo na sílica podem interferir com a reação colorimétrica.

Tabela 3

Valores de densidades Ópticas (620 nm) de eluatos de três experimentos (A,B,C) em que diferentes tempos de eluição (30,60,120 e 240 minutos) foram testados.

Amostras		Tempo de Eluição (min)			
		30	60	120	240
A	1	0,57	-	0,75	0,54
	2	0,63	-	0,77	0,50
	3	0,61	-	0,64	0,63
	4	0,57	-	0,82	0,70
	5	0,77	-	0,84	0,66
	6	0,64	-	0,84	0,67
	7	0,79	-	0,91	0,80
	8	0,80	-	0,59	0,86
$\bar{x} =$		0,67		0,77	0,67
F =		2,18 (N.S.)			
B	1	0,90	0,73	0,83	-
	2	0,86	0,87	0,71	-
	3	0,79	0,88	0,86	-
	4	0,89	0,84	0,81	-
	5	0,80	0,83	0,85	-
	6	0,87	0,87	0,84	-
	7	0,91	0,76	0,91	-
	8	0,85	0,86	0,67	-
$\bar{x} =$		0,85	0,83	0,81	
F =		1,26 (N.S.)			
C	1	0,59	0,68	0,68	-
	2	0,57	0,60	0,67	-
	3	0,73	0,70	0,71	-
	4	0,80	0,52	0,68	-
	5	0,60	0,69	0,69	-
	6	0,66	0,68	0,60	-
	7	0,69	0,62	0,68	-
	8	0,64	0,63	0,66	-
$\bar{x} =$		0,66	0,64	0,67	
F =		0,56 (N.S.)			

No sentido de testar a eficiência de recuperação foram realizados experimentos em que alíquotas de esteviosídeo foram aplicadas em cromatoplacas, em quantidade variando de 0 a 200 μg . Após o desenvolvimento e eluição, a recuperação foi determinada contra padrão de esteviosídeo não cromatografado.

Eluíram-se 200 mm^3 de silicagel em 3 ml de água, da mesma maneira que os padrões de esteviosídeo não cromatografados, o que forneceu 4 replicatas de 0,5 ml para a reação colorimétrica, por mancha eluída.

Os resultados de dois destes experimentos estão ilustrados na Figura 4A,B. Em geral, para cada quantidade aplicada de esteviosídeo, a densidade óptica do eluato foi próxima daquela do padrão correspondente, sugerindo que as perdas, entre 0 a 180 μg de esteviosídeo aplicado, são pequenas. Dados de vários experimentos estabeleceram que as porcentagens de perdas foram menores que 12% e diminuíram com o aumento da concentração aplicada. Tais resultados podem ser vistos na Figura 5A e Tabela 4, onde os valores representam as médias dos dados de regressão linear obtidos para os vários experimentos.

O fato da porcentagem perdida diminuir linearmente como o aumento da quantidade de esteviosídeo aplicada sugere que a perda foi constante. Isto é confirmado pela Figura 5B, em que estão relacionadas a quantidade de esteviosídeo aplicada e a quantidade recuperada. Para qualquer quantidade aplicada a recuperada foi sempre menor, e por uma diferença de aproximadamente 7,0 μg . Desse modo, quando altas concentrações são aplicadas, as perdas se tornam proporcionalmente menores e acima de 120 μg , 95% ou mais de recuperação é assegurada. A perda constante de 7,0 μg sugere que este material permaneceu adsorvido no gel eluído. Como 200 mm^3 foram eluídos, aproximadamente 0,035 μg de esteviosídeo foram adsorvidos por mm^3 de silicagel.

Figura 4 A,B.:

Curvas padrão para esteviosídeo puro (●) e esteviosídeo puro cromatografado e eluído (○) em dois experimentos (A e B) utilizando-se o método de antrona. Cada valor representa a média de duas amostras de 4 replicatas cada.

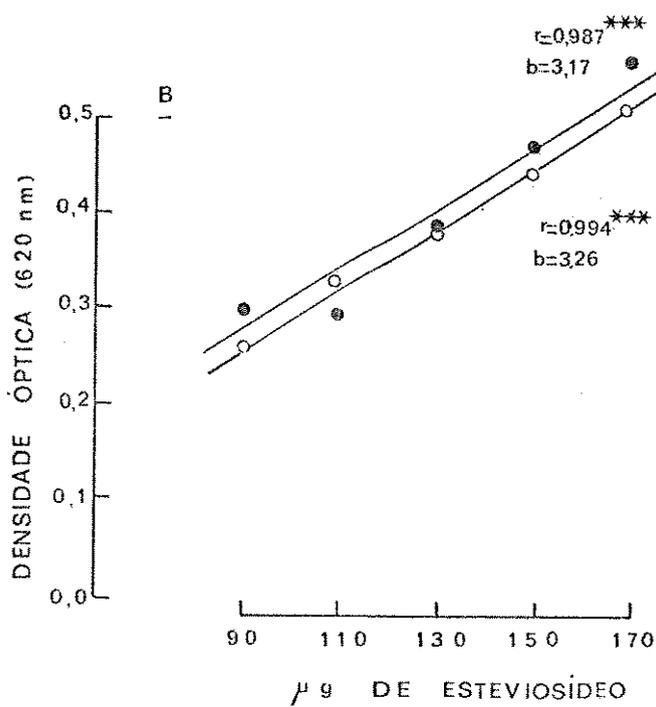
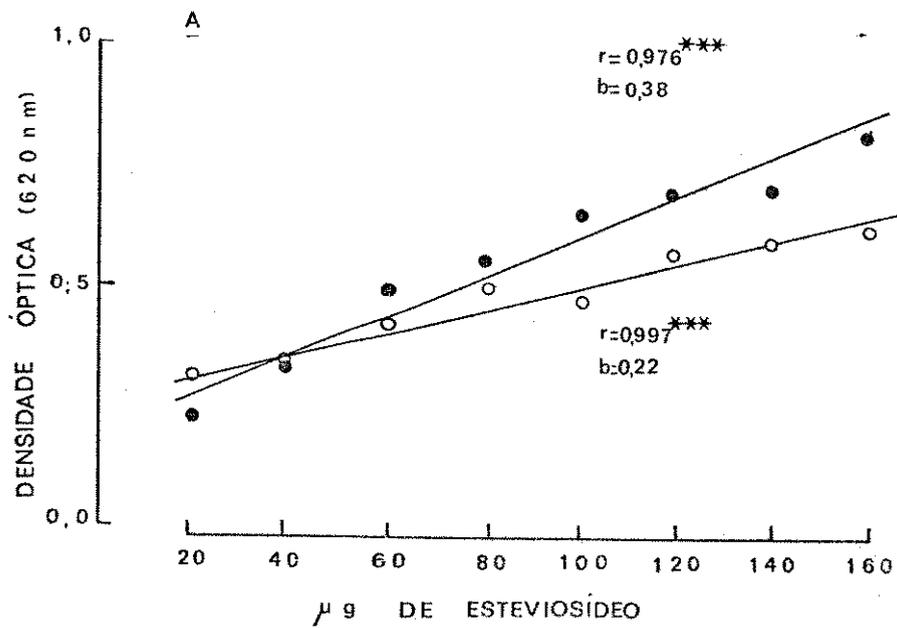


Figura 5. A.

Percentual de recuperação de esteviosídeo puro cromatografado em função da concentração originalmente aplicado, em dois experimentos independentes (● e o).

Figura 5. B.

Quantidade (μg) de esteviosídeo puro recuperado após cromatografia e eluição em função da concentração originalmente aplicada, em dois experimentos independentes (● e o).

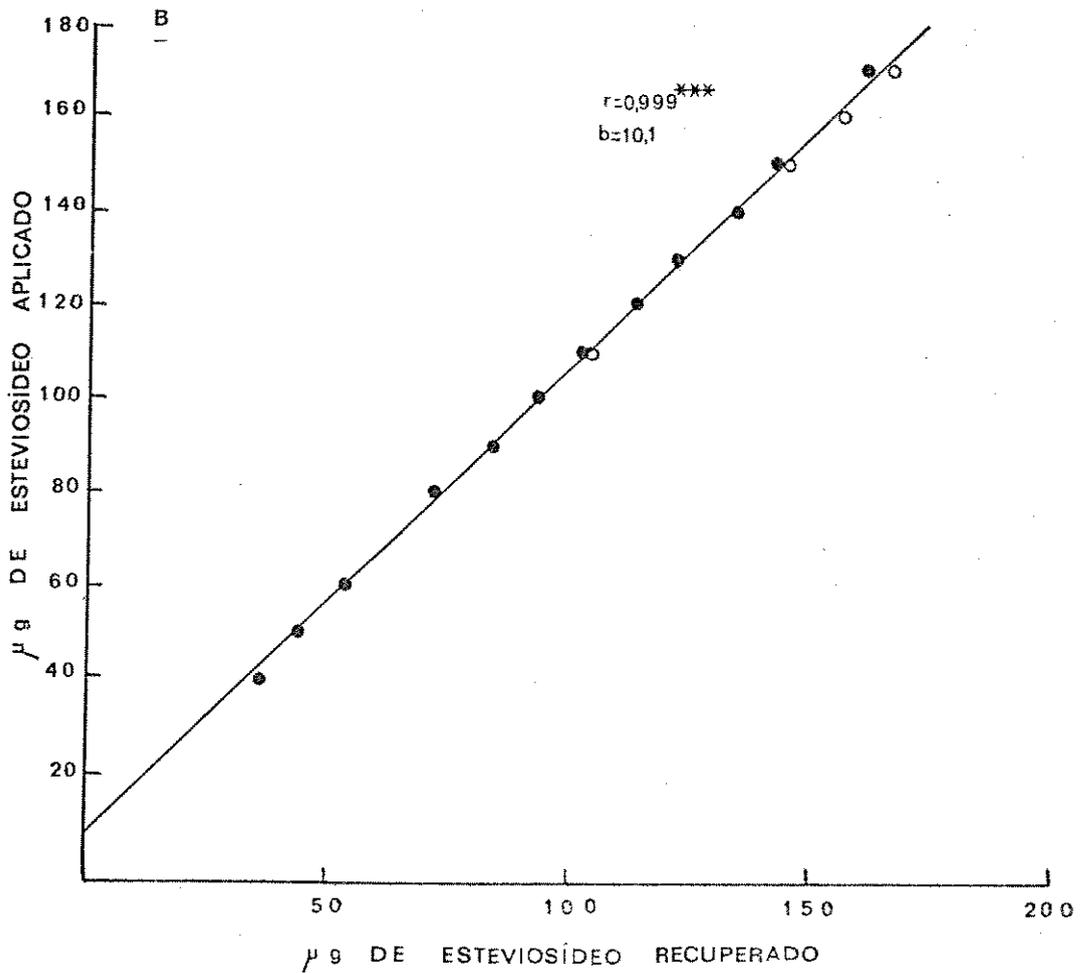
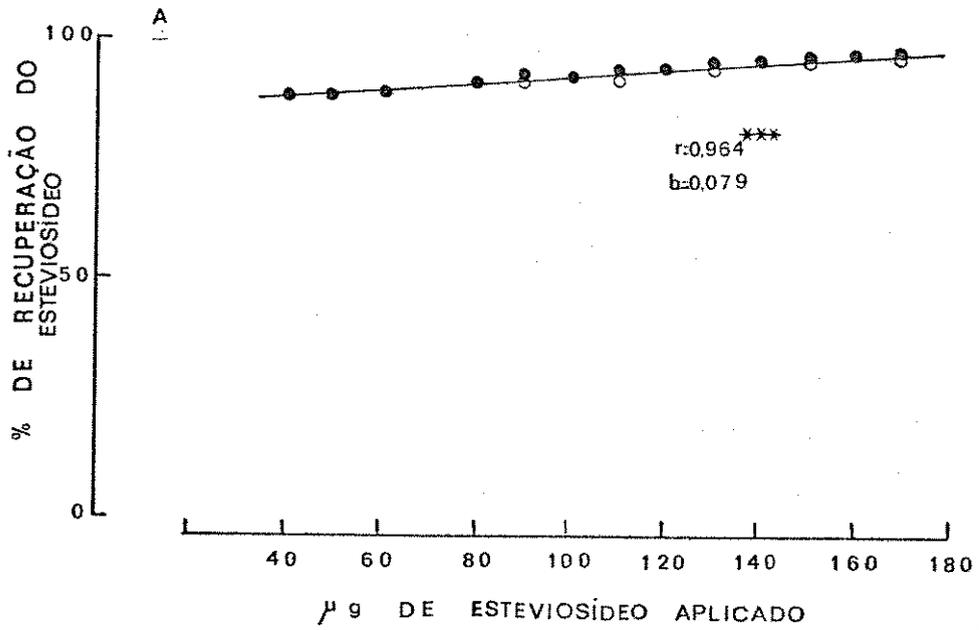


Tabela 4

Porcentagem de esteviosídeo puro recuperado após eluição de várias quantidades de esteviosídeo aplicado (40 a 180 μg). Estes valores foram calculados a partir da análise de regressão linear da Figura 5.A.

quantidade de esteviosídeo aplicada (μg)	% de esteviosídeo recuperada
40	88,4
50	89,1
60	89,9
70	90,7
80	91,5
90	92,3
100	93,1
110	93,9
120	94,6
130	95,4
140	96,2
150	97,0
160	97,8
170	98,6
180	99,3

Estes resultados estabelecem que esteviosídeo pode ser extraído de folhas, isolado por cromatografia sobre camada delgada, em período menor que 5 horas, e eluído da placa com perdas insignificantes.

3.1.d. Eficiência de Glicose Como Padrão

Em todos os trabalhos descritos sobre a determinação quantitativa do esteviosídeo, esta substância tem sido usada como padrão. Porém, o esteviosídeo, não disponível comercialmente, poderia ser, teoricamente, substituído pela glicose em ensaios, quando amostras puras não fossem disponíveis.

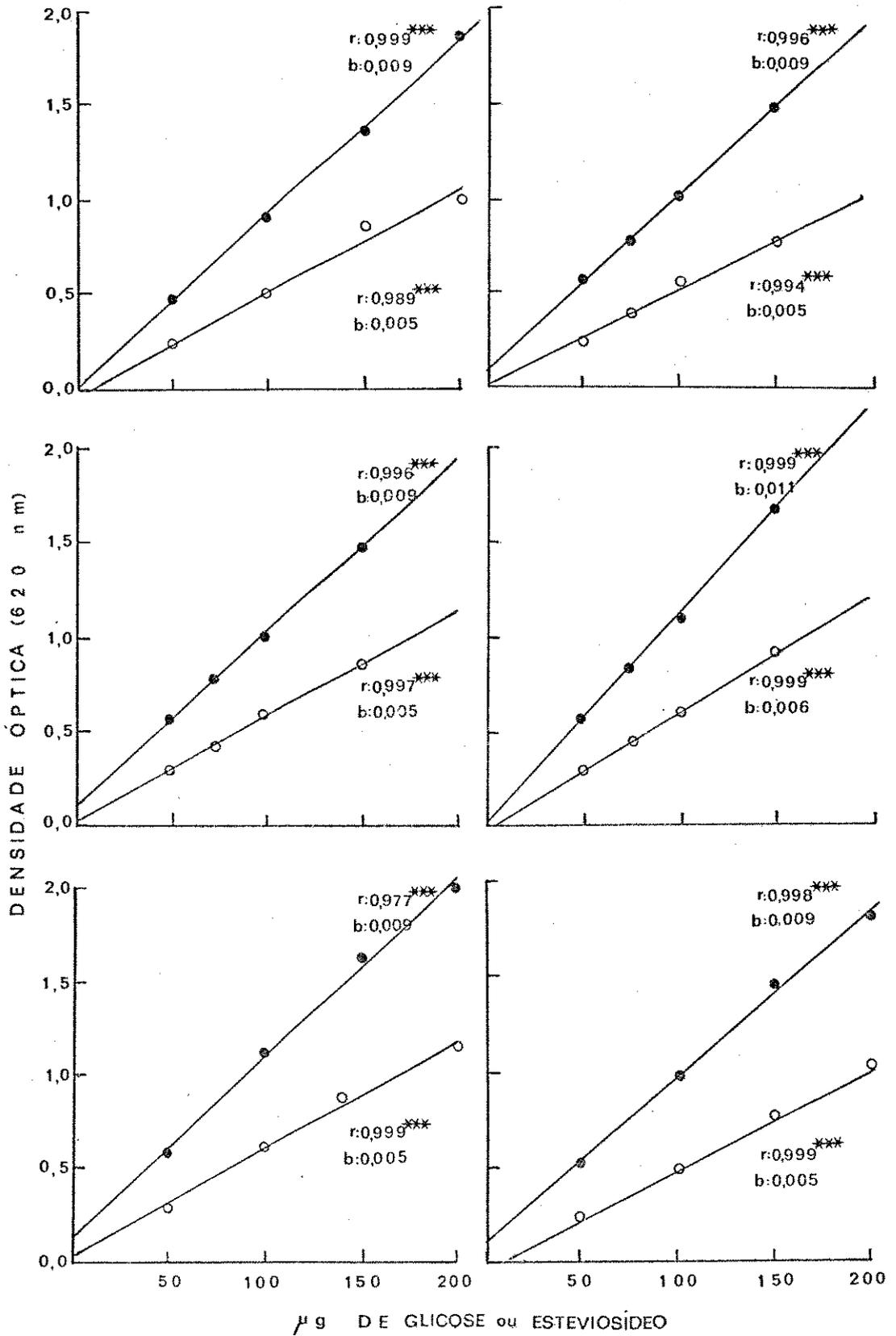
A hidrólise ácida ou enzimática do esteviosídeo (P.M. 804,9) produz uma molécula de diterpeno tetracíclico, o esteviol (P.M. 316,44), que não participa da reação com antrona, e três moléculas de glicose (P.M. 488,46). Assim, em 1 g de esteviosídeo puro apenas $488,46/804,9$ de açúcar contribui para a reação colorimétrica. A densidade óptica da glicose pura comparada com a de igual quantidade de esteviosídeo deve ser maior e refletir a razão esteviosídeo/glicose, de 0,61 (Figura 1). Esta razão foi confirmada e estabeleceu-se que quantidades desconhecidas de esteviosídeo de folhas podem ser determinadas utilizando-se glicose como padrão.

A Figura 6 mostra os resultados de 6 experimentos em que as densidades ópticas para soluções de concentrações de 0 a 200 μg de glicose e esteviosídeo puros foram analisadas. Pode ser visto que para cada caso a densidade óptica foi linear e para o esteviosídeo, em cada concentração, foi sempre menor que a da glicose, pelas razões citadas acima.

A razão entre densidade óptica de esteviosídeo e glicose foi calculada do seguinte modo: utilizando-se a equação da reta,

Figura 6:

Comparação entre as densidades ópticas de várias concentrações de glicose (●) e esteviosídeo puro (○) em seis experimentos. Cada valor representa a média de 4 replicatas.



a densidade óptica do esteviosídeo, em 10 experimentos, foi estabelecida para densidades ópticas da glicose de 1,0 e 1,5 (Tabela 5).

Para quantidade de esteviosídeo ao redor de 150 μg (densidade óptica de 0,88) pode ser visto que a razão calculada entre as densidades ópticas de esteviosídeo e glicose, de 0,59, aproximou-se daquela teórica calculada a partir dos pesos moleculares. Assim, glicose pode ser utilizada como padrão para quantificação precisa do esteviosídeo. Isto confirmou-se em teste em que as concentrações desconhecidas de oito soluções de esteviosídeo foram determinadas com auxílio de padrão de glicose. Os resultados indicaram que a diferença entre a concentração estimada e a real, para concentrações acima de 75 μg , esteve ao redor de 10% ou menos.

Estes dados permitem inferir que pesquisa sobre determinação quantitativa de esteviosídeo não seja prejudicada pela ausência de padrões desta substância.

Tabela 5

Valores de densidades Ópticas (D.O.) (620 nm) para esteviosídeo puro (colunas 2 e 5), em dez experimentos, quando a D.O. da glicose foi arbitrariamente fixada para 1,0 e 1,5. As razões entre D.O. esteviosídeo e D.O. glicose para estes dois valores são dadas nas colunas 3 e 6. Estes dados foram calculados a partir da análise de regressão linear para glicose e esteviosídeo (Figura 6).

Experimentos	1	2	3	4	5	6
	D.O. glicose	D.O. estev.	razão 2/1	D.O. glicose	D.O. estev.	razão 5/4
1	1,0	0,54	0,54	1,5	0,83	0,55
2	1,0	0,52	0,52	1,5	0,83	0,55
3	1,0	0,56	0,56	1,5	0,85	0,57
4	1,0	0,58	0,58	1,5	0,88	0,59
5	1,0	0,56	0,56	1,5	0,99	0,66
6	1,0	0,57	0,57	1,5	0,98	0,65
7	1,0	0,57	0,55	1,5	0,96	0,64
8	1,0	0,52	0,52	1,5	0,79	0,53
9	1,0	0,54	0,54	1,5	0,88	0,59
10	1,0	0,55	0,55	1,5	0,88	0,59
\bar{x}	1,0	0,55	0,55	1,5	0,88	0,59

3.2. ESTUDOS SOBRE O EFEITO DE FOTOPERÍODOS NO CRESCIMENTO DE Stevia rebaudiana Bert..

Os experimentos descritos nesta seção objetivaram a verificação do padrão de crescimento de plantas de Stevia rebaudiana mantidas em condições de DC(8 horas de luz diária) e DL(16 horas de luz diária).

3.2.a. Aspecto Geral das Plantas

Stevia rebaudiana é planta de DC, sendo o fotoperíodo crítico de 13-14 horas. Assim, plantas mantidas em DL permaneceram em estado vegetativo(Figura 7B) sendo caracterizadas por internós compridos e folhas alongadas. Plantas mantidas em DC tiveram internós mais curtos e folhas menores, possuindo aspecto de planta em roseta antes da ocorrência do escapo floral e produção de flores (Figura 7A). As alturas finais das plantas em ambas as condições diferiram marcadamente.

Em regime indutivo de 8 horas de luz a floração ocorreu por volta de 12 semanas após a germinação. O início da floração foi marcado pelo desenvolvimento rápido do eixo principal(escapo floral), simultaneamente ao aparecimento de ramos laterais. Os internós, então, aumentaram em comprimento e as folhas que emergiram nos ramos laterais e eixo principal foram menores que aquelas produzidas anteriormente e típicas desta fase(Figura 7A). O escapo floral promoveu, portanto, aumento em altura, de modo que as plantas com flores apresentaram altura três vezes maior que a verificada anteriormente à ocorrência deste fenômeno(Figura 7A).

O aspecto morfológico da planta quanto a folhas e internós mostrou-se, portanto, marcadamente afetado pelo fotoperíodo.

Figura 7. A.

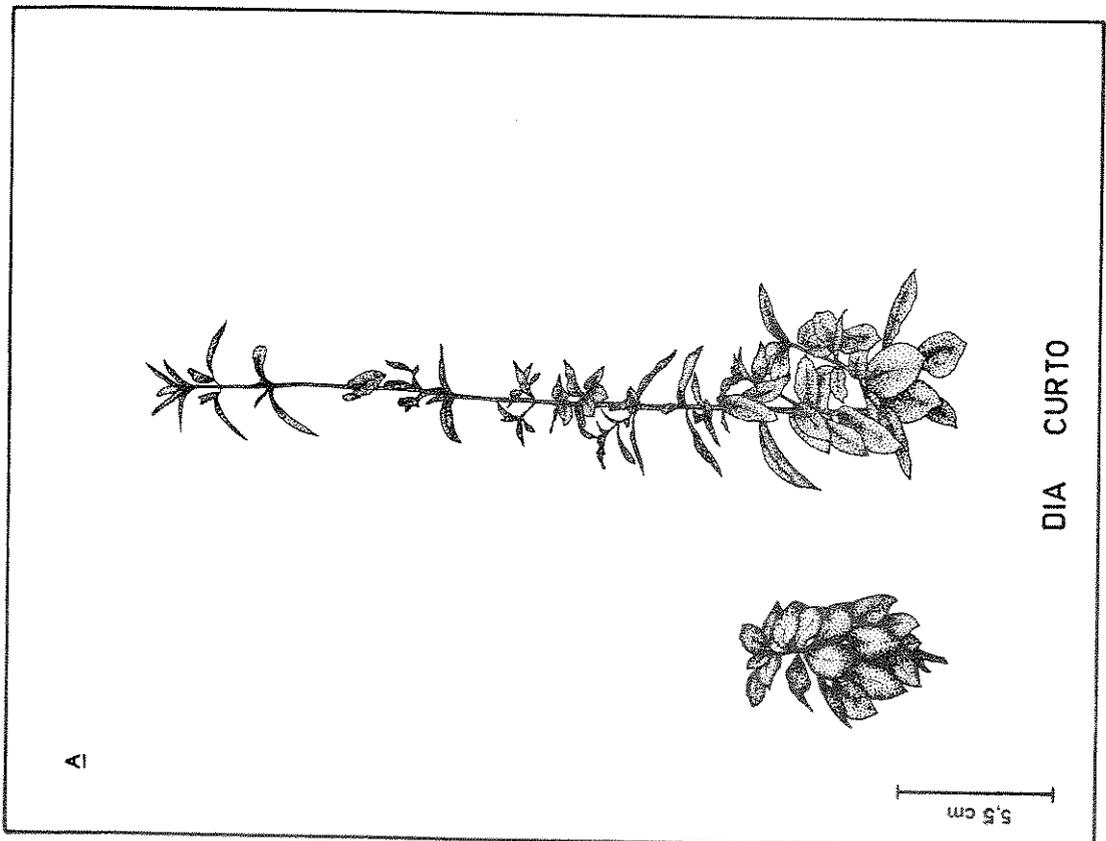
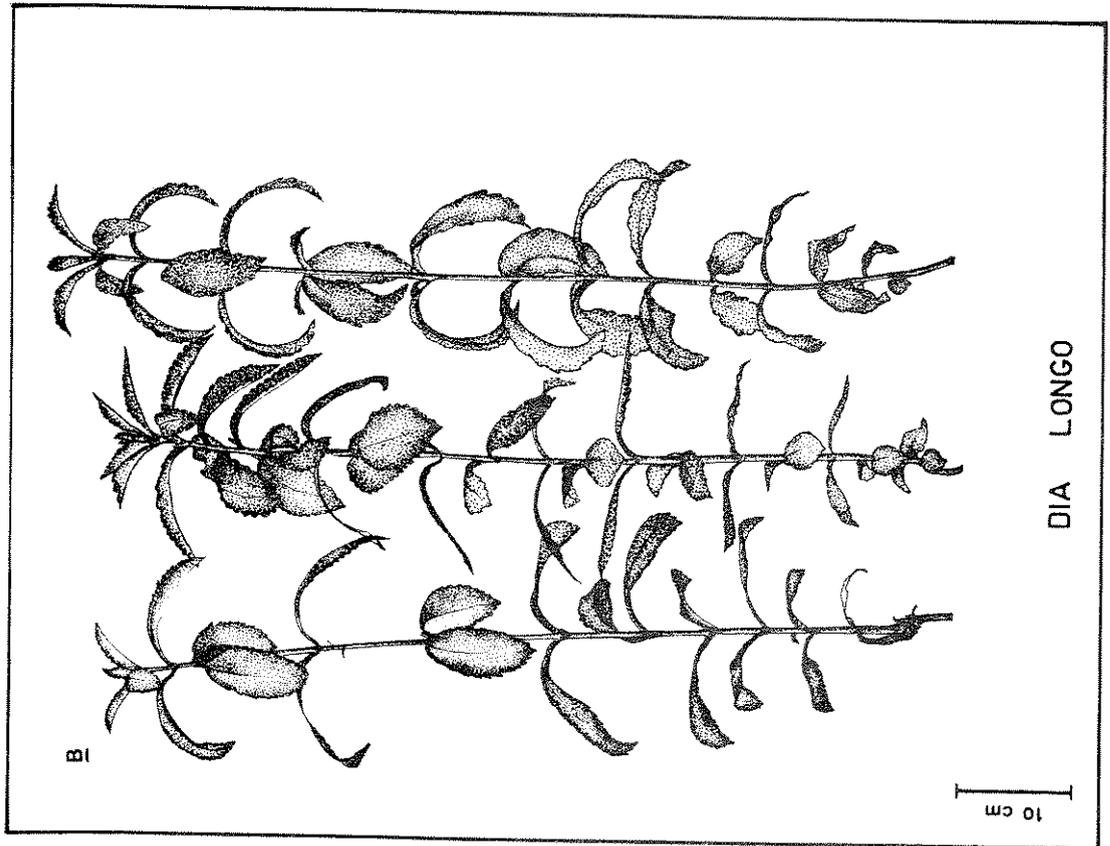
Plantas de S. rebaudiana crescidas em DC.

esquerda: planta com morfologia vegetativa (aspecto de planta em roseta).

direita: planta em floração.

Figura 7. B.

Plantas de S. rebaudiana crescidas em DL.



3.2.b. Análise de Crescimento

O crescimento absoluto inicial de Stevia rebaudiana foi lento devido às pequenas reservas cotiledonares, fenômeno comum a muitas ervas daninhas. Plantas mantidas em condições não indutivas atingiram ao redor de apenas 10 cm de altura e 11 pares foliares, somente com 60 dias de idade.

i. Altura das Plantas

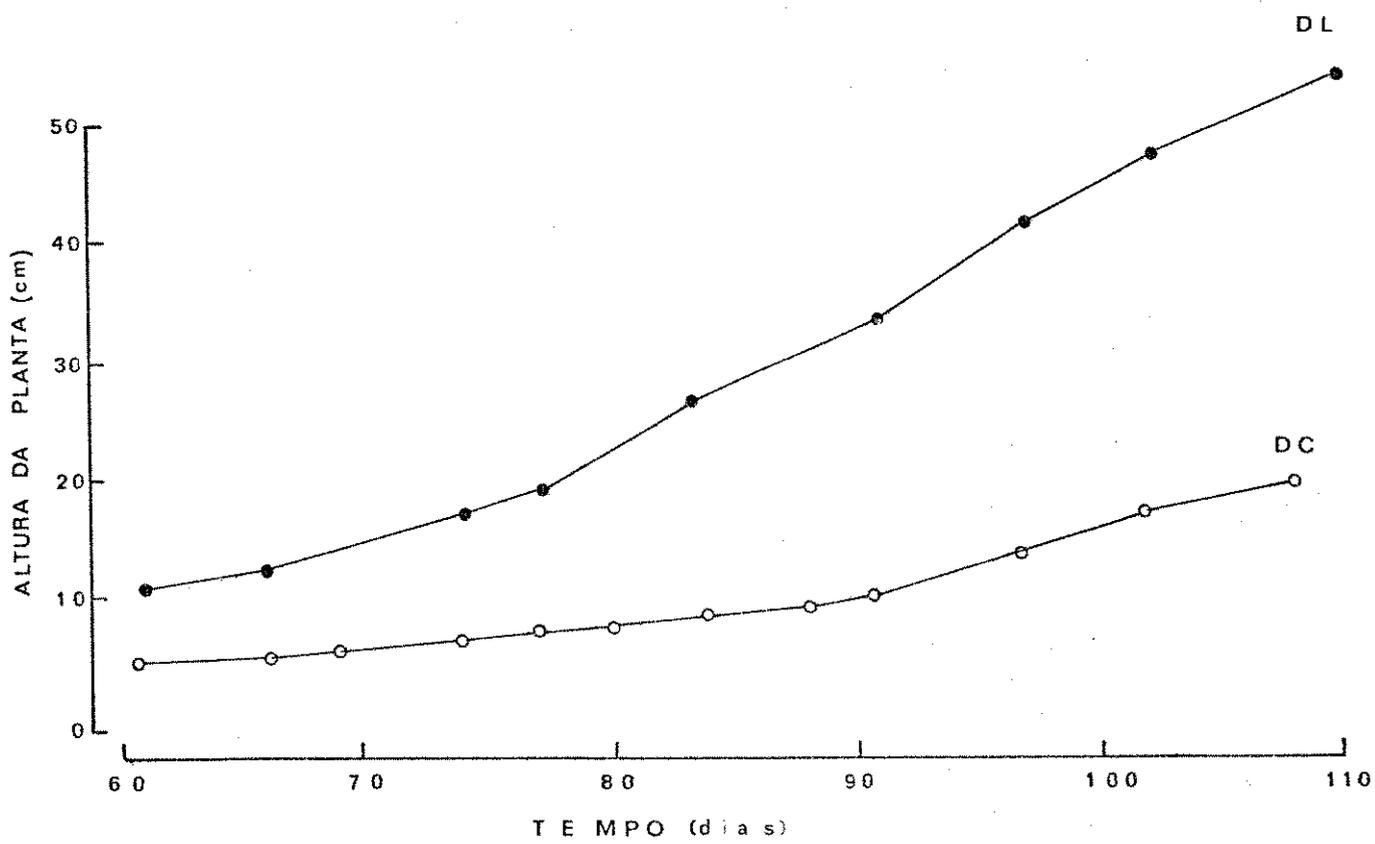
Os experimentos tiveram início quando as plantas desenvolvidas em condições de DL e DC contavam com 60 dias de idade, apresentando tamanho conveniente para se trabalhar.

A Figura 8 ilustra o desenvolvimento em altura das plantas em função da idade. No início do experimento (dia 60) a altura média das plantas mantidas em condições de DL já era o dobro daquela em DC. Esta condição prevaleceu mas com a altura absoluta das plantas em DL aumentando mais rapidamente que as em DC. Assim, no início, as plantas em DL tiveram 10 cm de altura e as em DC, 5 cm. Para que estes valores fossem dobrados foram necessários, em condições de DL, 19 dias, e em DC, 30. No final do experimento, portanto, as plantas crescidas em fotoperíodo não indutivo tiveram 52 cm de altura, enquanto que aquelas crescidas em condições indutivas, apenas 20 cm. Durante o experimento (entre os dias 60 e 110) a taxa absoluta de crescimento foi de 0,88 cm/dia, em DL, e 0,34 cm/dia em DC, ou seja 40% maior em DL.

Por volta do dia 90 parece que a taxa de crescimento em altura das plantas em DC aumentou, provavelmente, devido à ocorrência do escape floral, o que sugere que as primeiras manifestações da indução floral podem ser detectadas através de medidas de

Figura 8:

Crescimento em altura de plantas de S. rebaudiana em DL (●) e DC (○). Cada valor representa a média de 5 plantas.



crescimento. Assim, a taxa absoluta de crescimento em altura, em DC, aumentou na segunda fase aproximadamente 4 vezes, sendo entre os dias 60 e 90 de 0,16 cm/dia, e a partir do dia 90 de 0,60 cm/dia. A diferença entre as alturas de plantas em DL e DC diminuiu depois do dia 90, devido à aceleração do crescimento das plantas em DC. Assim, as plantas em DL, que eram cerca de 3,6 vezes mais altas no dia 90, passaram a sê-lo 2,6 vezes.

ii. Número e Tempo de Aparecimento de Pares Foliare

A diferença em altura das plantas crescidas em DL foi devida a dois fatores: primeiramente, as plantas em DL produziram pares foliares mais rapidamente, aumentando o número de internós, e em segundo lugar, estes internós foram mais longos. Assim, no dia 60, início do experimento, as plantas em DL tiveram 11 pares foliares enquanto que aquelas em DC, 6, apresentando diferença de 5 pares foliares. Durante o experimento esta diferença aumentou indicando pequena mudança no plastocron, que foi mais curto em DL. Desta maneira, no dia 80, plantas em DL tiveram 6 pares foliares a mais, no dia 90, 7 e no final do experimento, 8 (Figura 9A). Um fator que contribuiu para esta diferença final foi que depois do dia 96 a taxa de aparecimento das folhas no escapo floral em DC, tornou-se mais lenta. Esta mudança no padrão de aparecimento de pares foliares pode ser vista claramente quando estes dados são transformados em Log_{10} (Figura 9B). Nota-se que em DL a produção dos pares foliares foi constante no decorrer do tempo e em DC sofreu nítida queda ao redor do dia 90. No final do experimento as plantas em DL tiveram 26 pares foliares e em DC, 18.

Em um segundo experimento, utilizando-se 13 plantas por tratamento, estas diferenças foram confirmadas (Figura 10) e pode ser

Figura 9. A.

Produção de pares foliares por plantas de S. re-
baudiana crescidas em DL (●) e DC (○). Cada va
lor representa a média de 5 plantas.

Figura 9. B.

Produção de pares foliares por plantas de S. re-
baudiana crescidas em DL (●) e DC (○). Os valores
das idades das plantas foram transformados em
 Log_{10} .

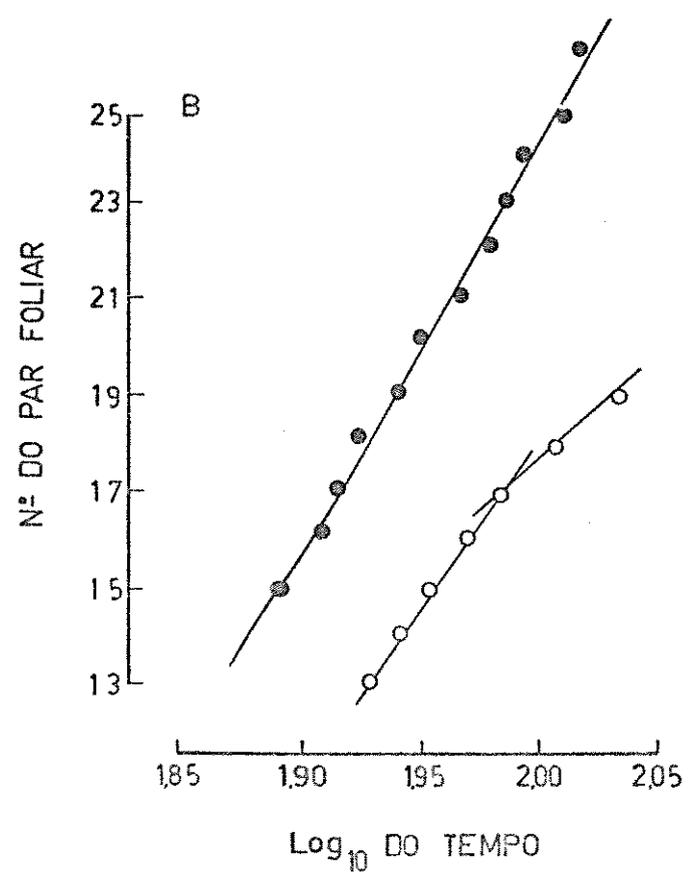
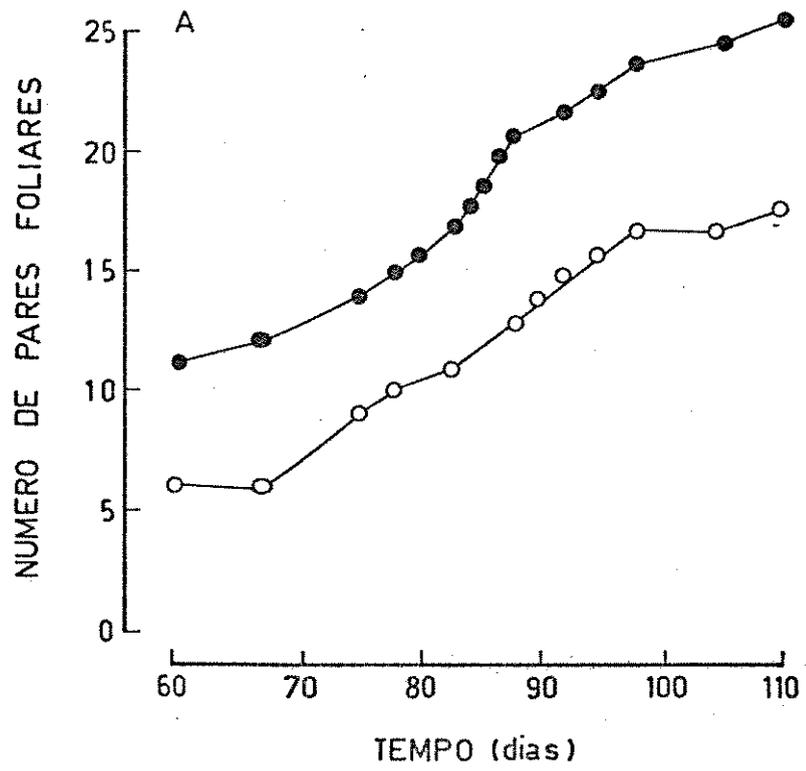
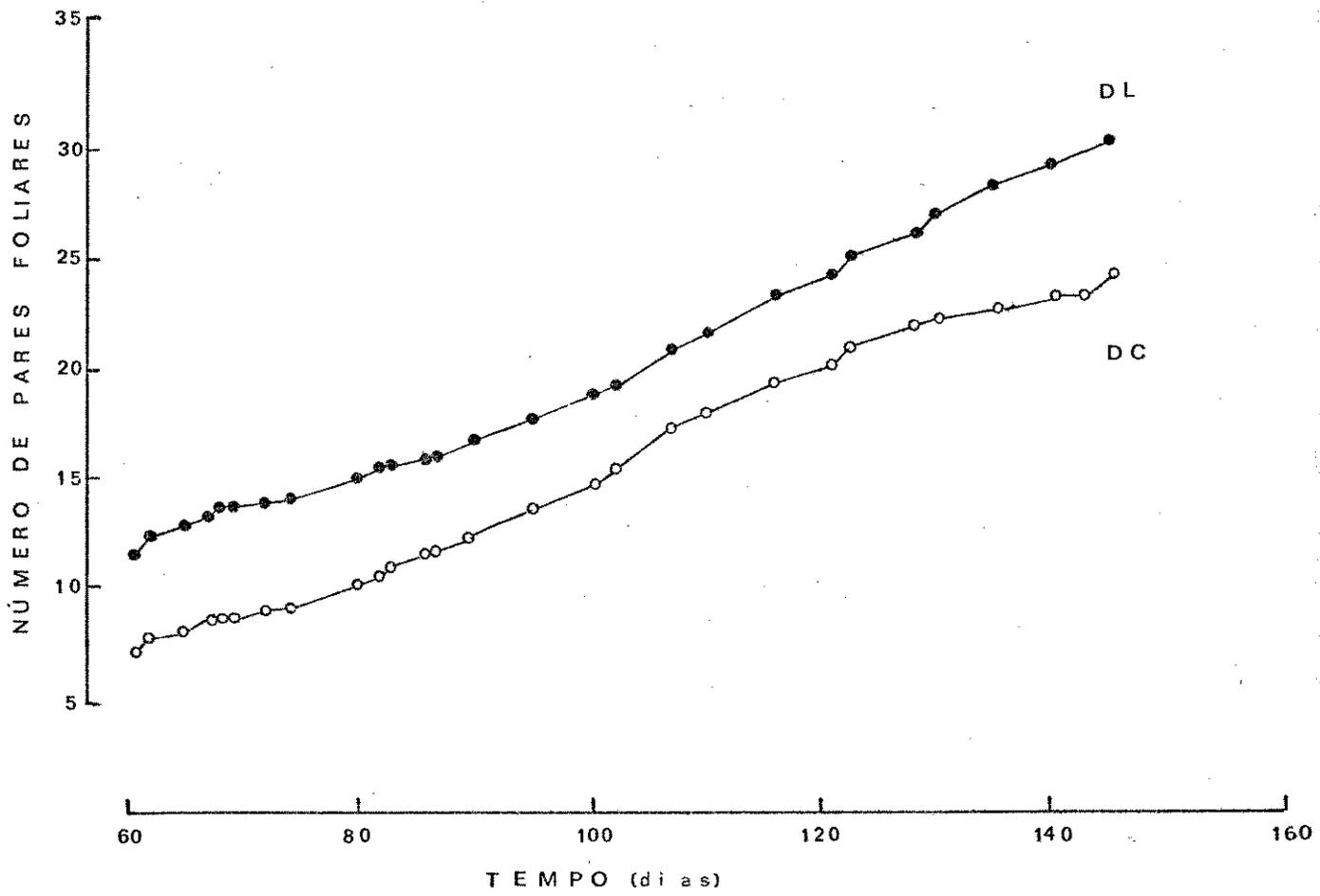


Figura 10:

Produção de pares foliares por plantas de S. re-
baudiana crescidas em DL (●) e DC (○). Cada valor
representa a média de 10 plantas.



visto que as plantas em DL tiveram, em geral, de 5 a 6 pares foliares a mais do que aquelas em DC, de mesma idade.

Pela análise dos gráficos apresentando cada planta analisada (Figura 11A,B) verifica-se dois aspectos. O primeiro é que a variação na produção de novos pares foliares entre as plantas em DL foi menor que a existente entre aquelas em DC. Isto talvez por que em condições de DC o fenômeno de indução floral não ocorreu de forma simultânea e sincronizada entre as plantas analisadas e assim o estado fisiológico variou muito. Uma consequência disto foi que a variação aumentou com o tempo (Figura 11B). Já em DL, a condição artificial imposta fez com que as plantas continuassem em estado vegetativo, mantendo as mesmas taxas de produção de pares foliares, como verificado anteriormente (Figura 9B). Por esta razão é que as folhas em DL foram escolhidas para estudo das mudanças dos níveis de açúcares solúveis totais e proteína durante o desenvolvimento das mesmas (seção 3.3.c).

O segundo aspecto importante, que não pode ser notado claramente na Figura 10, que mostra a média de todas as observações, é que plantas em DC apresentaram, novamente, duas fases distintas na produção de novos pares foliares. A primeira fase foi semelhante às plantas em DL, mas a segunda mostrou-se característica das plantas em DC e ocorreu após 120 ou 130 dias, quando a produção dos pares foliares tornou-se mais lenta ou foi impedida com o advento do escapo floral e a subsequente produção de flores. A Figura 12 mostra os dados para 3 plantas em DL e 3 em DC. Verifica-se mudança no padrão de aparecimento dos pares foliares, em DC, ao redor do dia 120, neste experimento. Antes deste período a produção de novos pares foliares, em DL e DC foi linear com o decorrer do tempo. Os dados apresentados até o dia 150 confirmaram o maior número de pares foliares em DL, já notado anteriormente (Figura 9A) entre os dias 90 e 110.

Figura 11. A,B.

Produção de pares foliares por plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (A) e DC (B). Das 10 plantas analisadas são ilustradas apenas 3 para cada fotoperíodo: os dois padrões extremos e o intermediário.

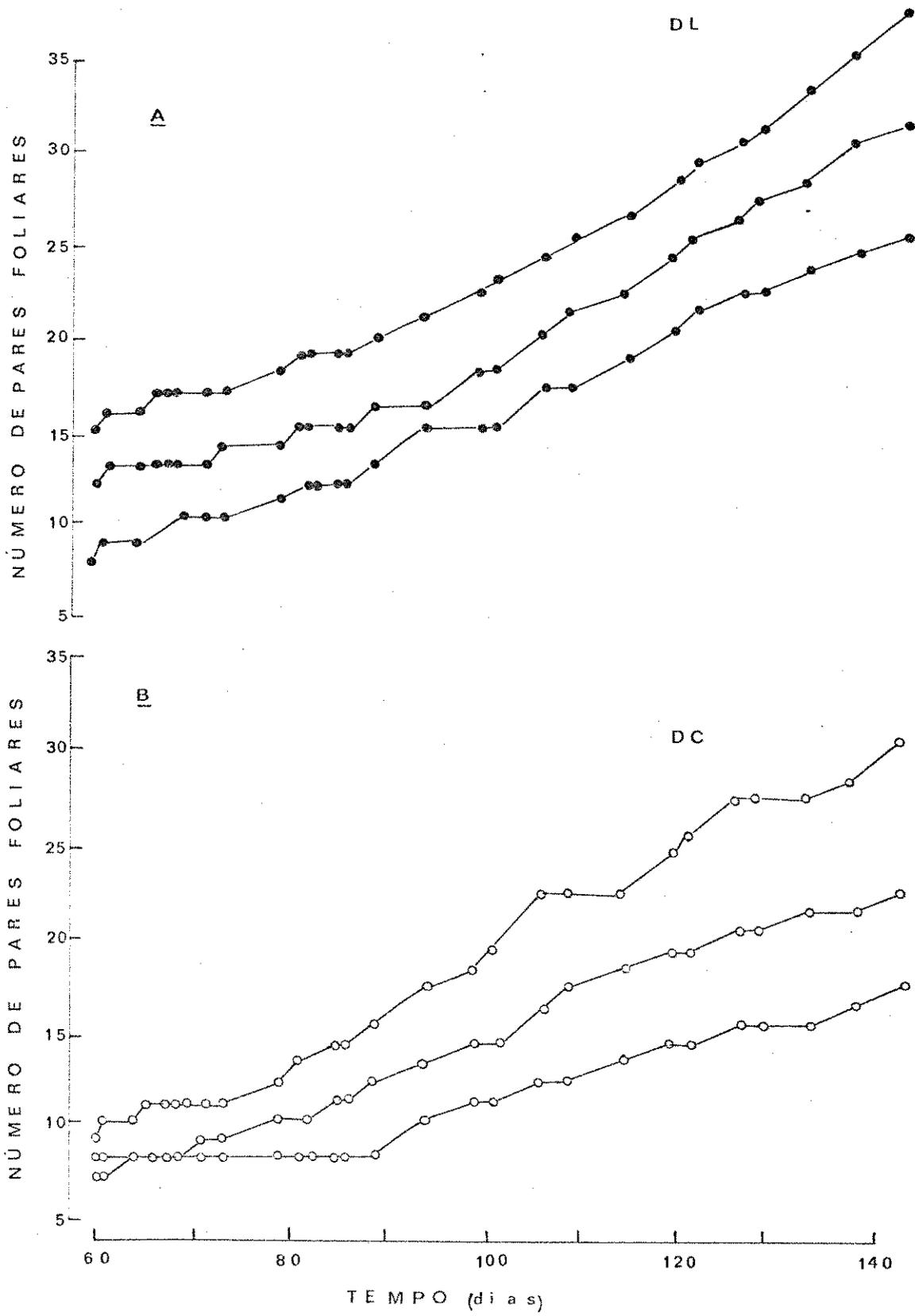
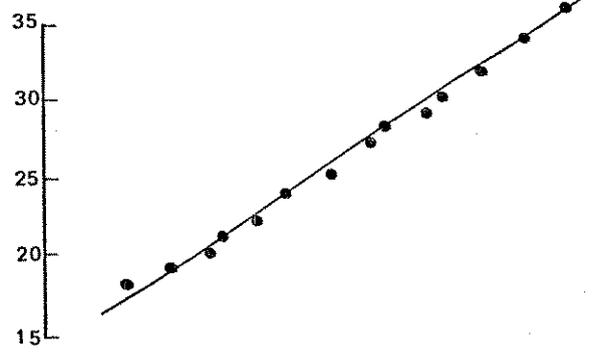


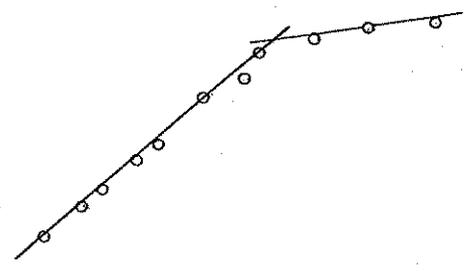
Figura 12:

Produção de pares foliares por 3 plantas de S.re-
baudiana crescidas em DL (●) e 3 em DC (○).

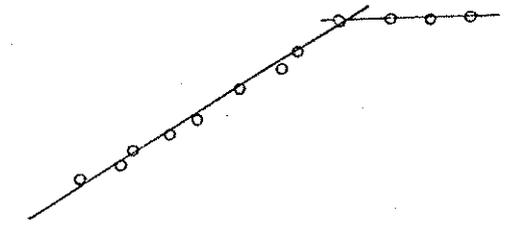
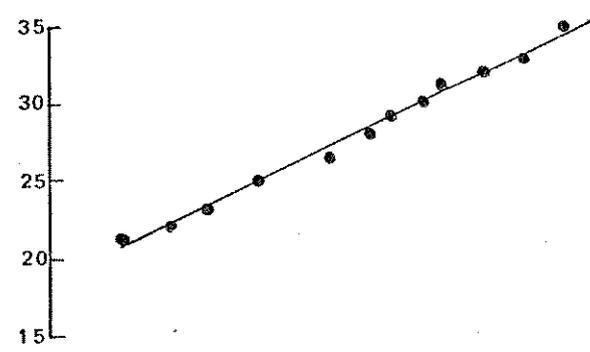
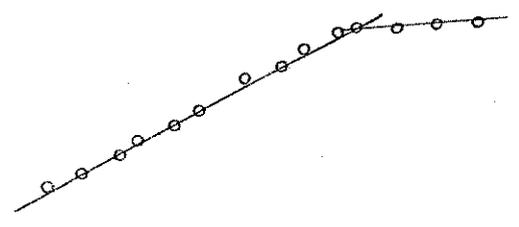
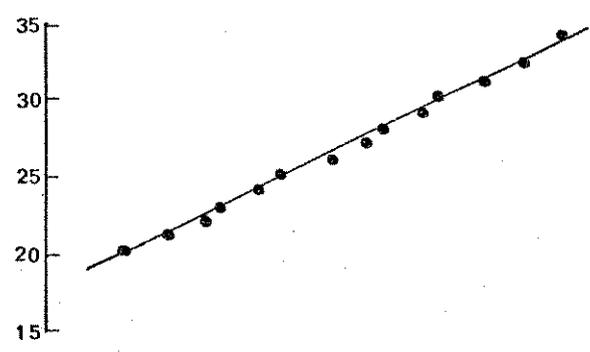
DL



DC



NÚMERO DE PARES FOLIARES



TEMPO (d i a s)

O fato das plantas em DL possuírem mais pares foliares do que plantas de mesma idade em DC sugere que o tempo de aparecimento de novos pares foliares deve ter sido mais curto em DL. Isto pode ser verificado pela análise apresentada na Tabela 6, que mostra valores de coeficientes de correlação (r) e de inclinação (b) para 20 plantas, em que número de pares foliares foi colocado contra tempo, durante a primeira fase linear, em DC, ou durante todo o experimento, em DL. A análise de variância estabeleceu que houve diferença significativa ($F = 5,8^*$) entre as inclinações para DL e DC, de tal modo que a média dos valores de b em DL foi maior, confirmando tempo de aparecimento mais curto. Das médias das inclinações para os dois tratamentos pode ser calculado o intervalo entre o aparecimento de dois pares foliares consecutivos, que é de 4,08 dias, em DL, e 4,81 dias em DC, o que representa diferença de 0,73 dias, ou seja, 17,5 horas, no plastocron. Esta diferença tornou-se significativa, a longo prazo, durante a vida da planta. Assim, o aparecimento do 5º par foliar em DC, em comparação com DL, já estava atrasado por volta de 4 dias, e do 20º par, de 15 dias. Quando as plantas em DC entraram na segunda fase, em que o intervalo entre o aparecimento dos pares foliares se tornou ainda maior, as diferenças entre os dois tratamentos aumentaram. Deste modo, no final do experimento, no dia 145, as plantas em DL tiveram 30 pares foliares contra somente 24, em DC (Figura 10).

Em DL, portanto, a produção de novos pares foliares pareceu ser constante e linear, mas em DC ocorreu nítida mudança no padrão de produção durante o desenvolvimento do escapo floral. Assim, DC altera o caminho do desenvolvimento do ápice, de vegetativo para reprodutivo, causando um plastocron maior.

iii. Crescimento das Folhas

Além do aparecimento dos pares foliares ter sido mais rápido

Tabela 6

Valores de coeficientes de inclinação (b), correlação (r) e número de observações (n) calculados a partir de análise de regressão linear de gráficos de número de pares foliares em função do tempo para 20 plantas de S. rebaudiana analisadas em DL e DC.

Planta	DL			DC		
	b	r	n	b	r	n
1	0,273	0,996	15	0,175	0,995	10
2	0,220	0,994	12	0,264	0,986	10
3	0,258	0,997	12	0,185	0,997	11
4	0,222	0,996	11	0,198	0,987	10
5	0,252	0,995	12	0,190	0,987	10
6	0,243	0,998	13	0,148	0,985	9
7	0,250	0,998	14	0,235	0,996	11
8	0,284	0,997	12	0,190	0,989	10
9	0,223	0,996	10	0,243	0,978	10
10	0,243	0,998	15	0,278	0,998	11
\bar{x}	0,245	-	-	0,208	-	-
F = 5,8 * (P < 0,05)						

do em DL, as folhas formadas nesta condição fotoperiódica foram maiores em termos de área, peso fresco, peso seco e taxa de crescimento, o que poderia ser reflexo do estado vegetativo ou do do bro de quantidade de luz recebida (16 horas). Foram também superiores com relação aos níveis de açúcares solúveis totais e proteína (v. abaixo).

A Figura 13A,B mostra que o comprimento máximo das folhas de plantas em DL foi de 6,8 a 7,4 cm, superando em duas vezes o das folhas de plantas em DC, que variou entre 3,0 a 4,0 cm. As folhas produzidas durante o desenvolvimento do escapo floral tiveram comprimentos máximos menores, entre 2,0 e 2,5 cm. Pode ser visto ainda que, em DL, todas as folhas atingiram aproximadamente o mesmo tamanho máximo, reflexo do crescimento vegetativo contínuo artificialmente imposto em DL. Este não foi o caso em DC, em que, novamente, por volta do dia 90, os pares foliares produzidos tiveram seus comprimentos finais marcadamente menores que os anteriores. Assim, além da indução floral reduzir o aparecimento dos pares foliares, reduziu também o comprimento máximo dos mesmos. Isto indica que o tamanho da folha não é simplesmente função de quantidade de luz recebida por dia, mas da própria mudança morfológica provocada pelo comprimento do dia.

Comparando-se o crescimento de uma das folhas analisadas em DL e DC (Figura 14A) observa-se que em ambas as condições foi necessário um período de 20 dias para atingirem o comprimento máximo. Assim, a taxa absoluta e a relativa de crescimento, em DL, foi marcadamente maior, sendo em média de 0,21 cm/dia em DC e 0,35 cm/dia, em DL, o que representa um aumento de 60% (Tabela 7).

A Figura 14B mostra os comprimentos finais de todas as folhas de plantas em DL e DC, analisadas. Pode ser visto que nos dois casos, embora as folhas em DL fossem muito maiores do que

Figura 13, A,B.

Crescimento em comprimento de pares foliares de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (A) e DC (B). Cada valor representa a média de 5 plantas.

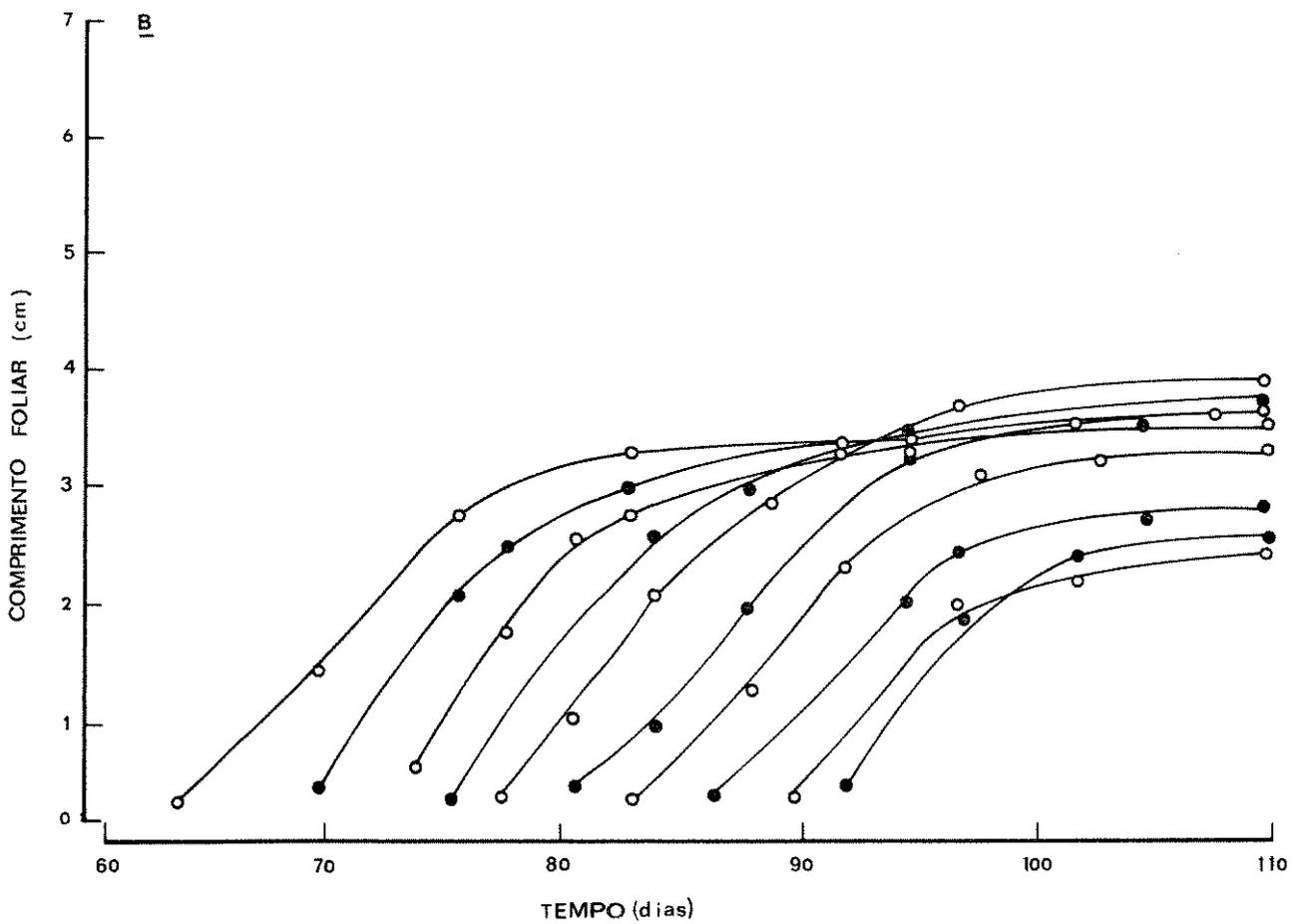
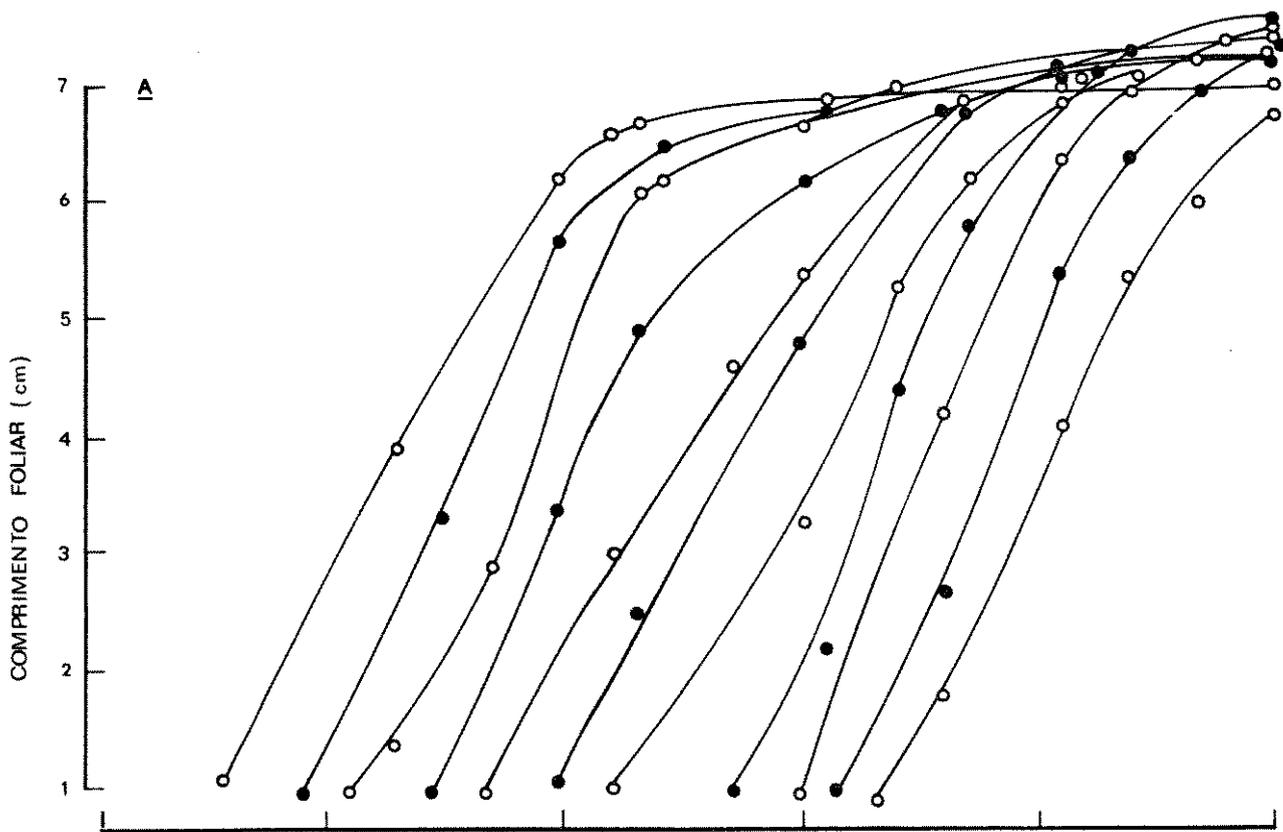


Figura 14. A.

Crescimento em comprimento de 1 par foliar de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (●) e em DC (o). Cada valor representa a média de 5 plantas.

Figura 14. B.

Comprimento máximo alcançado pelos pares foliares de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (●) e DC (o). Cada valor representa a média de 5 plantas.

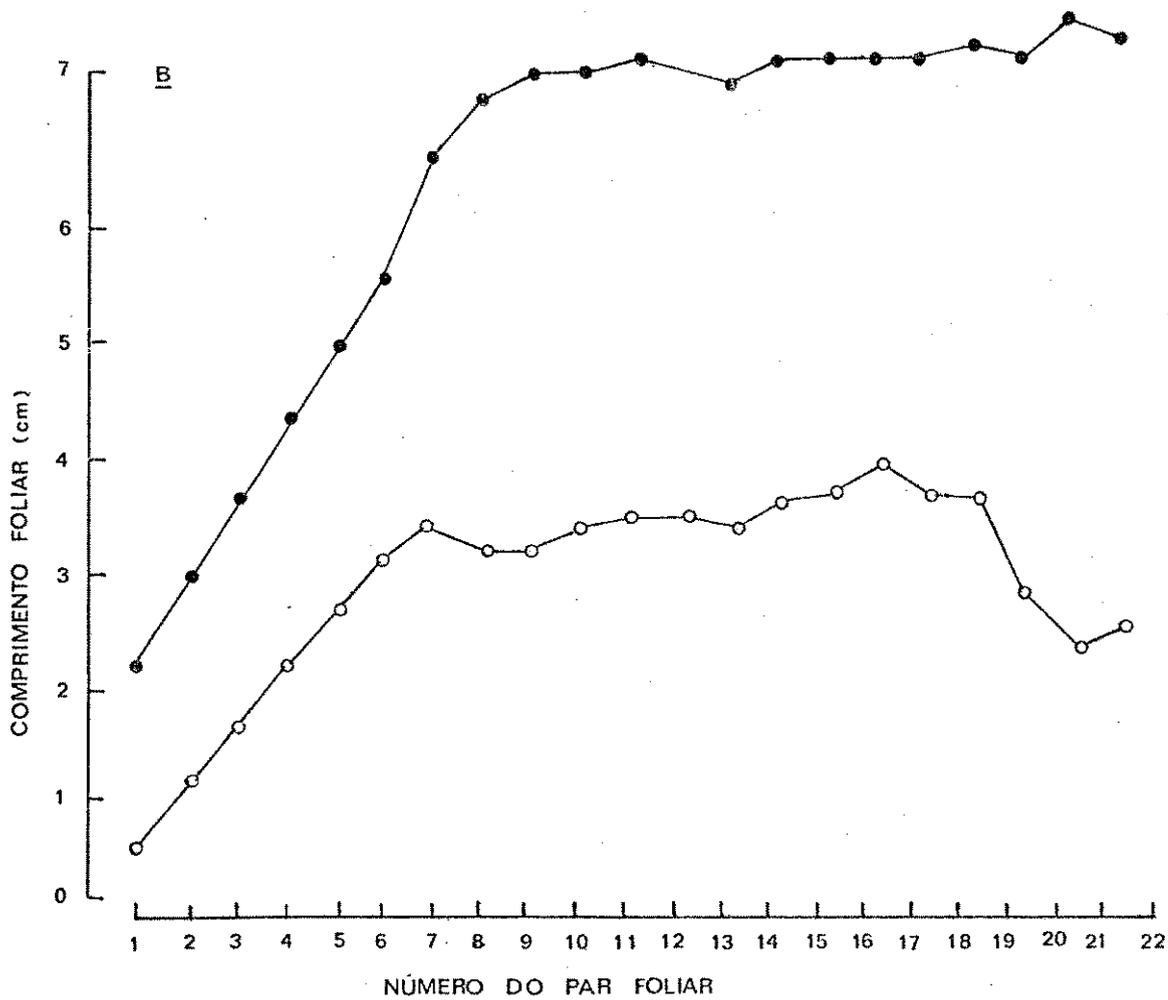
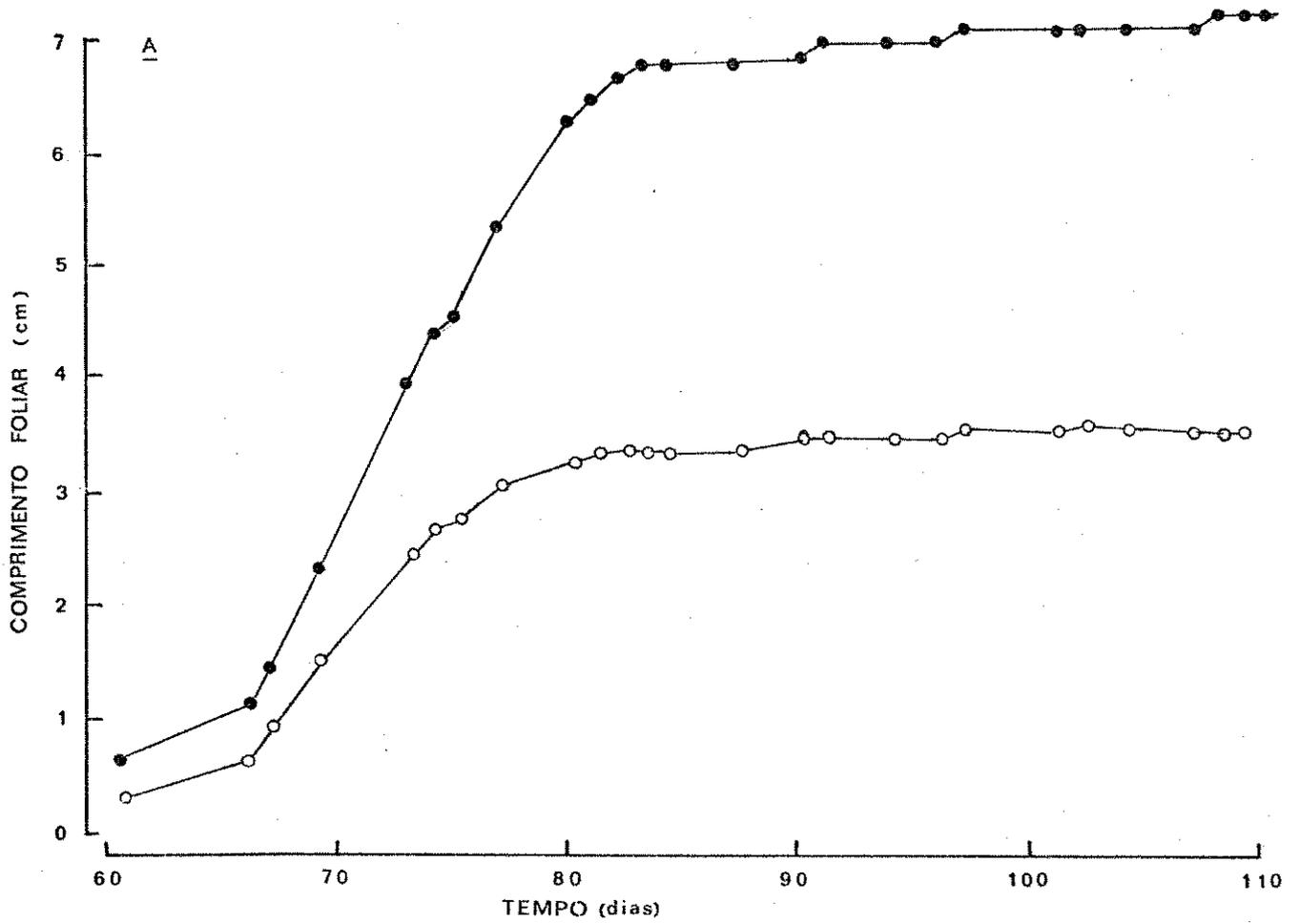


Tabela 7

Valores de taxas de crescimento absoluto (cm/dia) para 20 folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL e DC. Cada valor representa a média de 5 plantas.

Par Foliar	Taxa de crescimento (cm/dia)	
	DL	DC
1	-	0,20
2	0,34	0,18
3	0,36	0,26
4	0,40	0,22
5	0,32	0,19
6	0,30	0,20
7	0,32	0,20
8	0,31	0,20
9	0,36	0,20
10	0,41	0,21
\bar{x}	0,35	0,21

em DC, os pares iniciais aumentaram em tamanho até o 7º ou 8º par, quando o comprimento máximo foi atingido. Em DL este tamanho máximo presumivelmente continuou o mesmo, mas em DC, depois do 18º par, houve nítida mudança no tamanho máximo das folhas produzidas no escapo floral. Assim, além do fotoperíodo influir no tempo de aparecimento das folhas, teve efeito marcante na forma e tamanho máximo das mesmas.

iv. Outros Aspectos do Crescimento de Folhas

Os dados apresentados acima mostraram que as folhas de plantas em DL foram, em geral, maiores em tamanho do que aquelas em DC. Não é raro encontrar, contudo, algumas plantas em DC que possuam folhas grandes, com aspecto daquelas normalmente associadas a DL. Embora estas folhas sejam do mesmo tamanho em ambas as condições fotoperiódicas, são geralmente menos erectas, curvadas para baixo, mais claras e de aspecto frágil e portanto menos rígido. Como os internós destas plantas em DC permanecem curtos e as folhas sobrepostas, não são confundidas com aquelas em DL (Figura 7A,B). Estas folhas de tamanho, não típico, foram escolhidas nesta seção para o estudo das relações entre área, peso seco, peso fresco, nos dois fotoperíodos.

A Tabela 8 mostra os dados de 2 experimentos independentes em que peso seco, peso fresco e área de 48 folhas foram analisados. Nota-se que no experimento 1, as folhas de plantas em DC, embora especialmente escolhidas por serem grandes (34% maiores em área do que aquelas em DL) tiveram apenas metade do peso seco. Assim, em termos de concentração, aquelas em DL apresentaram 3,1 mg de peso seco/cm², comparado com apenas 1,0 mg de peso seco/cm² em DC. Embora o material seco fosse duas vezes maior em DL, o peso

Tabela 8

Valores de peso seco (PS), peso fresco (PF) e área de 24 folhas de plantas de *S. rebaudiana* crescidas em DL e DC, analisadas em dois experimentos.

Experimento 1.

folha	DL			DC		
	PS (mg)	PF (mg)	área (cm ²)	PS (mg)	PF (mg)	área (cm ²)
1	26,0	130	8,9	8,0	70	7,9
2	29,2	130	8,4	10,0	100	10,7
3	22,8	100	7,3	10,0	100	10,3
4	23,2	110	6,9	14,0	150	13,2
5	27,6	130	8,1	20,0	190	17,2
6	15,6	60	4,9	8,4	120	10,7
7	21,2	120	8,7	6,0	80	6,8
8	34,2	160	10,8	24,2	230	20,8
9	32,0	150	7,6	10,0	120	11,5
10	28,8	140	10,7	10,0	120	11,9
11	22,8	105	7,9	8,0	110	11,0
12	25,0	140	10,3	29,0	240	21,2
\bar{x}	25,7	123	8,4	13,1	136	12,8
F =	23,9 ^{***}	N.S.	9,5 ^{***}			

Experimento 2.

folha	DL			DC		
	PS (mg)	PF (mg)	área (cm ²)	PS (mg)	PF (mg)	área (cm ²)
1	17,2	50	10,9	27,9	250	16,7
2	26,4	95	14,1	20,9	170	12,4
3	24,3	90	13,6	7,3	50	5,7
4	20,9	70	13,1	16,9	140	13,7
5	23,2	80	12,8	21,4	200	18,7
6	19,9	60	11,5	16,3	120	9,2
7	26,5	100	14,4	8,2	80	19,7
8	27,5	130	16,0	24,9	220	16,5
9	21,5	60	11,1	12,5	130	10,1
10	30,3	120	17,3	10,0	100	8,8
11	16,1	40	9,9	16,9	160	14,6
12	29,6	100	13,7	15,4	150	-
\bar{x}	23,6	83	13,2	16,5	148	13,3
F =	9,52 ^{**}	12,2 ^{**}	N.S.			

fresco foi maior em DC. Estes dados foram confirmados no segundo experimento, onde o tamanho das folhas, em termos de área, foi mais ou menos igual, mas novamente o peso seco, em DC, foi apenas 70% daquele em DL, enquanto que o peso fresco foi 78% maior em DC.

Assim, mesmo que folhas em DC tenham áreas iguais ou maiores do que as em DL, em termos reais de peso seco são significativamente menores o que provavelmente é reflexo da quantidade total de luz recebida. A Figura 15A,B,C,D mostra a relação entre área e peso nos 2 experimentos. Embora os resultados apresentados sejam de experimentos independentes verifica-se que a relação entre aumento em peso seco em função da área, dada pela inclinação (b), foi constante para cada tratamento. Em DL este valor esteve ao redor de 1,95 e em DC, 1,50. Assim, em DL, a cada aumento em 2 cm² o peso seco da folha aumenta em 4 mg, enquanto que em DC, em apenas 3,0 mg, ou seja, apenas 75% do valor verificado em DL.

A Figura 16A,B,C,D, relaciona peso seco e peso fresco destas folhas. No gráfico E estão sobrepostas as retas calculadas pela regressão. Observa-se novamente que o comportamento destes parâmetros dentro de cada tratamento foi igual, mas diferiu entre os tratamentos. A Figura 16E mostra claramente que para um dado peso seco o conteúdo de água em DC foi muito maior, por exemplo, folhas de 25 mg de peso seco em DL contiveram, em média, 80 mg de água, enquanto que aquelas em DC, contendo a mesma quantidade de material seco, possuíam mais do que o dobro de água, 195 mg.

Os resultados desta seção indicam claramente a ação do fotoperíodo no crescimento e desenvolvimento de plantas de Stevia rebaudiana. Os parâmetros afetados a nível morfológico são a altura das plantas, o comprimento dos internós e o comprimento, área, peso fresco e peso seco das folhas.

Figura 15. A,B,C,D.

Relação entre peso seco e área de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (●) e DC (○) analisadas em dois experimentos independentes (A-B, C-D).

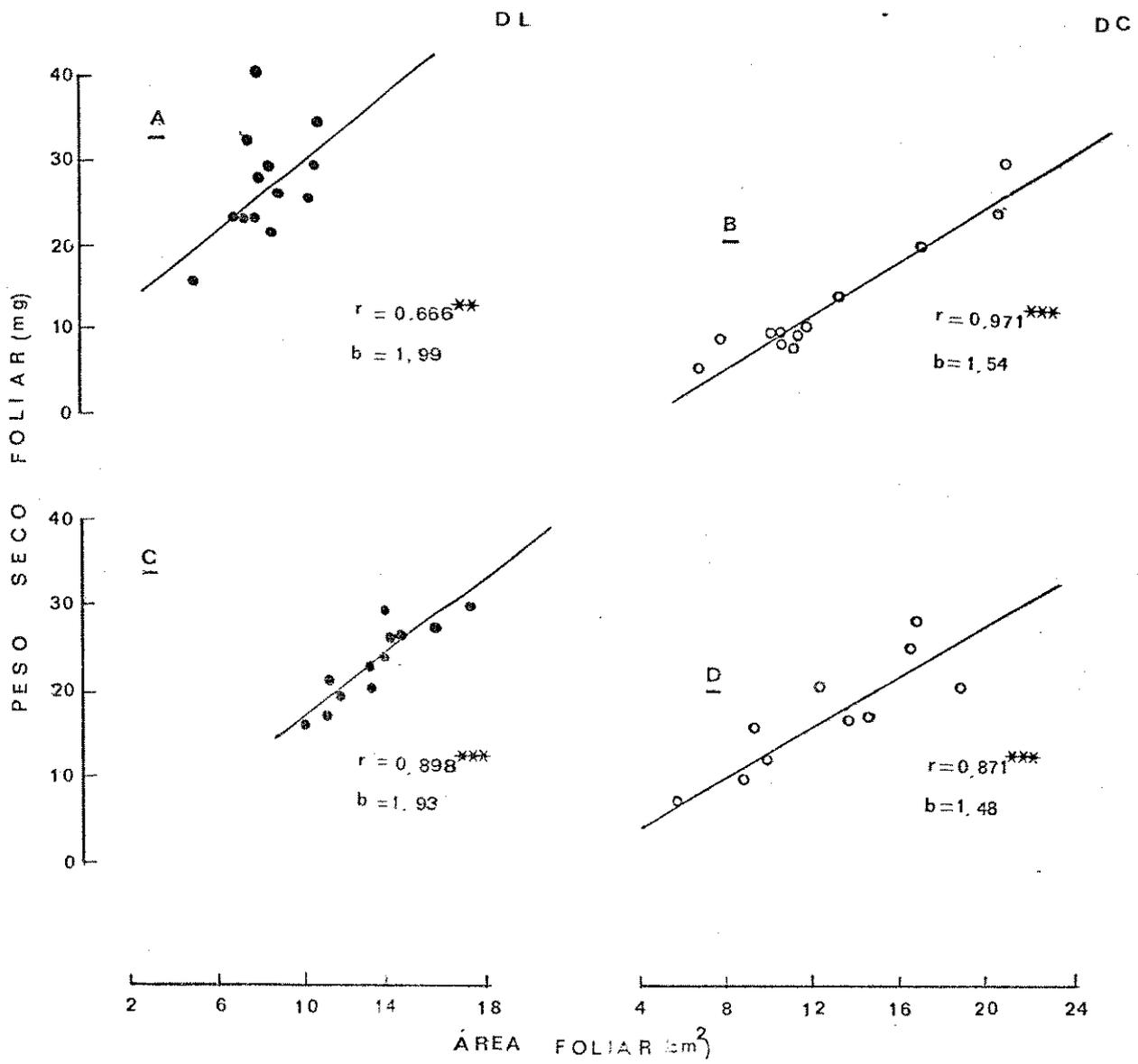
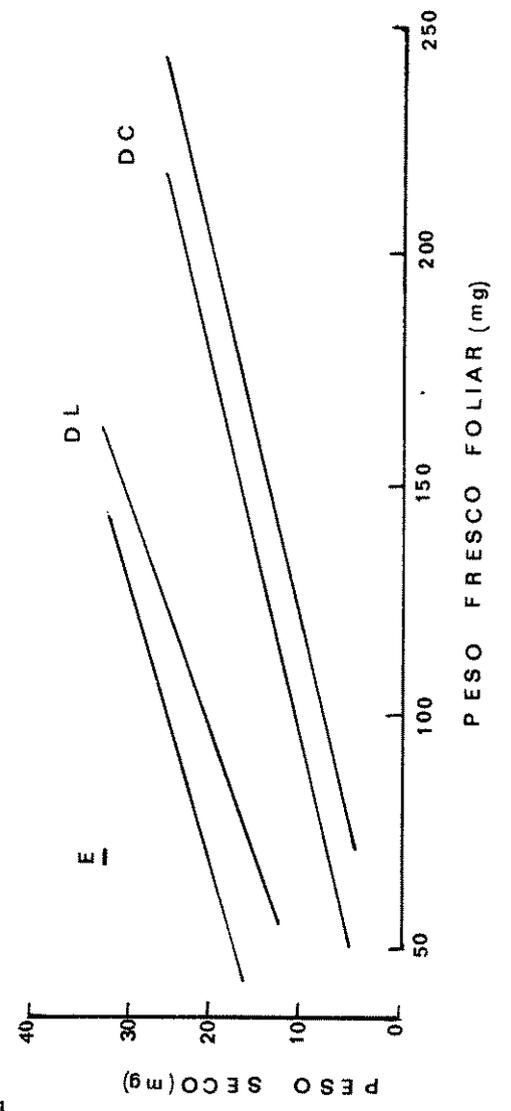
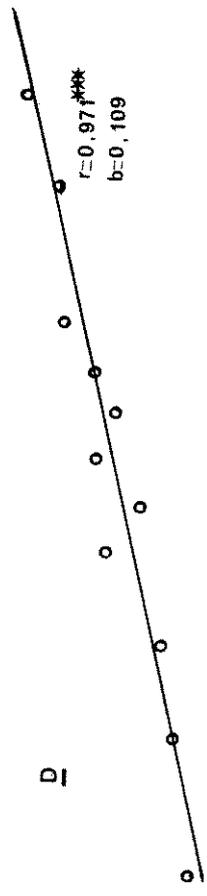
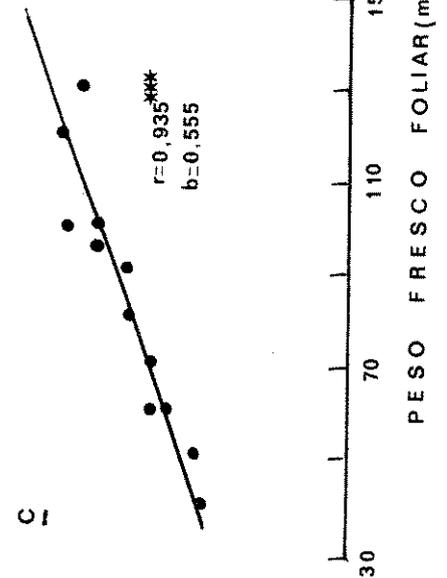
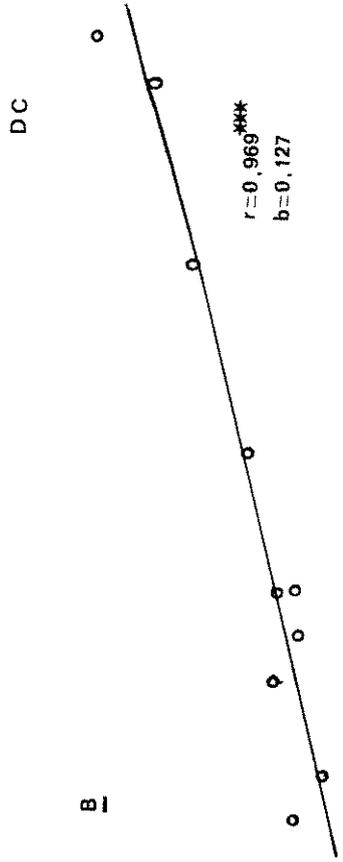
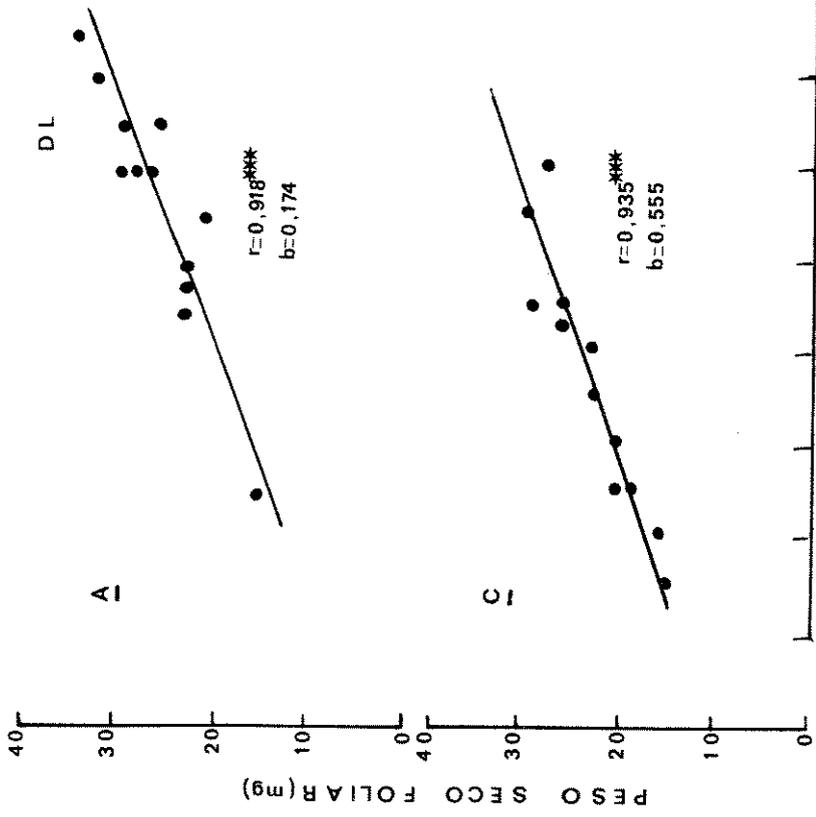


Figura 16. A,B,C,D.

Relação entre peso seco e peso fresco de folhas de plantas de S.rebaudiana crescidas em DL (●) e DC (o) analisadas em dois experimentos independentes (A-C, B-D).

E. Representação conjunta dos gráficos A,B, C,D.



3.3. ANÁLISES DE PROTEÍNA, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS E ESTEVIOSÍDEO EM FOLHAS DE Stevia rebaudiana Bert..

Foram notadas na seção anterior acentuadas diferenças no crescimento de plantas mantidas em condições de DL e DC. Destacou-se a notável ação promotora de DL sobre área e peso seco das folhas.

Os experimentos aqui descritos objetivaram estabelecer os níveis de proteínas, açúcares solúveis totais e esteviosídeo em folhas de Stevia rebaudiana.

3.3.a. Análise do Nível de Açúcares Solúveis Totais

Diante da dificuldade de se analisar, simultaneamente, açúcares totais, esteviosídeo e proteína na mesma folha, tornou-se interessante verificar se a secagem de folhas, para posterior armazenamento influiria significativamente nos níveis de açúcares do tecido. Assim, poder-se-ia dosar proteína na metade fresca da folha e armazenar, após secagem, a outra metade para futura dosagem de esteviosídeo e açúcares solúveis totais. A análise de metades de uma mesma folha é vantajosa por eliminar a variação entre folhas e assim, os parâmetros açúcares totais, esteviosídeo e proteína poderiam ser relacionados para a mesma folha.

Experimentos foram conduzidos no sentido de se verificar o possível efeito de secagem rápida a 80 °C no conteúdo de açúcares solúveis totais, utilizando-se metades frescas e secas de mesmas folhas de plantas crescidas em condições naturais. As metades frescas foram extraídas imediatamente enquanto que as secas somente após a secagem em estufa a 80 °C por 24 horas (v. item 2.2.c. de Material e Métodos).

Um exemplo dos dados de um dos experimentos pode ser obser

vado na Tabela 9, onde estão mencionados os valores dos níveis de açúcares totais para metades frescas e secas de 10 folhas. Da análise conclui-se que a secagem rápida a 80 °C não alterou significativamente o nível de açúcares solúveis totais, o que foi confirmado em cinco experimentos subsequentes. Tal constatação assegura o armazenamento, a seco, das folhas.

As relações entre conteúdo de açúcar, peso seco e peso fresco são mostradas nas Figuras 17A e B. Observa-se que as correlações foram fortes e portanto folhas de maior peso possuíram maior conteúdo de açúcares solúveis totais. Conforme esperado, conteúdo de açúcar correlacionou-se melhor com peso seco do que com peso fresco, indicando que peso seco é o parâmetro mais adequado para avaliar quantidade de tecido, já que no tecido seco as variações devidas às mudanças no conteúdo de água são eliminadas no momento de se estimar o peso.

A inclinação do gráfico da Figura 17A mostra que o aumento em 1 mg no peso seco correspondeu ao aumento em 216 µg em açúcares solúveis totais. Assim, uma folha de 50 mg de peso seco teve aproximadamente 9 mg de açúcares solúveis totais, o que equivale a 18% do peso seco.

Das análises dos gráficos acima conclui-se que folhas maiores em termos de peso tiveram maiores níveis absolutos de açúcares solúveis totais. Tomou-se interessante analisar, diante desta constatação, se a concentração de açúcar no tecido manteve-se constante ou variou com o peso da folha.

Embora tenha existido correlação entre concentração de açúcar e peso seco (Figura 18A) e peso fresco (Figura 18B) pode ser verificada grande variação entre as folhas. Apesar dos valores dos coeficientes de correlação terem sido significativos ($P < 0,01$) a tendência de folhas maiores terem concentração levemente maior foi fraca. Assim, dobrando-se o peso seco da folha a concentração de

Tabela 9

Valores de conteúdo de açúcares solúveis totais de metades frescas e secas de mesmas folhas de S.rebaudiana. Em seis experimentos não houve diferença significativa entre metades frescas e secas. Cada valor representa a média de 8 repetições.

Folha	Conteúdo de Açúcares Solúveis Totais (µg)	
	Metade Fresca	Metade Seca
1	1815	1760
2	1760	1760
3	2915	3135
4	1650	1815
5	3300	2860
6	2805	2805
7	4400	3080
8	1980	1760
9	1815	1540
10	2255	2750
\bar{x}	2469,5	2326,5
t = 0,91 (N.S.)		

Figura 17. A,B.

Relação entre conteúdo de açúcares solúveis totais e peso seco (A) ou peso fresco (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 16 replicatas.

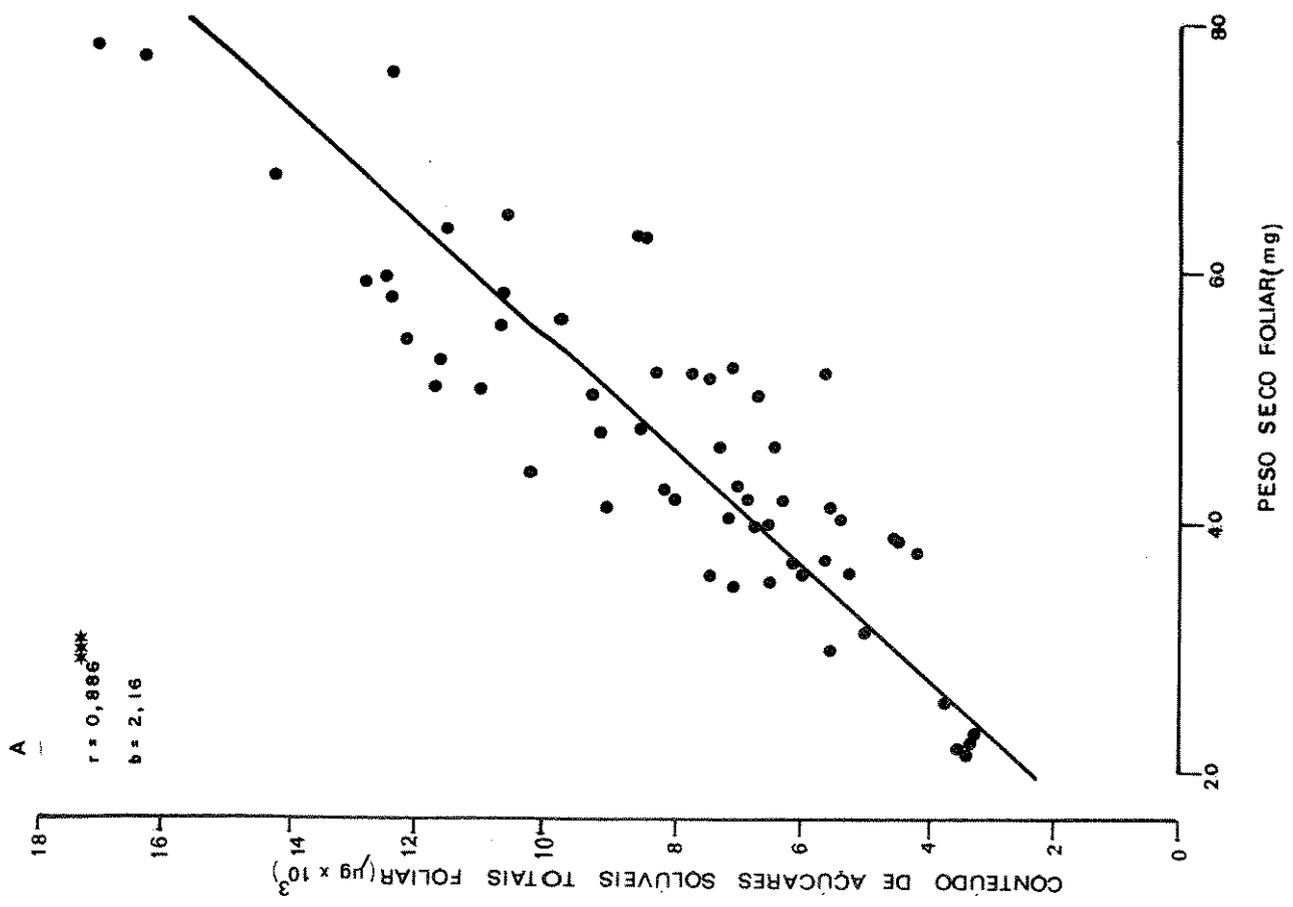
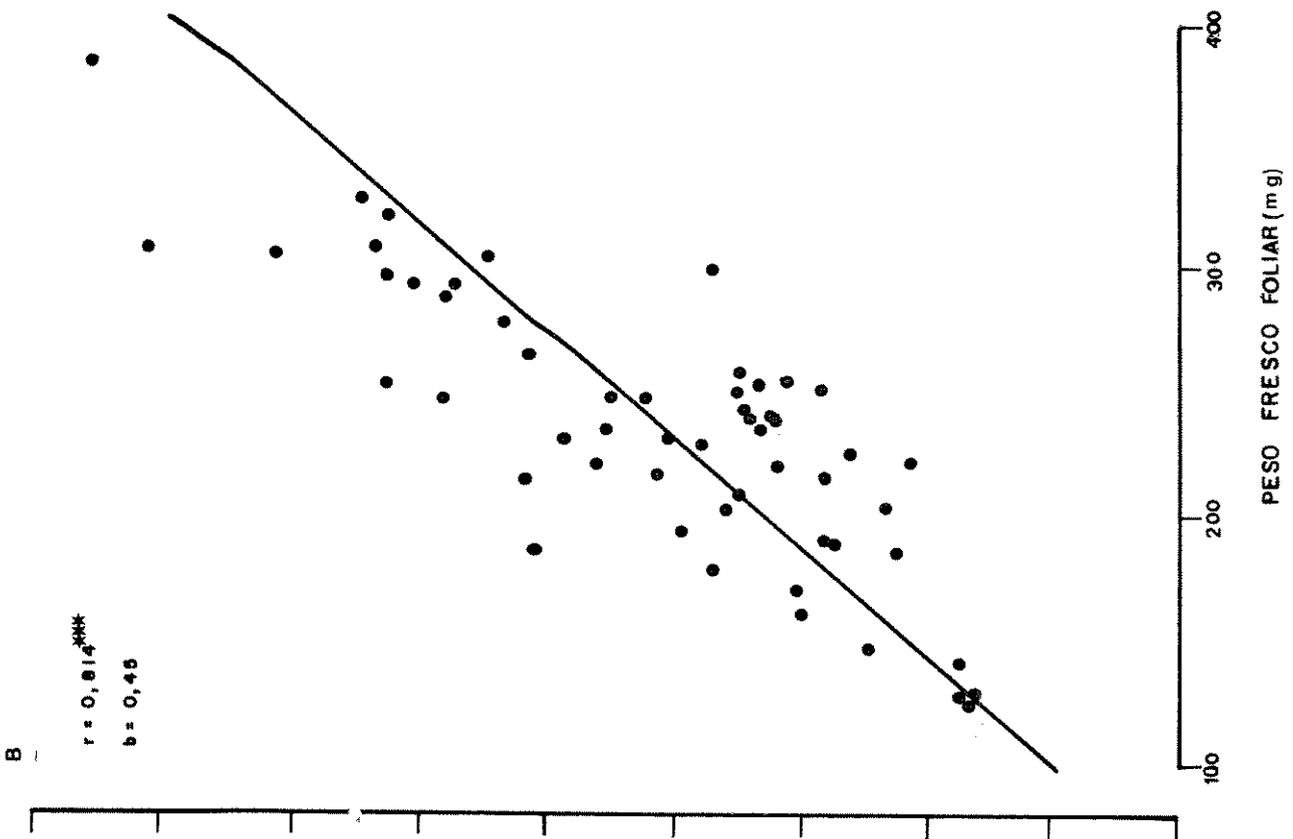
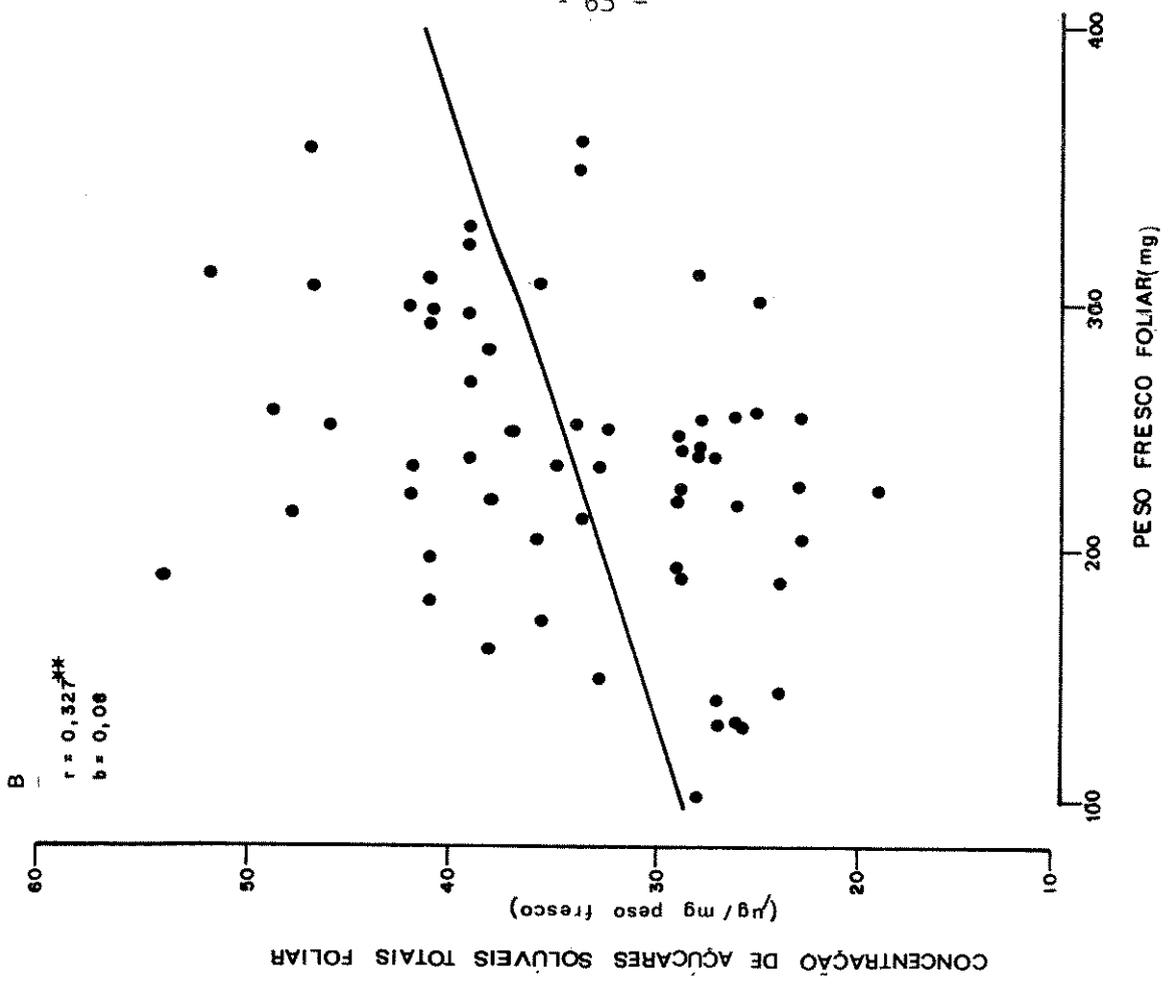


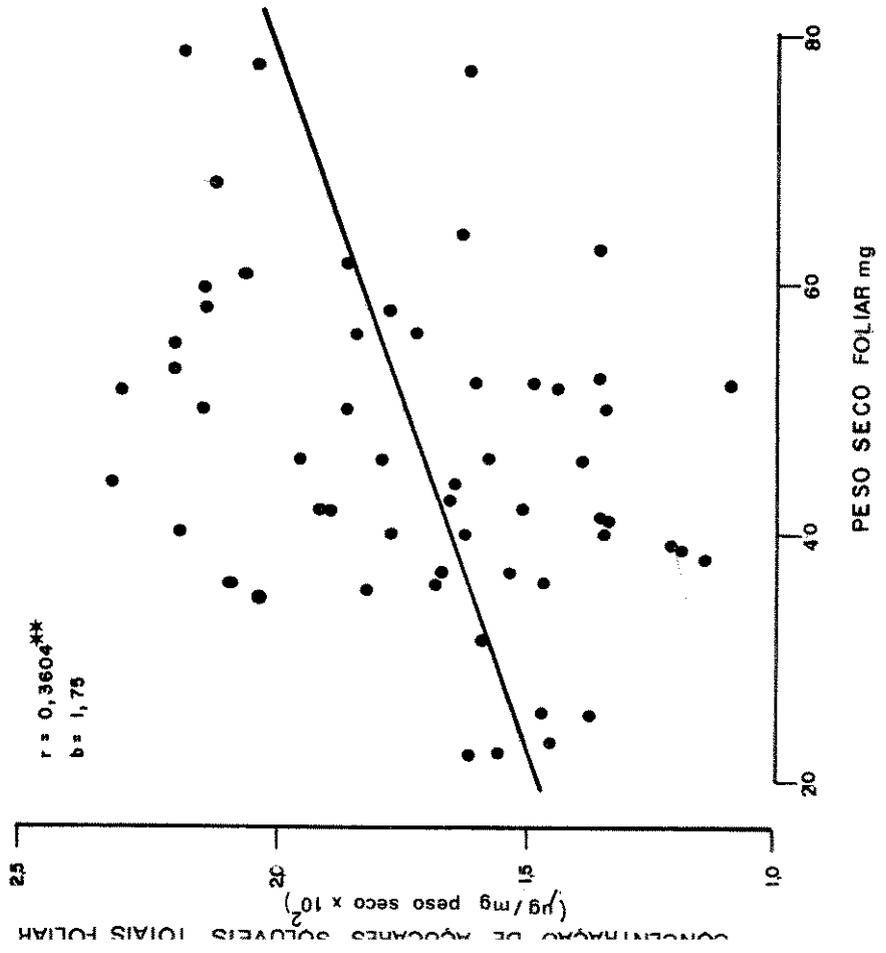
Figura 18. A.B.

Relação entre concentração de açúcares solúveis totais e peso seco (A) ou peso fresco (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 16 replicatas.

B
 $r = 0,32^{***}$
 $b = 0,08$



A
 $r = 0,360^{***}$
 $b = 1,75$



açúcar aumentou apenas de 20%.

Nas Figuras 19A,B e 20 estão relacionados peso seco, peso fresco e conteúdo de açúcar com área foliar. É possível notar, desta vez, que a correlação entre área e peso fresco (Figura 19A) mostrou-se mais forte ($r = 0,657^{***}$) que a observada entre área e peso seco ($r = 0,416^{**}$) (Figura 19B). Este fato indica que ao aumento em área correspondeu, com maior intensidade, o aumento em peso fresco do que em peso seco, sendo função da expansão celular e do aumento em volume da célula, devido à entrada de água. Assim é que aumentando o peso fresco em 100% a área foliar aumentou de 78%.

A relação entre área foliar e conteúdo de açúcar (Figura 20) indica que folhas de áreas maiores possuíram níveis absolutos de açúcares solúveis totais mais altos. Se, como foi discutido, peso seco, peso fresco e conteúdo de açúcares solúveis totais correlacionaram-se fortemente, e que área correlacionou-se mais intensamente com peso fresco do que com peso seco, provavelmente não deveria haver forte correlação entre concentração de açúcar e área foliar, ou seja, folhas de áreas diferentes apresentariam a mesma concentração de açúcar no tecido. O valor do coeficiente de correlação não foi estatisticamente significativo para a relação entre área e concentração de açúcar, o que confirma a proposição anterior, indicando, portanto, ausência de correlação entre tais parâmetros.

Concluindo, pode ser dito que a secagem não afetou o conteúdo de açúcares solúveis totais, que este aumentou fortemente com o aumento em peso fresco, peso seco e área foliar, e que folhas maiores, em termos de peso, tenderam a ter, relativamente, concentrações mais altas de açúcares.

3.3.b. Relação entre Proteína e Açúcares Solúveis Totais

Figura 19, A.B.

Relação entre área e peso fresco (A) ou peso seco (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais.

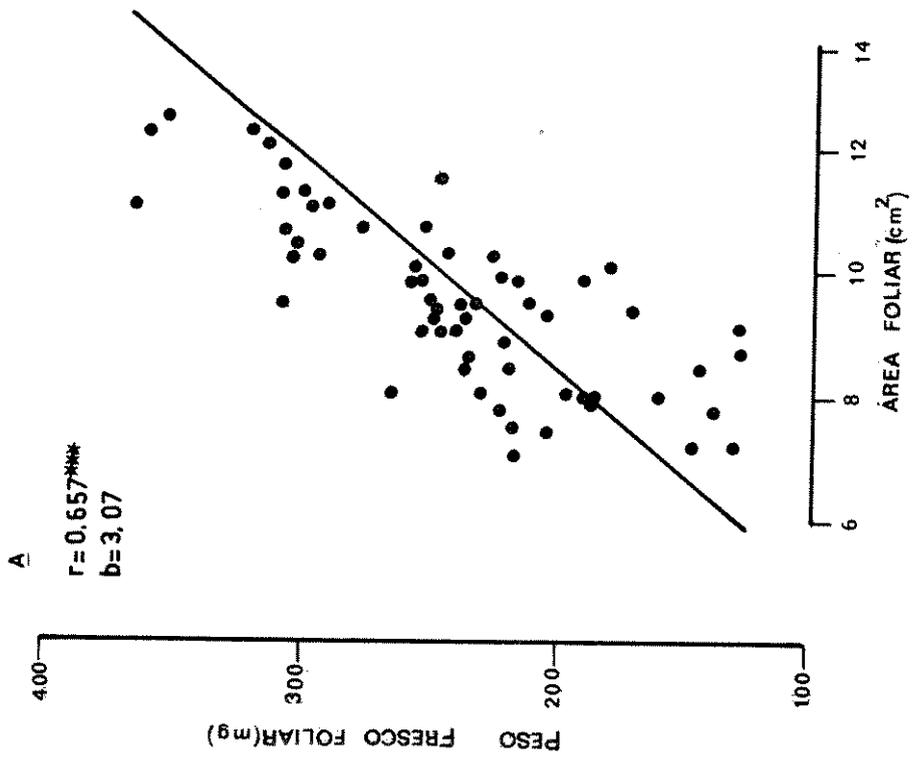
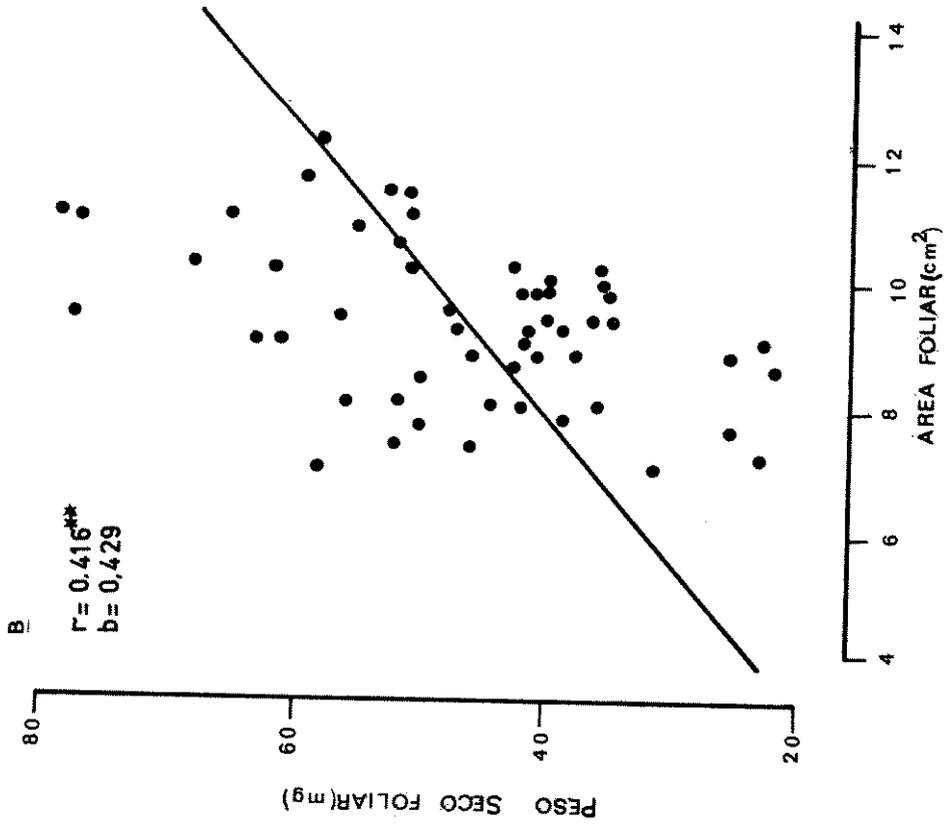
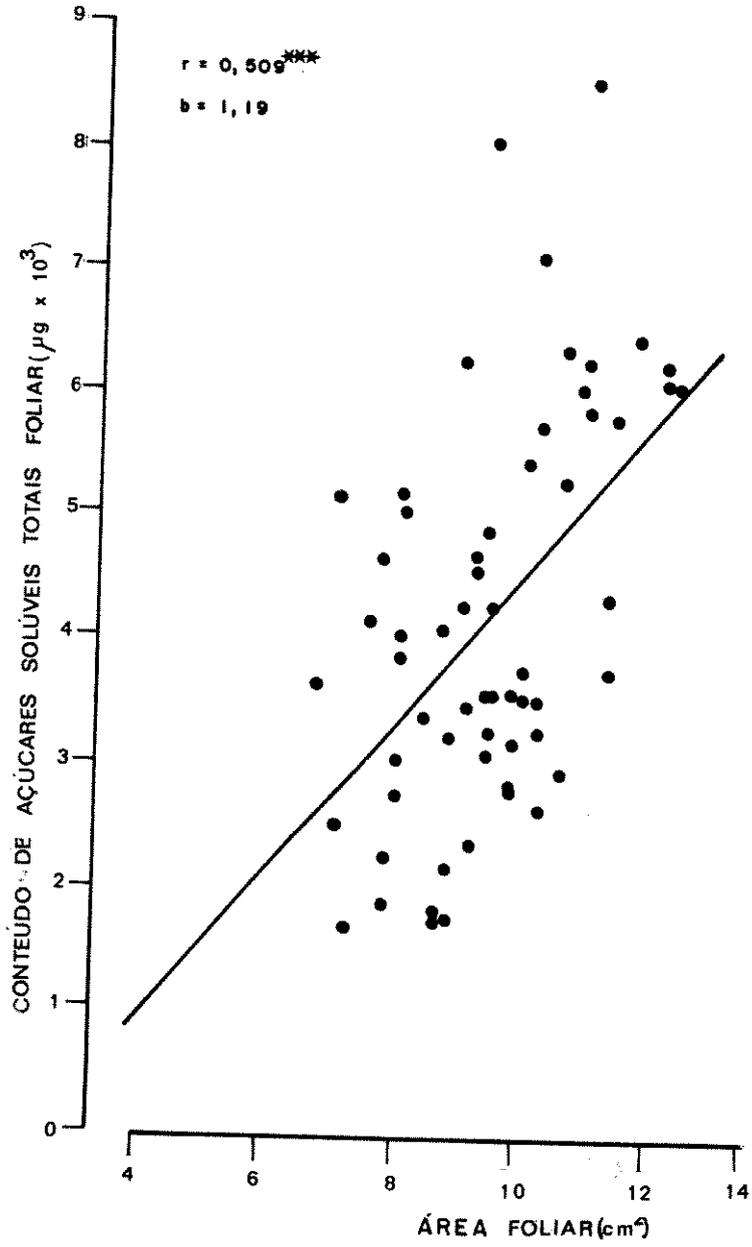


Figura 20.

Relação entre conteúdo de açúcares solúveis totais e área de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 16 replicatas.



Uma vez estabelecido que a secagem não afetou o nível de açúcares solúveis totais, utilizou-se, nestes experimentos, metade seca da folha, para dosagem de açúcar e metade fresca para dosagem de proteína, no sentido de se analisar a relação entre estes dois importantes componentes celulares.

Na Tabela lo estão os dados de peso fresco, peso seco, área, conteúdo proteico, conteúdo de açúcares solúveis totais, para 30 folhas analisadas. Foram escolhidas folhas de tamanhos variados para o melhor estudo das relações abaixo.

A Figura 21A,B relaciona peso fresco e peso seco com área. Observa-se que a correlação entre peso fresco e área foliar (Figura 21A) foi, novamente, fortemente positiva e mais acentuada ($r = 0,90^{***}$) do que a verificada entre peso seco e área (Figura 21A) ($r = 0,72^{***}$).

A análise dos açúcares estabeleceu mais uma vez que o conteúdo absoluto aumentou com os pesos fresco e seco das folhas e que foi mais fortemente correlacionado com peso seco (Figura 21C). A porcentagem dos açúcares solúveis totais em relação ao peso seco variou entre 16% e 19%, o que confirmou os resultados dos experimentos anteriores. A concentração de açúcar em termos de peso seco mostrou, de novo, fraca tendência de aumentar, sugerindo que folhas maiores possuíram, relativamente, maiores níveis de açúcares. A concentração de açúcar em termos de área e peso fresco, entretanto, tendeu a diminuir indicando, que talvez as células, em folhas maiores tivessem volumes também maiores, sendo a razão parede citoplasma menor que em folhas pequenas (Figura 22A,B).

Com os valores da análise de proteína foi possível elaborar os gráficos da Figura 23A,B,C, pelos quais verifica-se que

Tabela 10

Valores de peso fresco (PS), peso seco (PS), área, conteúdo proteico e de açúcares solúveis totais de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 8 replicatas.

folha	PF (mg)	PS (mg)	área (cm ²)	proteína (µg)	açúcares totais (µg)
1	50	18,0	4,0	1989	-
2	100	30,0	6,0	2509	3960
3	70	25,0	5,3	3363	5130
4	140	38,0	7,4	4659	7470
5	160	45,0	8,0	7160	9855
6	140	34,0	8,0	-	7695
7	110	26,0	6,7	4766	4140
8	80	24,0	5,4	3228	3735
9	120	32,0	8,0	3194	6750
10	100	30,0	6,7	3854	-
11	140	25,0	6,7	-	4437
12	190	26,4	8,0	3648	3114
13	130	25,6	6,0	3862	3627
14	150	29,0	6,7	4528	5520
15	130	26,8	6,0	3622	4050
16	100	24,6	4,0	2504	5879
17	280	45,0	12,0	7904	10044
18	170	29,2	9,3	5580	3450
19	130	33,0	5,3	4226	8550
20	140	35,0	6,7	-	9450
21	150	26,6	6,7	3008	5220
22	179	33,0	8,9	4902	4944
23	134	25,8	6,7	3800	5715
24	123	19,2	6,3	4142	3105
25	183	29,8	7,8	4940	3450
26	132	26,6	7,6	4080	4025
27	110	21,0	6,8	2584	3450
28	190	38,0	9,2	4384	5635
29	180	31,0	9,5	4584	4255
30	190	33,6	10,4	3424	4370

Figura 21. A,B.

Relação entre área e peso fresco (A) ou peso seco (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais.

Figura 21.C.

Relação entre conteúdo de açúcares solúveis totais e peso seco de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 4 repetições.

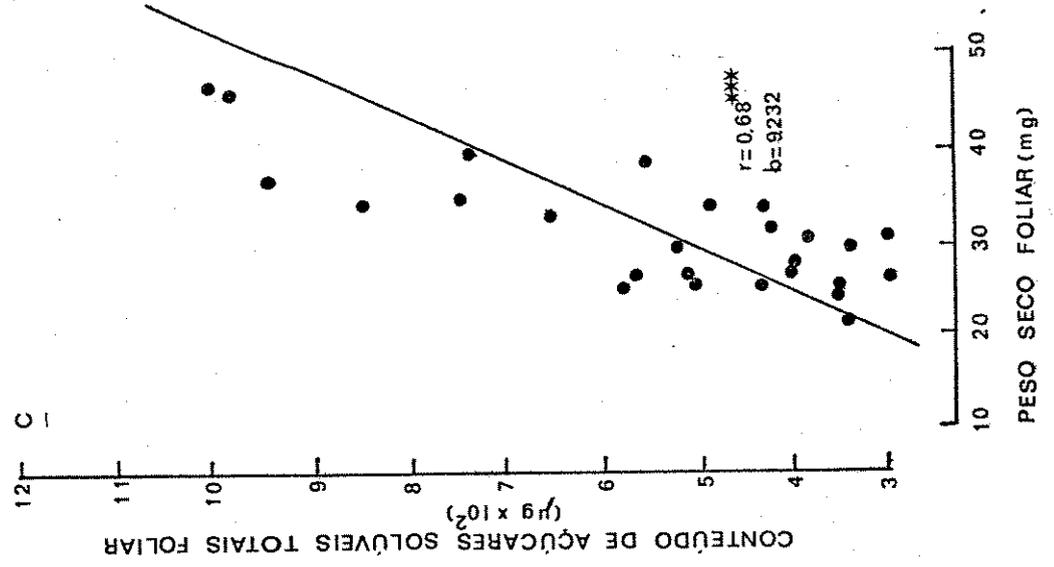
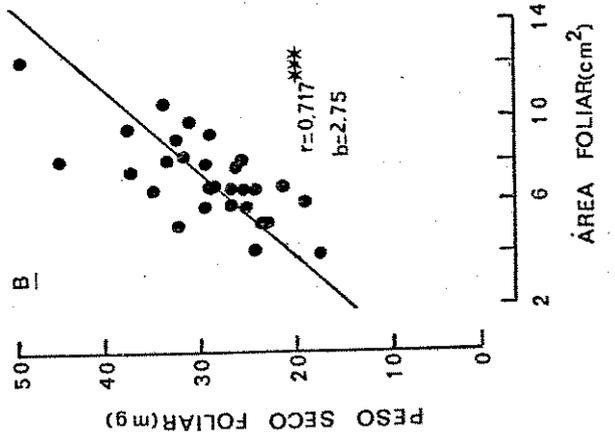
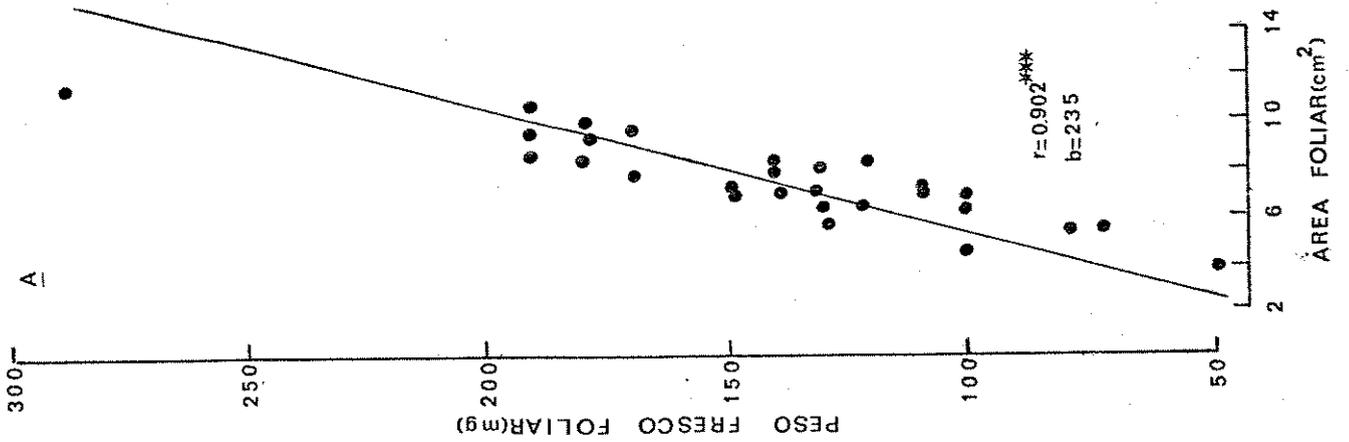


Figura 22. A,B.

Relação entre concentração de açúcares solúveis totais e peso fresco (A) ou área (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 4 replicatas.

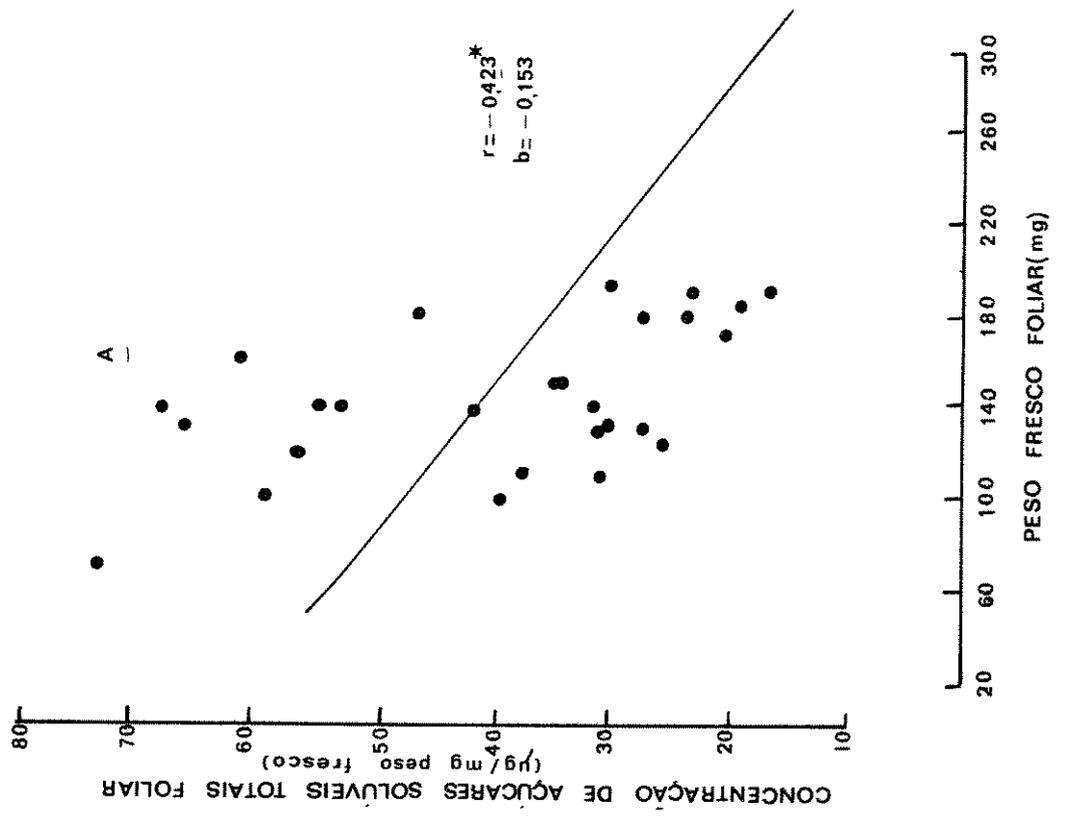
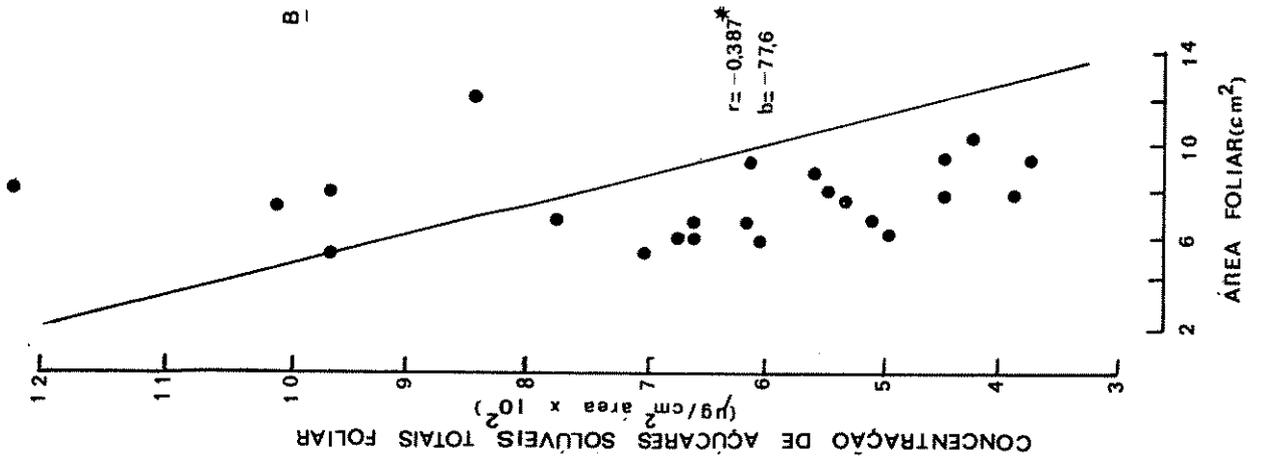
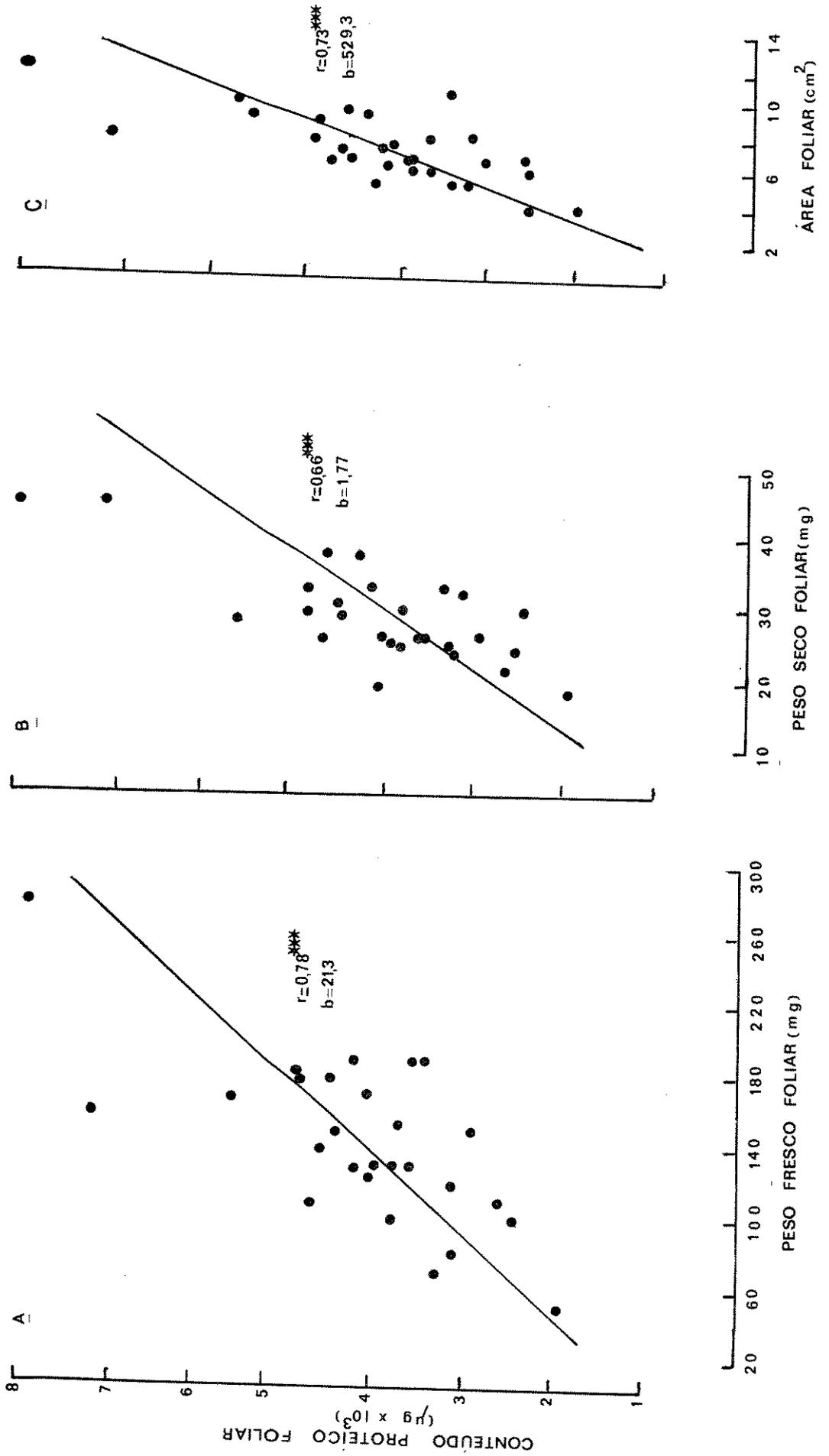


Figura 23. A,B.C.

Relação entre conteúdo proteico e peso fresco (A), peso seco (B) ou área (C) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 4 replicatas.



o nível proteico correlacionou-se positivamente com peso fresco, peso seco e área, aumentando com o tamanho da folha. Nota-se que as folhas analisadas, possuindo de 80 a 200 mg de peso fresco, de 4 a 10 cm² de área e de 20 a 40 mg de peso seco, tiveram de 2 a 5 mg de proteína, o que representa 13% do peso seco.

Como os conteúdos de açúcar e proteína mostraram-se positivamente correlacionados com aumento em peso seco (Figuras 21C e 23B), estes dois primeiros parâmetros deveriam correlacionar-se entre si. Tal correlação foi confirmada ($r = 0,540^{**}$) de modo que ao aumento de 1 µg de proteína correspondeu o aumento menor, de 0,72 µg, em açúcar. Embora em termos absolutos o conteúdo de açúcar fosse maior que o conteúdo proteico, a razão proteína/açúcar aumentou em folhas maiores, o que pode ser visto na Tabela 11. Observa-se que o valor para açúcar foi sempre maior que o correspondente para proteína e como estes parâmetros correlacionaram-se com o aumento em peso seco, da esquerda para direita tem-se aumento em tamanho das folhas. Assim, em folhas menores o nível de açúcar foi relativamente mais alto do que proteína, enquanto que em folhas maiores os níveis se aproximaram e a razão quase alcançou valor 1. Este resultado é esperado pois proteína, embora sofra "turnover", é um componente mais fixo no tecido foliar do que os açúcares solúveis, que além de serem consumidos "in situ" são exportados para outras regiões da planta.

Análises adicionais da concentração de proteína mostraram que, em termos de peso fresco e área, esta diminuiu em folhas maiores (Figura 24). Deste modo, o aumento em área foliar resultou em queda, ao redor de 80 µg/cm², na concentração proteica. Esta queda foi reflexo de que tais parâmetros (área e peso fresco), como visto anteriormente, são medidas de conteúdo de água no tecido. Assim, relativamente, a proteína sofreu "diluição" em folhas maiores, embora aumentasse absolutamente e em termos de peso seco.

Tabela 11

Valores de conteúdo de açúcares solúveis totais de folhas de S. rebaudiana para os quais o nível proteico foi arbitrariamente fixado (2000 a 8000 µg).

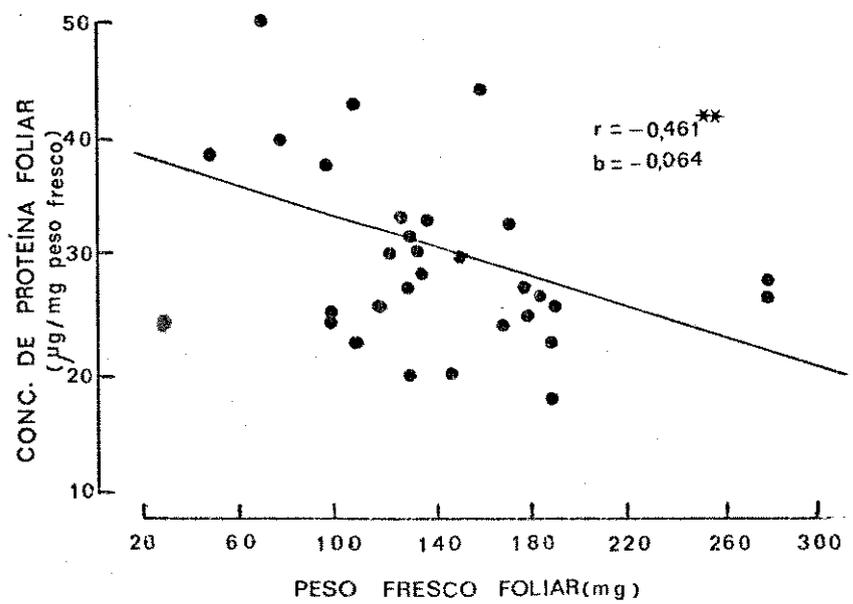
Os valores foram calculados a partir de análise de regressão linear do gráfico de conteúdo proteico em função do conteúdo de açúcares solúveis totais.

Seguem os valores da razão entre proteína (P) e açúcares solúveis totais (A).

<u>PROTEÍNA (µg)</u>	<u>2000</u>	<u>3000</u>	<u>4000</u>	<u>5000</u>	<u>6000</u>	<u>7000</u>	<u>8000</u>
<u>AÇÚCARES (µg)</u>	<u>3400</u>	<u>4241</u>	<u>4840</u>	<u>5640</u>	<u>6418</u>	<u>7120</u>	<u>8120</u>
razão P/A	0,59	0,71	0,83	0,87	0,94	0,98	0,99

Figura 24:

Relação entre concentração proteica e peso fresco de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em condições naturais. Cada valor representa a média de 4 replicatas.



3.3.c. Variação nos Conteúdos de Açúcares Solúveis Totais e Proteína durante a Ontogenia de Folhas de Plantas Crescidas em DL

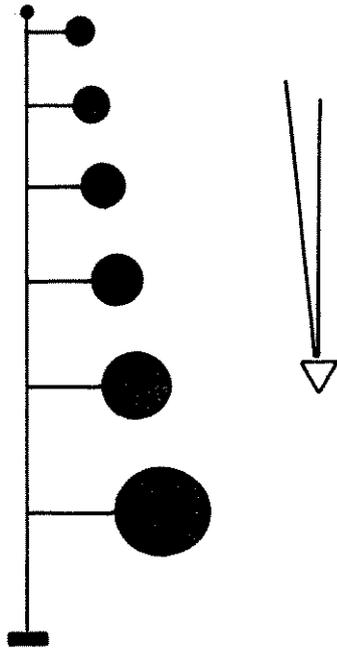
Diante das relações observadas entre açúcares solúveis totais e proteína na folha, tornou-se interessante estudá-las durante o desenvolvimento da mesma.

Ao invés de se montar, para esta finalidade, experimentos utilizando-se grande número de plantas de várias idades, sujeitos a variações tanto entre plantas como entre etapas fisiológicas, decidiu-se aproveitar folhas produzidas no único eixo de plantas crescidas em condições controladas de DL. A vantagem de se utilizar plantas mantidas em DL é que nesta condição fotoperiódica o tempo de aparecimento e taxa de crescimento das folhas foram constantes (v. item 3.2.b.ii e iii de Resultados). Assim, os pares foliares, do ápice para a base da planta, representariam uma série natural de folhas em várias etapas fisiológicas durante a ontogenia. Desta maneira, colhendo-se 7 ou 8 pares foliares, em sequência, no sentido ápice-base, ter-se-ia folhas de idades e tamanhos crescentes. A idade real, portanto, não foi medida nestes experimentos e aumento em área foliar, peso fresco e peso seco representa aumento em idade. Deste modo, nos resultados desta seção, as folhas menores foram as mais jovens, próximas ao ápice e as maiores representaram pares imediatamente abaixo daqueles (Figura 25), fornecendo uma série natural do crescimento e desenvolvimento da folha. Como visto na Figura 13A, em condição de DL foram necessários ao redor de 20 dias para as folhas atingirem o tamanho máximo e portanto, para os dados apresentados abaixo, pode-se assumir que a idade das folhas menores e maiores não ultrapassou este valor.

Os resultados destas investigações são apresentados nos

Figura 25:

Esquema diagramático mostrando as mudanças em tamanho das folhas mais próximas ao ápice. Em condições em que o tempo de aparecimento dos pares foliares é constante tem-se uma série natural durante a ontogenia da folha, que aumenta em área, peso fresco e peso seco no sentido da seta representada.



gráficos das Figuras 26,27,28. A Figura 26A,B,C relaciona peso seco, peso fresco e área foliar durante o crescimento. É aparente que o crescimento da folha pode ser dividido em 2 fases antes da mesma alcançar o tamanho máximo(Figura 26A,C). Na primeira fase o peso seco foliar permaneceu constante, enquanto ambos, peso fresco e área aumentaram. A partir da área foliar de 10 cm^2 (equivalente a 170 mg de peso fresco), entretanto, iniciou-se a segunda fase em que todos os parâmetros observados aumentaram simultaneamente. Estes dados sugerem que o aumento em área, de 3 a 10 cm^2 , na fase inicial pode ser atribuído à expansão através da entrada de água, o que é confirmado pela correlação positiva entre área e peso fresco ($r = 0,98^{***}$). Nesta fase o conteúdo de material seco permaneceu constante, aproximadamente de 25 mg. Durante a segunda fase, embora a absorção de água e a expansão foliar continuassem a aumentar na mesma taxa(Figura 26B), a fixação de carbono in situ tornou-se significativa e desta forma o material seco começou a crescer neste período, duplicando quando o tamanho foliar máximo foi atingido(Figura 26C).

O exame do conteúdo proteico(Figura 27A,B,C) durante o crescimento da folha confirmou as 2 fases do desenvolvimento(Figura 27B,C). Assim, na fase inicial de crescimento o conteúdo proteico permaneceu constante, ao redor de $2\ 000 \text{ } \mu\text{g lamina}^{-1}$, representando 10% do peso seco foliar. Na segunda fase, entretanto, a partir do momento em que a área foliar atingiu aproximadamente 10 cm^2 , o conteúdo proteico elevou-se rapidamente ao valor final de $5\ 000 \text{ } \mu\text{g lamina}^{-1}$, sendo o aumento maior que 200%. É notável que esta síntese proteica acentuada apenas se inicia quando a folha alcança 80% da área final, indicando que o carbono requerido para formação de esqueletos de aminoácidos se originaram, mais provavelmente, da fixação concomitante na folha, depois de uma fase inicial de espera(Figura 27B,C). Assim, taxas máximas de fotossín

Figura 26. A,B,C.

Relação entre peso seco e área (A),
peso fresco e área (B), peso seco e peso
fresco (C) de folhas mais apicais de plan-
tas de S. rebaudiana crescidas em DL.

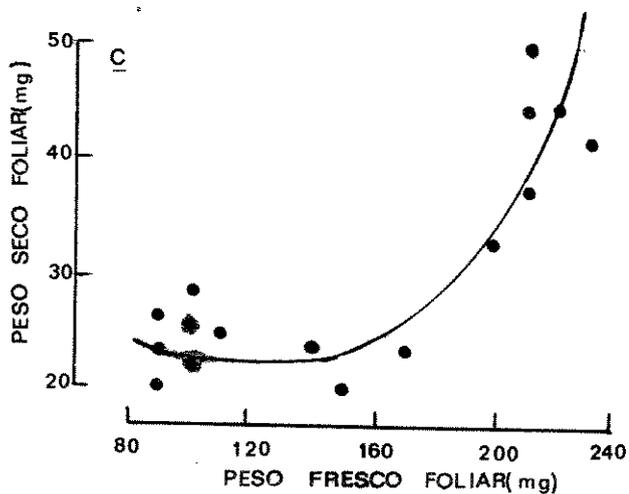
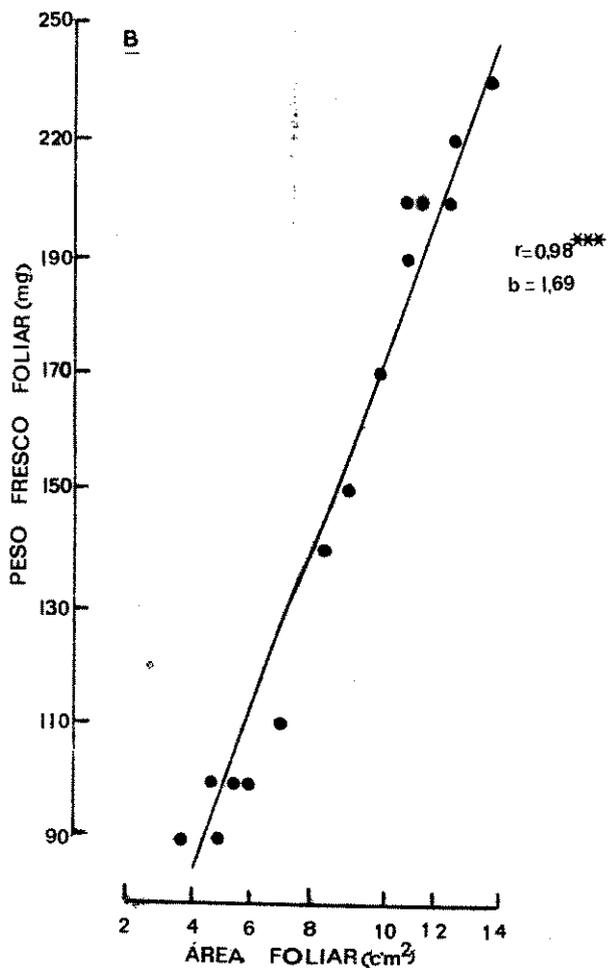
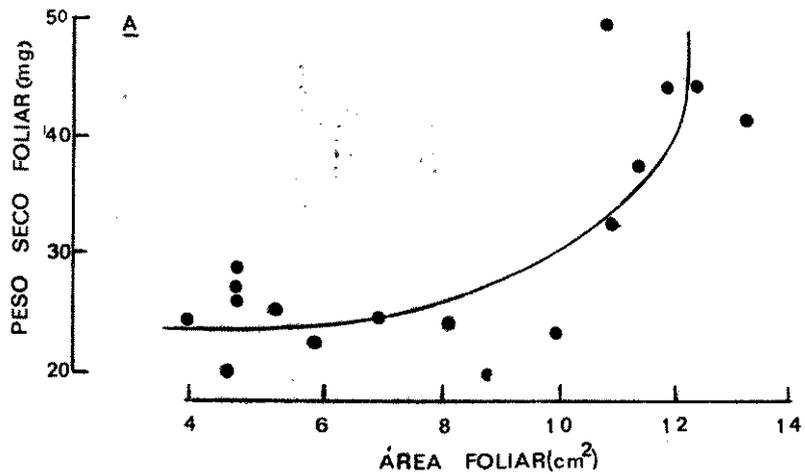
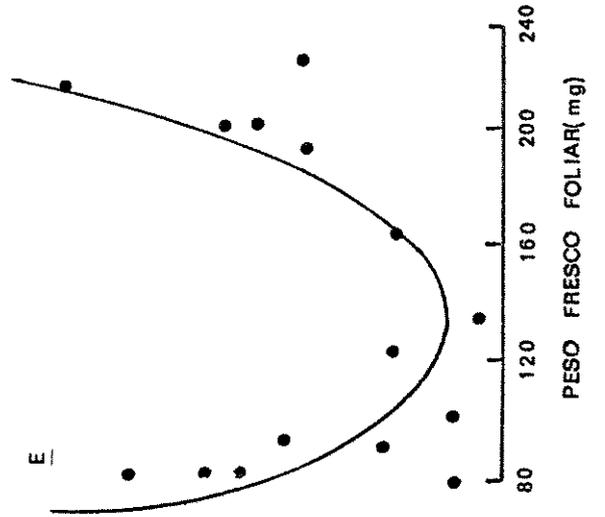
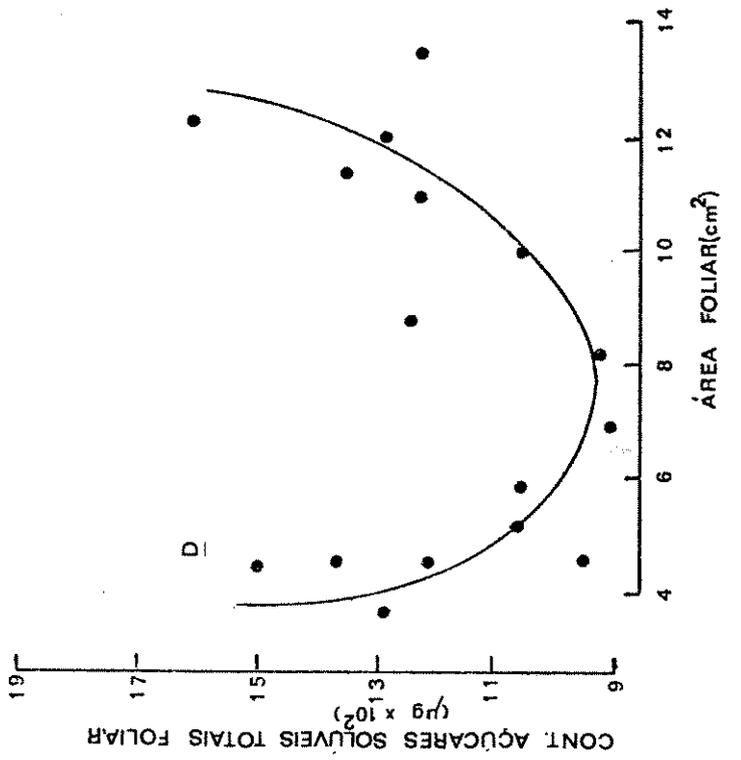
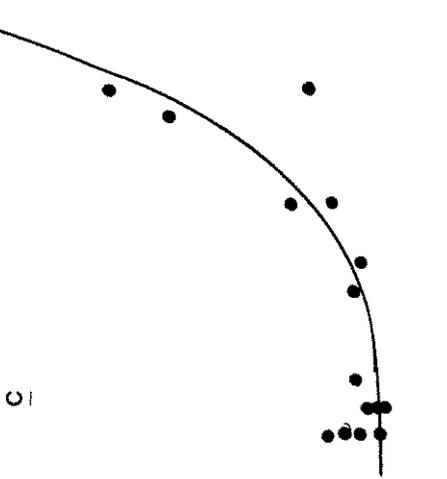
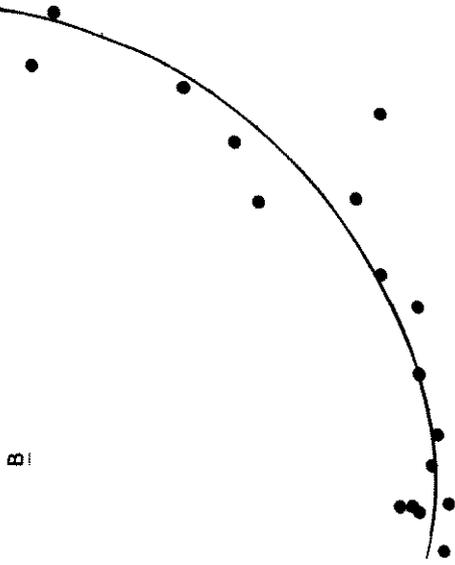
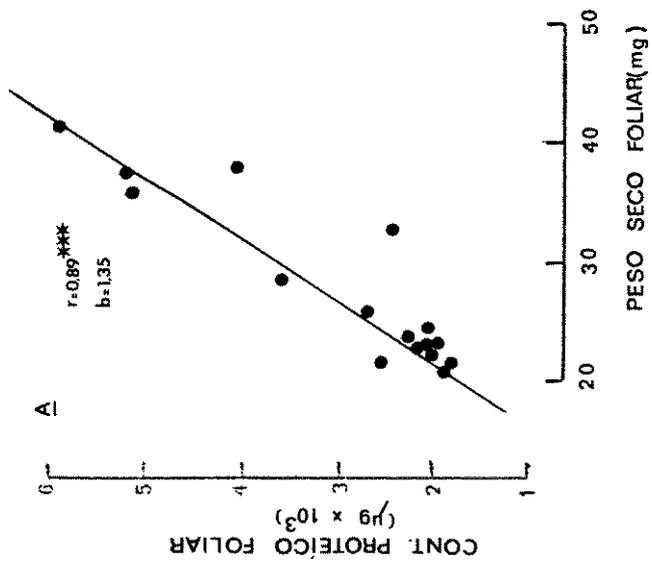


Figura 27. A,B,C,D,E.

Relação entre conteúdo proteico e peso seco (A), área (B) ou peso fresco (C), entre conteúdo de açúcares solúveis totais e área (D) ou peso fresco (E) de folhas mais apicais de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL. Cada valor representa a média de 4 replicatas.



tese podem ser atingidas antes da folha alcançar a máxima área, como verificado por Thaine et al. (1959); Hopkinson(1964), Blenkinsop & Dale(1974), Metivier & Dale(1977), Giaquinta(1978), e a proteína foliar, estando a maioria na forma de RuDP carboxilase(Kawashima & Wildman, 1970; Ellis, 1973) deve ser correlacionada com a fotossíntese líquida, e sua consequência nas folhas mais jovens, material seco. Isto é confirmado pela Figura 27A, em que o aumento em 1 mg no peso seco foliar resultou em aumento correspondente de 120 µg no conteúdo proteico.

A análise dos níveis de açúcares solúveis totais durante o crescimento foliar demonstrou novos padrões de mudanças, até agora não encontrados, como as relações em forma de "U" (Figura 27D,E). Assim, o conteúdo de açúcares livres na folha jovem, resultante da importação das folhas mais velhas, decresceu rapidamente durante a fase inicial de expansão, alcançando apenas 60% do valor original. Na segunda fase, quando a fixação de carbono pela folha aumentou, os níveis de açúcares livres elevaram-se, novamente, até o valor absoluto inicial de 1 500 µg lâmina⁻¹ na folha totalmente expandida.

Estes dados sugerem diferença fundamental nos padrões de mudanças sofridas por açúcares e proteína durante o crescimento foliar. Como a proteína é um componente celular mais estável no tecido jovem, aumentou levemente na fase inicial, porém, na segunda fase correlacionou-se fortemente com o material seco da folha ($r = 0,898^{***}$), no período em que esta se tornava autônoma. O contrário foi verdade para o "pool" de açúcares, componente mais líquido e fonte de energia, que dirigiu a rápida expansão foliar de 3 até 10 cm² e somente recuperou os níveis absolutos anteriores com o alcance do tamanho máximo foliar, quando a fotossíntese atingiu taxas máximas. Tais dados refletem aqueles de Osbun et al., (1964), que demonstraram que folhas jovens consomem altas taxas

de O₂ para a oxidação rápida dos carboidratos importados.

Análises das concentrações relativas de açúcares e proteína em termos de peso seco (Figura 28A) e área (Figura 28B) durante o crescimento foliar provaram ser interessantes. É evidente que durante a segunda fase de crescimento o "pool" de açúcares solúveis totais, expresso em µg/mg ou µg/cm², nunca recuperou a alta concentração inicial, mesmo na folha completamente expandida, permanecendo em nível relativamente baixo no tecido após o declínio na primeira fase de expansão. Assim, acima da área foliar de 10 cm² a produção de fotossintato pela folha pode ser suficiente para satisfazer os requisitos in situ e portanto o excesso de açúcares é então exportado para folhas jovens próximas ao ápice.

Curiosamente as mudanças na concentração proteica revelaram a mesma relação em "U" previamente observada para o conteúdo absoluto de açúcares. Os decréscimos iniciais na concentração proteica refletem o efeito de diluição durante a fase inicial de expansão rápida, antes da intensa síntese proteica in situ. Na segunda fase, entretanto, em contraste aos açúcares, o nível proteico aumentou em termos absolutos e relativos (Figura 28A,B), confirmando a observação anterior de que os destinos de açúcares e proteína em folhas em crescimento são fundamentalmente diferentes.

Estão ainda, novamente representadas, na Figura 28A,B as relações da Figura 26A,B,C, no sentido de facilitar o entendimento dos demais eventos que ocorreram paralelamente às variações nas concentrações de açúcares e proteína durante o crescimento da folha.

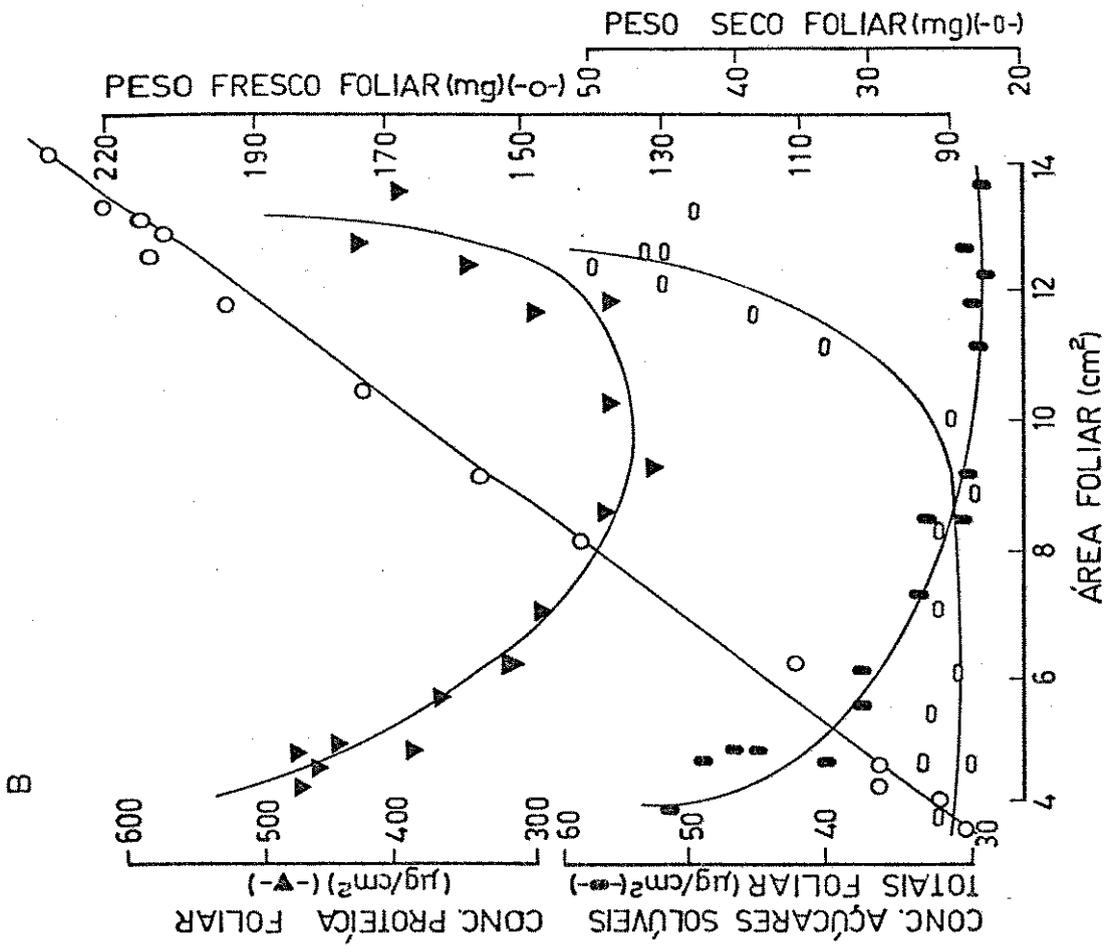
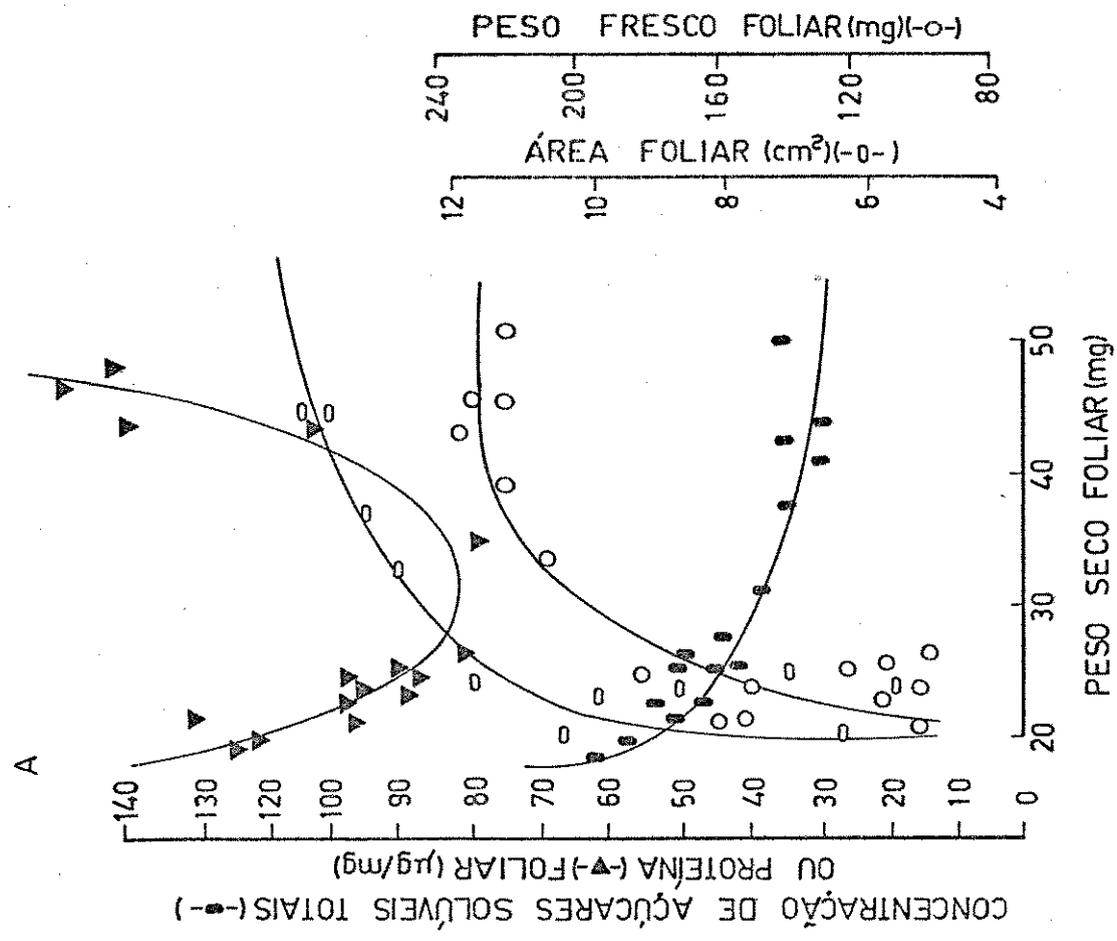
3.3.d. Efeito de Fotoperíodos no Conteúdo de Proteína, Açúcares Solúveis Totais e Esteviosídeo de Folhas.

Foram estabelecidos anteriormente o efeito do fotoperíodo

Figura 28. A,B.

Mudanças nas concentrações de açúcares solúveis totais e proteína em função do peso seco (A) ou área (B) durante a ontogenia de folhas mais apicais de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL.

- 28.A. (■) concentração de açúcares solúveis totais (µg/mg).
(▼) concentração proteica (µg/mg).
(○) área foliar (cm²).
(○) peso fresco foliar (mg).
- 28.B. (■) concentração de açúcares solúveis totais (µg/cm²)
(▼) concentração proteica (µg/cm²)
(○) peso seco foliar (mg).
(○) peso fresco (mg).



sobre o crescimento e morfologia da planta, particularmente das folhas, e as relações entre açúcares totais e proteína nas mesmas, durante o crescimento. A seguir serão considerados os efeitos do fotoperíodo sobre tais parâmetros e esteviosídeo.

i. Conteúdo Proteico de Folhas de Plantas Crescidas em DL e DC.

Os experimentos apresentados nesta seção realizaram-se no sentido de se estabelecer o efeito de condições fotoperiódicas in dutivas (8 horas de luz diária) e não indutivas (16 horas de luz diária) no nível proteico de folhas. Foram utilizadas folhas de mesmo tamanho, em termos de área, na tentativa de se eliminar uma variável para melhor estudo do próprio efeito do fotoperíodo.

Os resultados das análises de proteína, peso seco e área foliar podem ser vistos na Tabela 12. Todos os parâmetros analisados foram maiores para DL. Assim, em DC o peso seco foi somente 55% daquele observado em DL e o conteúdo proteico menor, apenas 30%.

Os gráficos da Figura 29A,B correlacionam nível proteico com área e peso seco de folhas crescidas em ambas as condições. A correlação entre área e conteúdo proteico (Figura 29A) foi fortemente positiva. Folhas na mesma faixa de área possuíram, em geral, em DL aproximadamente 4 vezes mais proteína do que aquelas em DC. Assim, para 14 cm^2 de área em DL houve 4,1 mg de proteína, enquanto que em DC, 1,1 mg. Nota-se que as inclinações das retas foram diferentes para DL e DC, de tal modo que para o mesmo aumento em área, o aumento em proteína foi relativamente maior em DL. Deste modo, as grandes diferenças já existentes entre folhas mantidas em DL e DC tornaram-se ainda mais altas em folhas de maior tamanho.

Em termos de peso seco observa-se o mesmo tipo de correla-

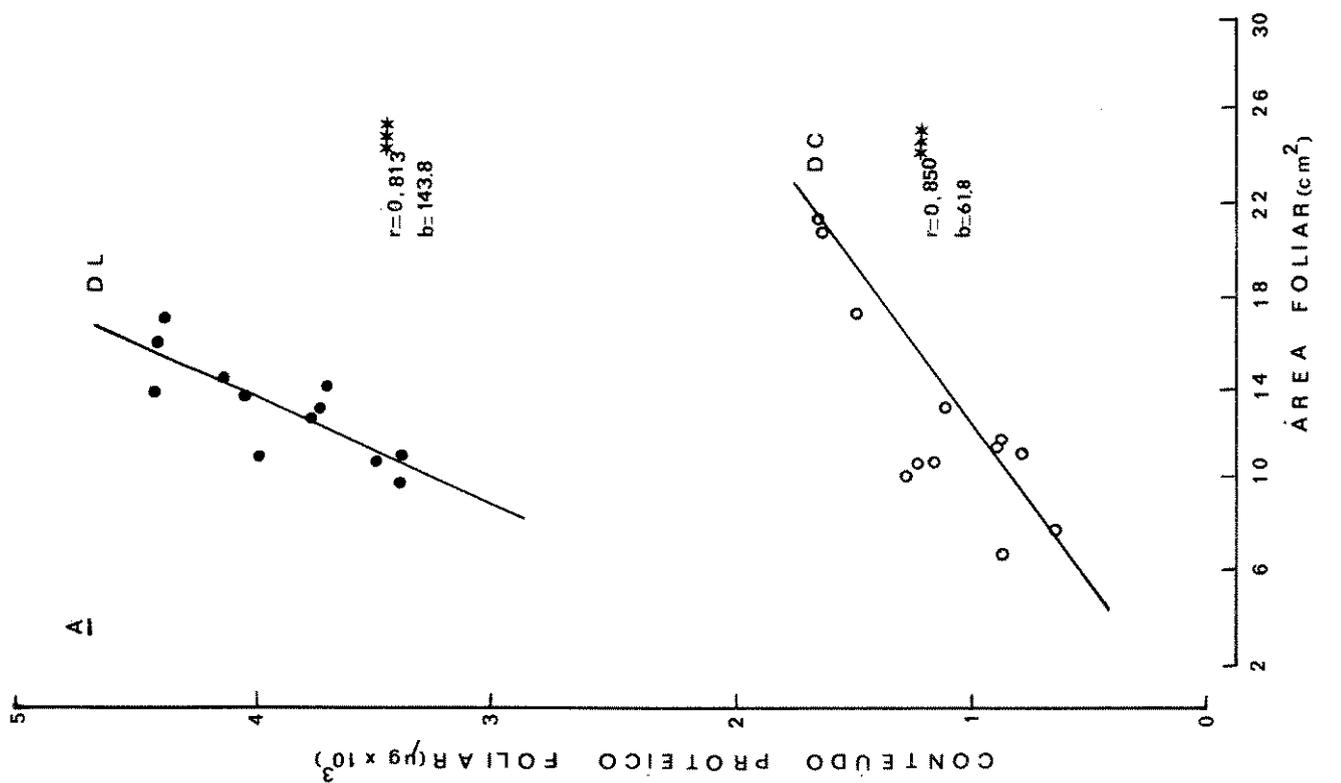
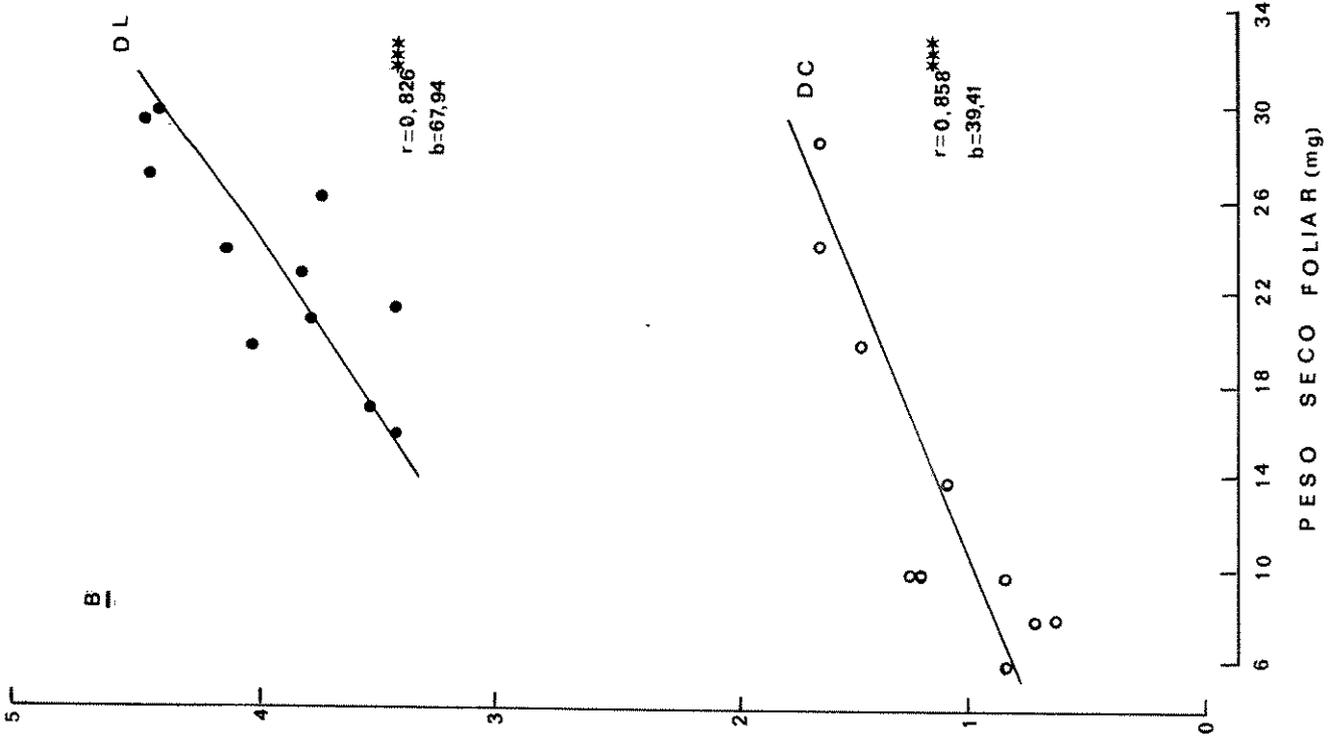
Tabela 12

Valores de peso seco (PS), área e conteúdo proteico de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL e DC. Cada valor para proteína representa a média de 4 replicatas.

folha	DL			DC		
	PS (mg)	área (cm ²)	proteína (µg)	PS (mg)	área (cm ²)	proteína (µg)
1	16,1	9,9	3387	6,0	6,8	862
2	17,2	10,9	3505	8,0	11,0	768
3	19,9	11,5	4008	8,0	7,9	636
4	20,9	13,1	3735	8,4	10,7	1158
5	23,2	12,8	3785	10,0	10,3	1260
6	24,3	13,6	4056	10,0	10,7	1226
7	26,4	14,1	3702	10,0	11,9	878
8	26,5	14,4	4136	10,0	11,5	878
9	27,5	16,0	4402	14,0	13,2	1110
10	29,6	13,7	4416	20,0	17,2	1478
11	30,3	17,3	4373	24,2	20,8	1628
12	21,5	11,1	3387	29,0	21,2	1648
\bar{x}	23,6	13,2	3907	13,1	12,8	1127

Figura 29. A,B.

Relação entre conteúdo proteico e área (A) ou peso seco (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (●) e DC (○). Cada valor representa a média de 4 replicatas.



ção fortemente positiva (Figura 29B) e folhas de peso seco entre 16 e 26 mg. possuíram em DL de 3,4 e 4,1 mg de proteína, e em DC de 1,2 e 1,6 mg, o que representa somente 30% da quantidade observada em DL. A diferença entre as inclinações dos gráficos, neste caso, foi menos pronunciada. Mesmo assim, o aumento em 1 mg no peso seco das folhas em DL resultou em aumento de 68 µg de proteína, enquanto que em DC este valor foi de apenas 39 µg.

A Figura 30A,B correlaciona concentração de proteína em termos de peso seco e área. Observa-se que, novamente, em DL a concentração foi sempre maior que em DC. Assim, folhas em DL possuíram maior conteúdo de proteína, não apenas em termos absolutos, mas também em termos relativos. Por exemplo, embora a área foliar fosse a mesma nos dois tratamentos, a concentração proteica por cm^2 de área em DL foi de 296 µg/ cm^2 , comparada com somente 88 µg/ cm^2 em DC.

Estes dados estabelecem claramente o forte efeito do comprimento do dia no conteúdo proteico de folhas.

ii. Nível de Esteviosídeo e de Açúcares Solúveis Totais de Folhas de Plantas Crescidas em DL e DC.

Os experimentos desta seção final objetivaram verificar o efeito de condições de DL e DC nos níveis de açúcares solúveis totais e esteviosídeo de folhas.

Foram analisadas quanto ao peso seco, área, açúcares solúveis totais e esteviosídeo, 50 folhas de plantas mantidas em DL ou DC. A Tabela 13 mostra os resultados destas análises. Verifica-se que, em geral, plantas mantidas em DL possuíram folhas maiores, tanto em termos de peso seco como de área, do que aquelas em DC. Em termos de peso seco as folhas em DC alcançaram apenas 40% daquele observado em DL, confirmando os resultados obtidos ante-

Figura 30. A,B.

Relação entre concentração proteíca e peso seco (A) ou área (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (●) e DC (○). Cada valor representa a média de 4 replicatas.

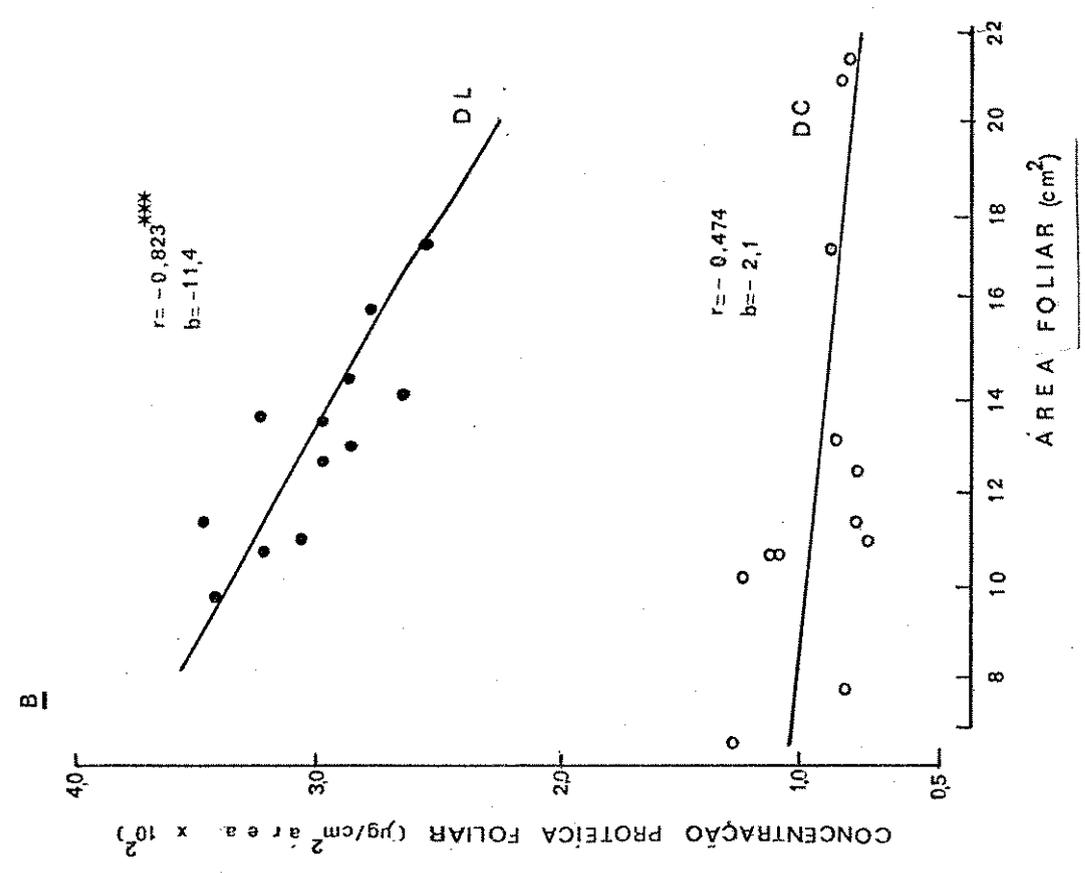
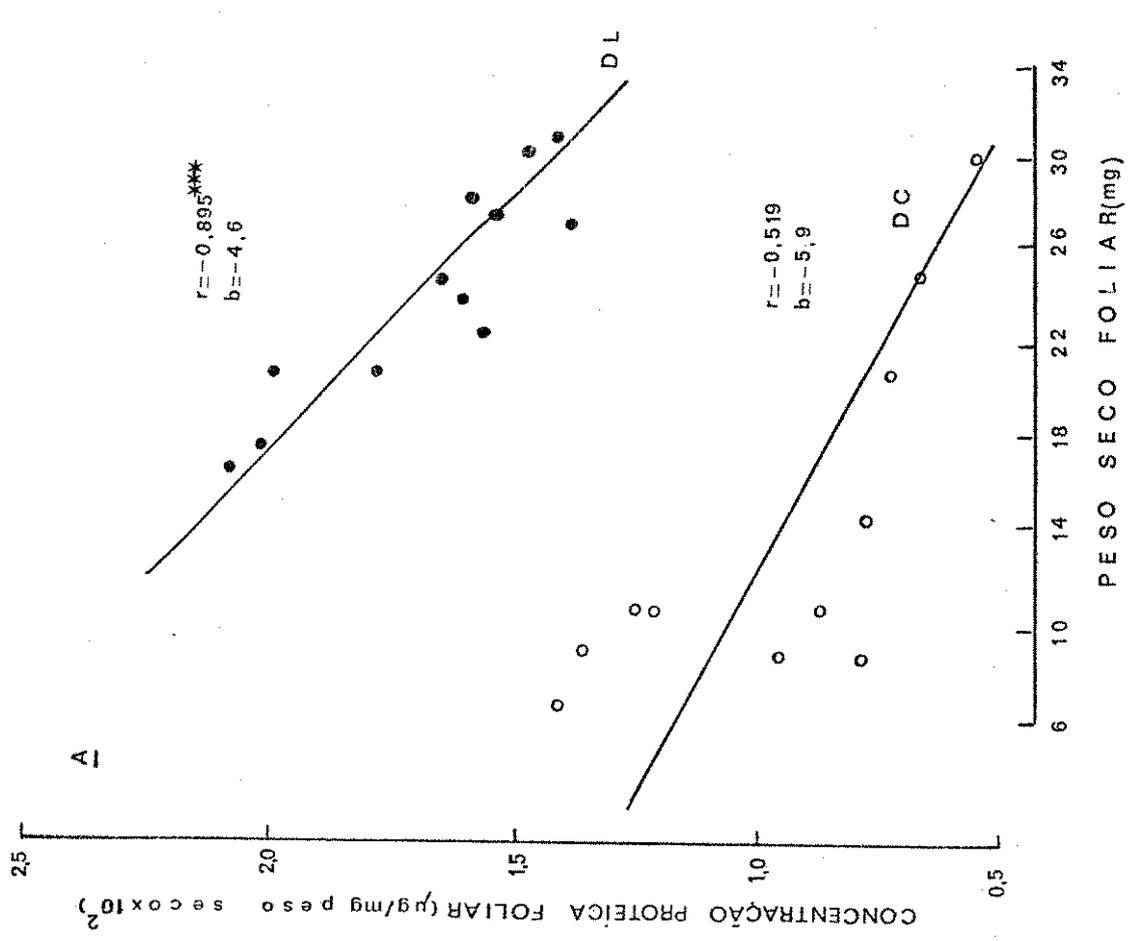


Tabela 13

Valores de peso seco, área, conteúdo de açúcares solúveis totais e de esteviosídeo de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL e DC. Cada valor para açúcares solúveis totais e esteviosídeo representa a média de 4 replicatas.

folha	peso seco (mg)		área (cm ²)		açúcares totais (µg)		esteviosídeo (µg)	
	DL	DC	DL	DC	DL	DC	DL	DC
1	31,0	24,6	10,2	11,9	5175	2430	2885	432
2	15,6	8,3	8,1	6,0	3825	1700	2146	443
3	18,6	17,9	10,7	9,2	4545	4365	1309	850
4	23,0	13,1	11,9	5,8	3195	2700	702	850
5	24,1	9,8	8,5	8,7	5130	1170	1471	608
6	15,1	8,5	9,0	5,4	2970	855	1688	473
7	26,2	11,4	13,7	8,9	2790	1035	1688	608
8	23,9	13,7	10,0	10,1	4365	3285	1181	1350
9	21,5	8,6	7,7	3,7	2925	855	1890	304
10	20,5	7,0	13,2	5,1	3060	968	2363	304
11	47,1	12,9	17,3	6,7	7920	1755	2970	708
12	39,4	7,4	13,4	5,9	6330	652	2025	135
13	34,0	12,4	8,7	8,1	5760	1170	2227	203
14	26,2	7,6	7,3	3,6	5310	923	1282	205
15	37,6	11,3	11,7	8,1	7650	1125	4320	135
16	24,7	11,1	8,8	8,4	3240	1305	1620	405
17	23,8	16,5	15,8	10,2	3330	2070	1282	270
18	12,8	8,9	7,3	4,4	3780	900	2160	337
19	25,5	21,6	11,3	12,6	3870	1890	1552	472
20	28,9	10,3	10,6	8,1	6750	1192	1012	303
21	36,8	22,2	10,3	15,2	7560	2655	3600	405
22	30,2	14,9	8,5	8,5	6750	1215	1822	236
23	45,5	7,7	16,9	5,8	7740	877	3780	101
24	37,4	14,5	12,0	10,5	7470	1328	2362	605
25	36,8	7,7	10,5	3,6	5490	968	1688	608
\bar{x}	= 28,2	12,4	10,9	7,8	5078	1576	2041	454
F	= 57,8 ^{***}		14,8 ^{***}		77,5 ^{***}		72,5 ^{***}	

riormente durante o estudo de proteína. As diferenças em área foram menos marcantes do que em peso seco, embora a área foliar em DC fosse 30% menor.

O conteúdo absoluto de açúcares solúveis foi 3,5 vezes maior em folhas em DL, diferença esta que pela análise de variância foi altamente significativa ($F = 77,5^{***}$). Embora o peso seco fosse acentuadamente maior em DL do que em DC, o conteúdo relativo dos açúcares em DL permaneceu significativamente maior ($F = 329^{***}$), quando expresso em termos de concentração ($\mu\text{g}/\text{mg}$), e folhas mantidas em DC sofreram queda de 25% no nível destes açúcares. Em termos de área esta queda foi ainda mais marcante, com as folhas em DL apresentando $466 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, comparado com somente $201 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em DC, que representa concentração menor que a metade daquela em DL. Assim, a concentração de açúcares, tanto em termos de material seco como de área, não foi simplesmente maior em DL por causa do aumento em tamanho da folha, mas sim uma própria consequência do comprimento do dia.

Estas diferenças acentuadas encontradas nos níveis de açúcares solúveis totais foram ainda mais evidentes para o esteviosídeo, que está incluído entre tais açúcares já analisados. Assim, em termos absolutos, folhas em DC apresentaram ao redor de $400 \mu\text{g}$ de esteviosídeo comparado com quantidade maior que $2000 \mu\text{g}$, em DL, ou seja, valor 5 vezes superior e altamente significativo. Do mesmo modo, em termos de concentração, esta diferença permaneceu: considerando-se peso seco ($\mu\text{g}/\text{mg}$) as folhas em DL apresentaram valor duas vezes maior ($72 \mu\text{g}/\text{mg}$), enquanto que em termos de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a concentração superou em 3 vezes aquela de folhas em DC ($187 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Um fato interessante foi que além dos níveis de açúcares solúveis totais e esteviosídeo terem sido marcadamente diferentes em ambas as condições, a própria proporção do esteviosídeo nos

açúcares solúveis totais foi maior em regime de 16 horas de luz diária. Verifica-se (Tabela 13) que o esteviosídeo, em termos absolutos, ocupou 40,2% dos açúcares totais em DL e em DC somente 28,8%. Esta diferença significativa ($F = 4,3^*$) sugere que o comprimento do dia, além de alterar os níveis absolutos de esteviosídeo, alterou também os caminhos biossintéticos, favorecendo a produção proporcionalmente maior deste composto em relação aos demais açúcares.

Sabendo-se o peso e o conteúdo de açúcares solúveis totais e esteviosídeo de folhas mantidas em DL e DC, informações adicionais podem ser deduzidas. Conhecendo-se a concentração de esteviosídeo em DL e em DC infere-se que em larga escala a produção será, respectivamente, de 72 e 36 g/kg de tecido foliar seco.

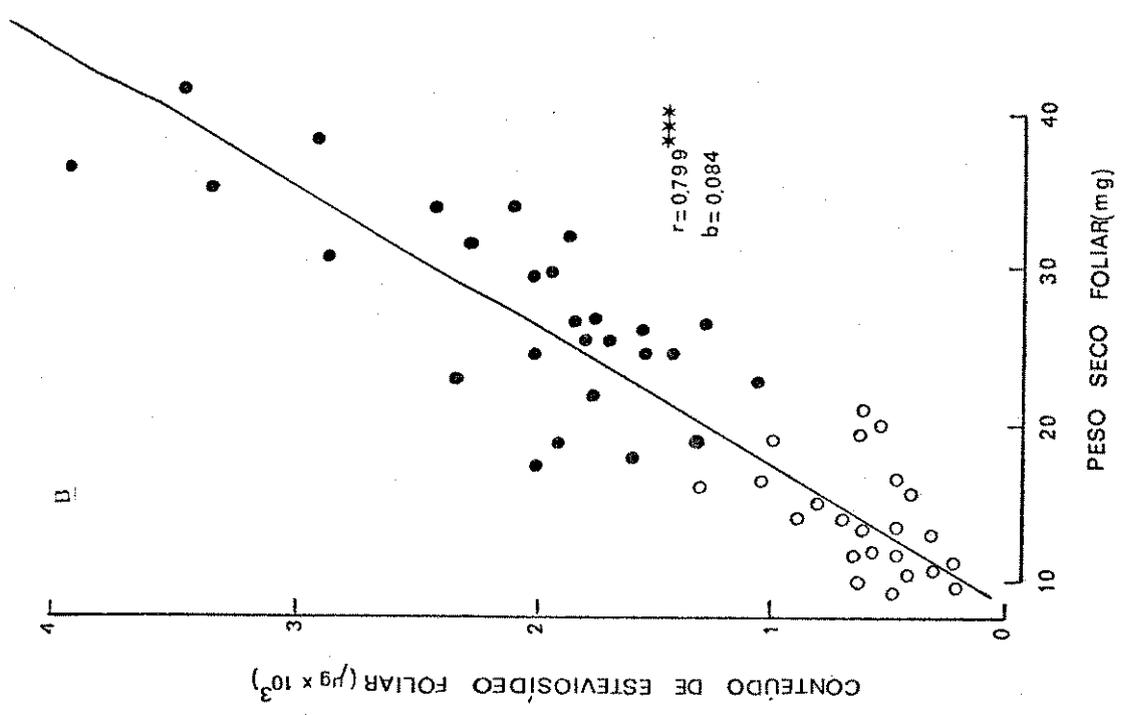
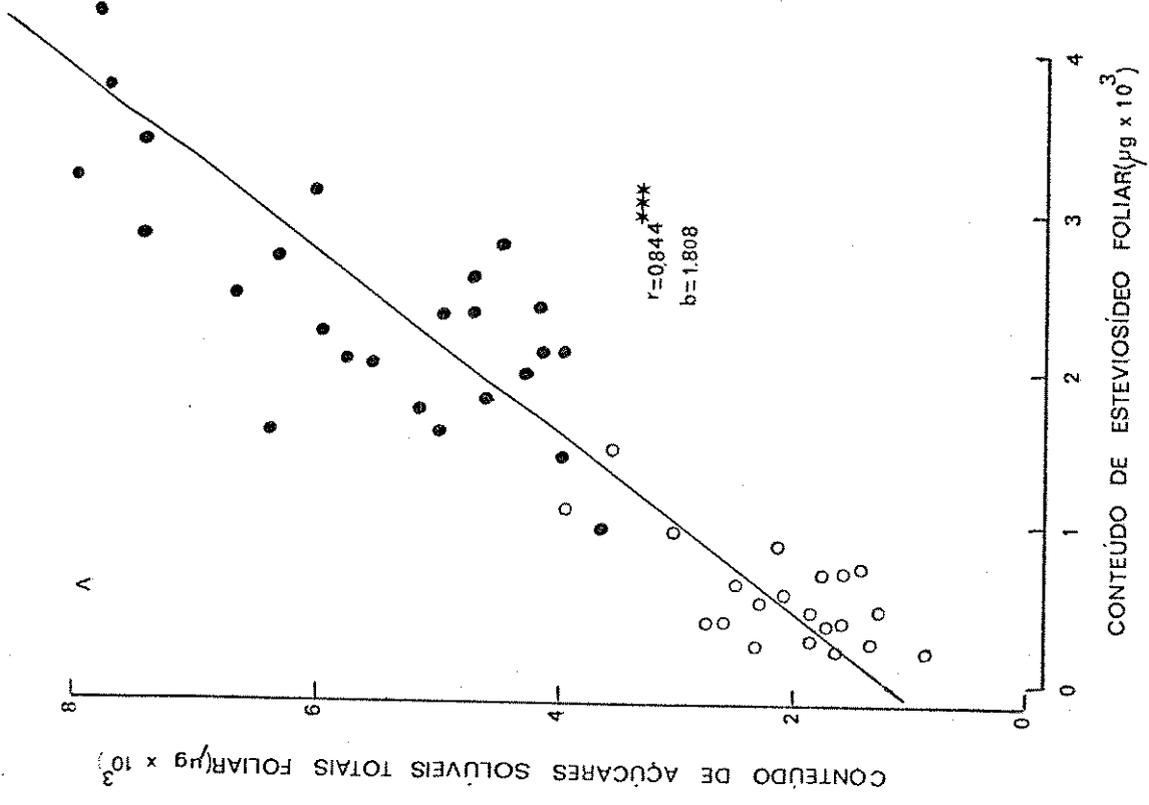
Em adição, o fato de DL mudarem os caminhos biossintéticos para produção relativamente maior de esteviosídeo pode ser quantificado: em DL, para cada μg de açúcares produzidos pela folha, 0,40 μg corresponderam ao esteviosídeo, e em DC, 0,29 μg . Como a molécula de esteviosídeo é um diterpeno, o esteviol (P.M. 316,44), acoplado a 3 moléculas de glicose (P.M. 488,46), em 1 μg de esteviosídeo, 0,607 μg corresponderam à porção glicosídica e 0,393 μg , ao terpenóide. Assim, no caso de DL, em 0,40 μg de esteviosídeo produzido por μg de açúcares, 0,24 μg foram glicose, enquanto que o restante, 0,16 μg representaram a aglicona esteviol. Em DC, 0,29 μg de esteviosídeo produzido distribuíram-se entre 0,18 μg de glicose e 0,11 μg de esteviol. Estes dados estabelecem que o fotoperíodo influi na síntese de terpenóide. Deste modo, a produção de esteviol foi 45% maior em DL, sendo de 0,16 μg de esteviol/ μg de açúcar, comparado com 0,11 μg de esteviol/ μg de açúcar em DC.

Além de ter havido clara relação entre a proporção de esteviosídeo produzido e o fotoperíodo, houve também interação com o

peso seco da folha, que deve ser considerada. A Figura 31B mostra a relação entre esteviosídeo e peso seco, independente do fotoperíodo. Verifica-se que os dados para as folhas em DL e DC formam duas populações distintas, pelo fato do fotoperíodo mais longo propiciar maior fixação de carbono, o que implicou tanto no aumento do material seco da folha como no nível de esteviosídeo. Como as medidas de esteviosídeo e açúcares totais foram pares de dados para a mesma folha, a relação entre estes dois parâmetros pode ser estabelecida da maneira ilustrada na Figura 31A. Observa-se, novamente, a presença de duas populações distintas para DL e DC, e nota-se pela inclinação da reta que, embora houvesse correlação positiva e ambos os parâmetros aumentassem juntos, o aumento relativo de esteviosídeo foi maior do que o de açúcares, por exemplo, quando o conteúdo de esteviosídeo foi de 600 µg, o de açúcares totais foi de 2100 µg, ou seja, o esteviosídeo ocupou 28% dos açúcares totais. Quando o esteviosídeo aumentou para 3000 µg o aumento correspondente em açúcares foi de apenas 6400 µg. Assim, neste caso, embora ambos aumentassem, o esteviosídeo passou a ocupar 47% dos açúcares solúveis totais, como verificado anteriormente. Concluindo, pode ser dito que existiram interações entre fotoperíodo e conteúdos de açúcares solúveis totais, de esteviosídeo e peso seco. Deste modo, folhas mantidas em DL foram, invariavelmente, maiores em termos de peso seco e também apresentaram proporcionalmente mais esteviosídeo.

Figura 31. A,B.

Relação entre conteúdo de açúcares solúveis totais e esteviosídeo (A), e conteúdo de esteviosídeo e peso seco (B) de folhas de plantas de S. rebaudiana crescidas em DL (●) e DC (○). Cada valor representa a média de 4 replicatas.



4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A detecção de altos níveis de esteviosídeo em plantas de Stevia rebaudiana Bert. por Bridel & Lavieille, em 1931, foi confirmada neste trabalho. A produção de esteviosídeo pelas plantas foi de 72 g/kg de folha seca, em condição de DL e de 36 g/kg, em DC. Em fotoperíodo de 16 horas, portanto, o esteviosídeo ocupou 7,2% do peso seco do tecido foliar enquanto que em regime indutor de 8 horas de luz diária, apenas 3,6%. Este valor para DL aproximou-se daqueles verificados por Bridel & Lavieille(1931,a) em que o esteviosídeo perfaz de 6 a 6,5% do tecido seco.

Aranda, em 1945, concluiu que a produção de folhas de S. rebaudiana é de 1000 kg/ha . Em condição de DL, portanto, esta massa foliar renderia ao redor de 70 kg de esteviosídeo e como esta substância é 300 vezes mais doce que a sacarose, equivaleria a 21.000 kg deste açúcar. Segundo Bridel & Lavieille(1931a), a concentração de esteviosídeo no caule é a metade da encontrada nas folhas e desta maneira conclui-se que a produção teórica poderia passar para aproximadamente 100 kg/ha . Estes valores sugerem que o cultivo de S. rebaudiana para produção comercial de esteviosídeo é viável.

Dois pontos importantes concernentes a estes dados merecem ser questionados: (1) por que S. rebaudiana produz níveis tão altos de esteviosídeo, um produto do metabolismo secundário que parece inútil? (2) por que DL promove a biossíntese relativamente maior de esteviosídeo comparado com DC? A discussão abaixo será uma tentativa de responder estas questões em termos dos dados obtidos neste trabalho e daqueles relevantes citados na literatura.

Os fatos de que: (a) em geral a biossíntese de giberelinas,

que promovem alongamento de caule, é aumentada em DL, (b) o esteviol é um diterpeno tetracíclico semelhante estruturalmente às giberelinas e o esteviosídeo é comparável a um glicosídeo de gibberelina, e (c) o esteviol mostra fraca atividade biológica de substância giberelínica em alguns bioensaios, poderiam levar a pensar que o esteviol e o esteviosídeo tivessem papel hormonal em S. rebaudiana. Este, porém, parece não ser o caso, como será explicado abaixo.

Verificou-se que condição de DL promove o crescimento dos internós e em altura das plantas, acelera o aparecimento dos pares foliares e o crescimento dos mesmos em relação a DC. O fato do crescimento geral aumentar em fotoperíodos mais longos é comum (Vince-Prue, 1975; Stubblebine et al., 1975; Sharma & Nanda, 1976) e esperado desde que o crescimento da planta é função não somente da quantidade total de energia luminosa recebida mas também da ação fotomorfogenética mediada pelo fitocromo. Levando-se em consideração estes fatos parece que o fator fotomorfogenético foi o mais importante, considerando-se certos fenômenos morfológicos evidentes, tipicamente mediados pelo fitocromo, como produção do escapo floral e flores, em DC, e alongamento dos internós, em DL. Tanto o alongamento de internós como a aceleração do aparecimento dos pares foliares observados são típicos de condição de DL. Muitas tem sido as evidências de que nesta condição há maior síntese de giberelinas (Zeevaart, 1964; Baldev & Lang, 1965; Nitsch & Nitsch, 1965b; El-Antably & Wareing, 1966; Radley (1963) in Zeevaart, 1971; Zeevaart, 1971) e que este grupo de hormônios está relacionado com o crescimento dos internós e em altura de várias espécies (Dhopte & Kale, 1976) e com a diminuição do tempo de aparecimento dos pares foliares, como em Xanthium (Maksymowych & Erickson, 1977).

Tem sido verificado que em plantas de DC, como S. rebaudiana

na, quando em condição vegetativa, o nível endógeno de substâncias como giberelinas aumenta e durante a indução floral, diminui. Isto ocorre com Perilla nankinensis (Chailakyan & Lozhnikova (1959, 1960) in Krishnamoorthy, 1975), Pharbitis nil, Chenopodium rubrum (El-Antably & Wareing, 1966; Zeevaart, 1964), Nicotiana tabacum, Plumbago indica (Nitsch & Nitsch, 1965b). As observações destes casos levaram Krishnamoorthy a sugerir que em condição vegetativa o nível de giberelinas nestas plantas seria "supraótimo" em termos de floração. Esta hipótese foi corroborada pelos trabalhos de Zeevaart (1964) e El-Antably & Wareing (1966). Tais autores forneceram inibidores como ABA (ácido abscísico) e Cycocel (CCC, cloreto de 2-cloroetil-trimetil-amônio) que bloqueia diretamente a síntese de giberelinas, à planta de DC Pharbitis nil mantida em condição não indutiva. Verificaram que as plantas tratadas floresceram, o que levou à interpretação de que o resultado foi devido à inibição de altos níveis de giberelinas, normalmente encontrados em DL. Do mesmo modo, em S. rebaudiana, Rocha (1975) verificou que o nível endógeno de substâncias giberelínicas aumenta com o comprimento do dia mais longo, o que faz supor que tamanho maior dos internós em plantas vegetativas e nível endógeno de giberelinas estejam relacionados nesta espécie.

A interpretação do aumento em tamanho das folhas observado em DL é dificultada pelas interações complexas citadas em vários trabalhos, entre a atuação da fotomorfogênese e da quantidade total de luz recebida sobre o tamanho e forma das folhas (Vince-Prue, 1975). A morfologia geral das plantas mantidas em DL, portanto, é comum a outras espécies e não parece estar relacionada com a presença de esteviol e esteviosídeo, no caso de S. rebaudiana. Da mesma forma, o fato de que em DC as plantas jovens tiveram aspecto de plantas em roseta e mais tarde sofreram o desenvolvimento do escapo floral com flores, são fenômenos característicos de mani-

festação da indução floral através da ação do fitocromo. Sabe-se ainda que o fenômeno de desenvolvimento do escapo floral, sendo tipicamente aumento em comprimento de internós, também está relacionado com giberelinas (Zeevaart, 1964; Suge & Rappaport, 1968; Cleland & Zeevaart, 1970).

Em S. rebaudiana, como visto, houve alongamento do caule, tanto em plantas vegetativas como durante a floração, o que sugere que ambos os fenômenos, alongamento e floração são independentes e/ou que giberelinas diferentes estariam envolvidas. Em Bryophyllum crenatum, por exemplo, o GA₈ promove alongamento do caule sem floração, embora GA₃ e GA₄ promovam ambos. Dados semelhantes envolvendo vários tipos de GA também foram obtidos para Myosotis alpestris, Silene armeria, Crepis parviflora e Centaureum minus (Michniewicz & Lang, 1962). Deste modo os resultados apresentados na seção 3.2 referentes ao crescimento marcadamente diferente em DL e DC, não estariam relacionados com a presença de esteviol e esteviosídeo nesta espécie, mas provavelmente seriam efeitos dos próprios hormônios endógenos comuns a todas as plantas.

Além dos efeitos fotomorfogenéticos houve outros que parecem ter sido devidos somente à quantidade total de luz recebida nos dois fotoperíodos. Isto porque o fotoperíodo de 16 horas não foi somente o dobro do de 8 horas, devendo-se considerar que nesta última condição houve 16 horas de escuro comparado com apenas 8 na primeira. Assim, em fotoperíodo de 8 horas o período em que não houve produção líquida e apenas os gastos com a respiração e manutenção do tecido vegetal, perdurou por 16 horas. A maioria dos efeitos influenciados pelo total de luz recebida são mais claramente vistos nos conteúdos de açúcares, proteína e esteviosídeo, discutidos abaixo. Nos experimentos de crescimento, portanto, o fato de folhas de mesma área em DL e DC terem peso seco significativamente maior em DL (Tabela 13) é reflexo da maior fixação de

carbono nesta condição.

Embora o esteviol tenha fraca atividade giberelínica em várias plantas testadas, pesquisas mais recentes estabeleceram que estes resultados não foram devidos à ação do esteviol em si, mas a um de seus produtos de metabolismo, sugerindo novamente que esta substância não possui propriedade hormonal. Mosettig foi quem primeiro sugeriu que como o esteviol tinha estrutura semelhante às giberelinas poderia também ter as mesmas propriedades biológicas. O fato do esteviol possuir ligação etilênica exocíclica (CH_2) necessária para atividade biológica de giberelinas corrobora esta hipótese (Katsumi et al., 1964). Posteriormente vários pesquisadores confirmaram esta suposição: Ruddat et al. (1963), Nitsch & Nitsch (1965a) e Katsumi et al. (1964) mostraram atividade no crescimento de mutantes de milho anão d-5 e an-1; Ogawa (1975) mostrou atividade hidrolítica em endosperma de cevada; Válio e Rocha (1976) mostraram efeito no alongamento de hipocótilo de pepino, de alfaca e crescimento de feijão. Mais tarde, entretanto, surgiram evidências de que o esteviol não agiria diretamente, mas seria convertido, no tecido vegetal, em uma giberelina ativa (Ruddat et al. 1968). Assim, a aplicação de esteviol exógeno a mutantes de milho anão d-1 e d-5 que possuem pouca ou nenhuma giberelina endógena (Phinney, 1961) resultou em aumento do nível de giberelinas extraíveis após o tratamento, confirmando que o esteviol foi convertido em giberelina.

Trabalhos mais recentes utilizando esteviol marcado fornecido ao fungo Gibberella fujikuroi confirmaram que a marcação é transferida para GA_1 , GA_{18} , GA_{19} , GA_{20} (Bearder et al., 1975; Bearder et al., 1976; Hedden et al., 1978). Como tanto estas giberelinas como o esteviol são hidroxilados na posição 13, parece que o esteviol exógeno poderia ser utilizado como precursor de tais giberelinas através de um caminho biossintético alternativo. Normal

mente, outras giberelinas hidroxiladas nesta posição são derivadas do GA₄, que é hidroxilado para GA₁, que por sua vez pode ser convertido em outros tipos de GA deste grupo.

A ocorrência do esteviol não tem sido verificada em outras plantas além de S. rebaudiana. Esta observação é interessante considerando-se os dados sobre a atividade biológica do esteviol em planta superior, obtidos por Válio & Rocha (1976). Tais autores mostraram que enquanto o esteviol tem atividade biológica de gibberelina em alface e pepino, o mesmo não ocorre com a própria S. rebaudiana. Este fato sugere que nesta planta há enzimas capazes de "glicosilar" o esteviol aplicado transformando-o em esteviosídeo, um passo metabólico normal para esta espécie, mas uma opção não aberta às demais. Assim, alface e pepino tratariam o esteviol fornecido exogenamente como derivado do caureno, convertendo-o a uma gibberelina ativa. Outras evidências que suportam esta hipótese originam-se dos estudos químicos de Wood et al., (1955) sobre a estrutura molecular do esteviosídeo. Tais estudos culminaram com a conclusão de que algumas das ligações presentes na molécula de esteviosídeo são extremamente raras na natureza, não sendo hidrolizadas pela α e β -glucosidases, normalmente presentes nas plantas. Deste modo, outras plantas não possuiriam tal sistema enzimático para "glicosilar" o esteviol ou hidrolizar o esteviosídeo.

O ponto de vista de que o esteviol não teria papel hormonal em S. rebaudiana é igualmente defendido por Hedden et al., (1978), que sugerem que este diterpeno poderia não ser precursor de gibberelinas, mas sim um ramo terminal a partir do ácido caurenóico. Uma vez formado, portanto, seria imediatamente convertido em esteviosídeo.

Finalizando, os resultados obtidos por Alves (1975), corroboram esta hipótese. Trabalhando com S. rebaudiana verificou que o nível endógeno de GA₂₀, sugerido também por este autor como pro

duto final do metabolismo do esteviol, é de 1,2 - 2,0 µg/kg de tecido vegetativo fresco. Esta quantidade é insignificante em relação ao nível de esteviosídeo e portanto de esteviol encontrado neste trabalho, 1,4% do peso seco em DC e 2,8% em DL.

Embora não se possa eliminar completamente a possibilidade do esteviol ser precursor de giberelinas ou do esteviosídeo ser uma forma de armazenamento de hormônios em S. rebaudiana, a presença da grande quantidade deste composto na planta torna esta hipótese duvidosa e exige melhor explicação.

Pode-se, portanto, propor outra função para o esteviosídeo em S. rebaudiana, como atuar na proteção desta espécie contra o ataque de herbívoros, provavelmente insetos, por ser tóxico ou repelente em altas concentrações. Evidências obtidas a partir dos dados deste trabalho e que apoiam esta hipótese serão discutidas a seguir.

A evolução das Angiospermas e dos insetos tem ocorrido paralelamente (Ehrlich & Raven, 1964) por longo período e portanto complexas interações existem entre os reinos animal e vegetal. Enquanto que algumas das mais elaboradas interações entre plantas e animais envolvem a atração de polinizadores, como insetos, pássaros e morcegos, atualmente está se tornando cada vez mais aparente que outros mecanismos igualmente elaborados, estão envolvidos no potencial repelente de herbívoros predadores. Em certos casos, a evolução tem ocorrido além da simples defesa da planta: um composto geralmente repelente pode funcionar como atraente para certas espécies de insetos, e em outros casos o inseto pode armazenar o repelente produzido pela planta, tornando-se repelente para seus próprios predadores (Fraenkel, 1959).

Muitos trabalhos recentes estabelecem que substâncias secundárias presentes nas plantas frequentemente em altas concentrações como taninos, fenóis, alcalóides, óleos essenciais (monoterpe

nos) e rãfides, podem conferir a certas partes das plantas sabor desagradãvel, tornando-as repelentes ou tãxicas para o herbívoro. Desta maneira, a sobrevivência e o sucesso da planta pode aumentar através da defesa quãmica (Eisner, 1964; Beck, 1965; Hsaio, 1969; Dethier, 1970; Jones, 1971; Schoonoven, 1972; Cates, 1975; Stubblebine & Langenheim, 1977).

Vãrios autores tãem sugerido que o desenvolvimento de um sistema quãmico de defesa durante a evoluãõ confere maior proteãõ contra os herbívoros, do que o de um sistema fãisico de defesa, como espinhos. Whittaker & Feeny (1971) notaram que a maioria das plantas não possuem mecanismos fãisicos de defesa, mas tem sucesso igual ou maior em relaãõ ãquelas que os possuem, indicando que devem ter um mãtodo alternativo para se defender dos herbívoros. Correlaãões entre a presenãa de compostos quãmicos e aceitaãõ do paladar tem sido demonstradas para todos os principais grupos de animais, incluindo o homem (Levin & York, 1978). Oates et al. (1977) tem mostrado que para o macaco Colobus guereza a aceitaãõ do paladar das folhas correlaciona-se negativamente com a quantidade de taninas procianidinas das mesmas. Relaãões semelhantes tem sido demonstradas para alcalãides de plantas, como Phalaris arundinacea e roedores predatãrios (Kendall & Sherwood, 1975), e de vãrias outras espãcies para gado, carneiro, coelho (Roe & Mottershead, 1962; Marten et al., 1973, Atsatt & O'Dowd, 1976). Assim, Trophis (Moraceae) somente ocorre em densas comunidades em pequenas ilhas onde não hã o predador normal, um roedor (Janzen, 1970).

A discussãõ, entretanto, enfocará apenas os insetos e outros herbívoros, pois nas regiões tropicais e subtropicais, altamente susceptãveis ã herbivoria, este grupo ã o que exerce maior pressãõ de seleãõ sobre as plantas por ser o mais numeroso, tanto em termos de espãcies como de indivãduos (Janzen, 1970; Gershenzon et al., 1978; Levin & York, 1978). Nestas regiões as Angios-

permas perfazem 50% de todo o alimento dos insetos (Fraenkel, 1959) e apenas em condições especiais uma planta desprovida de mecanismos de defesa não é predada. Por esta razão os gêneros tropicais e subtropicais tem evoluído, graças à herbivoria principalmente por insetos, no sentido de conterem, por exemplo, alcalóides foliares mais tóxicos e mais concentrados do que os gêneros temperados, ou de produzirem resinas de paladar desagradável, que desempenham papel na defesa da planta (Langenheim, 1969; Freeland & Janzen, 1974; Stubblebine & Langenheim, 1977; Levin & York, 1978). As observações de Janzen (1973) mostram que nas regiões tropicais as pestes são superiores em desenvolver resistência a pesticidas em relação às regiões temperadas, sugerindo que o "pool" genético de onde derivam as raças resistentes é mais rico nos trópicos. Desta forma é de se esperar que nestas regiões desenvolvam resistência mais facilmente contra produtos naturais.

A maioria dos insetos seleciona o alimento de maneira negativa, geralmente evitando espécies tóxicas ou de paladar desagradável (Fraenkel, 1959; Jermy, 1966). Embora a maioria dos repelentes seja alcalóides, outras substâncias secundárias como fenóis, saponinas, quinonas, taninos, cumarina, glicosídeos cianogênicos e monoterpenos, como os óleos essenciais, podem tornar desagradável o paladar de folhas de várias espécies (Beck, 1965; Hsiao, 1969; Dethier, 1970; Stubblebine & Langenheim, 1977; Rhoades, 1971; Bratstern et al., 1977; Lincoln & Langenheim, 1978; Meinwald et al., 1978; Rice et al., 1978). Estes compostos aumentam o vigor e a sobrevivência das plantas por manter a área foliar máxima e portanto a fotossíntese.

A causa da produção de esteviosídeo ter sido proporcionalmente maior em DL do que em DC pode agora ser discutida. Levin (1976) tem notado que os terpenos são compostos cuja produção pela planta é cara, em termos metabólicos e energéticos, requerendo

grandes quantidades de carbono e ATP (Trifosfato de adenosina). Além disto parece que a síntese é mais ou menos irreversível uma vez que a molécula se torna cíclica e estável (Burbott & Loomis, 1969). Assim, estes compostos exibem pouco "turnover", sendo portanto permanentes na planta, usualmente compartimentalizados em estruturas anatômicas ou vesículas rodeadas por membranas, como vacúolos (Stubblebine et al., 1975). A compartimentalização destes compostos, que os isola do metabolismo normal da célula, poderia ser especialmente relevante no caso de S. rebaudiana, prevendo-se que enzimas hidrolíticas liberariam continuamente do esteviosídeo, o esteviol, que poderia ser tóxico para a planta em altas concentrações. Scora (in Stubblebine & Langenheim, 1977) mostra, por exemplo, que óleos essenciais de Citrus são auto-tóxicos se a compartimentalização for rompida. Na realidade, a ligação de açúcares a moléculas tóxicas para eliminação da toxicidade tornando-as solúvel em água e permitindo a passagem facilmente pelas membranas, para armazenamento, é uma estratégia comum entre as plantas. Em alguns sistemas estudados estes compostos de toxicidade suprimida pela conjugação com açúcares, após a ingestão por um predador podem ser hidrolizados pelas enzimas do sistema digestivo, liberando a toxina, que leva o animal ao vômito ou a morte (Freeland & Janzen, 1974).

Embora a biossíntese de terpenóides seja custosa, estes produtos possuem vantagens em termos de utilização de nutrientes pois suas moléculas são desprovidas de nitrogênio, o oposto dos alcalóides. Stubblebine & Langenheim (1977) apontam como os solos tropicais e subtropicais são geralmente pobres em nutrientes, especialmente nitrogênio. A alta intensidade luminosa nestas regiões, entretanto, implica em situação em que a fotossíntese e portanto carbono são raramente limitantes, desde que a irrigação seja adequada, e por isto favorecem a produção de terpenóides.

Os dados apresentados em Resultados sugerem que fatores genotípicos e ambientais controlam a síntese de esteviosídeo em DL e DC. Em fotoperíodo de 8 horas o carbono fixado impõe limite ao potencial máximo da taxa de crescimento, como visto para o peso seco das folhas (seção 3.2.b.iv). Nesta condição 29% dos açúcares solúveis totais esteve na forma de esteviosídeo¹, um produto aparentemente inútil, presumivelmente devido ao controle efetuado pelo genoma na partição do fotossintato entre esteviosídeo e outros produtos, nesta espécie. Em fotoperíodo de 16 horas, em que o fotossintato total aumenta, a influência ambiental do comprimento do dia tornou-se mais evidente e portanto, o excesso de carbono, além daquele requerido pelo tecido, foi canalizado para a produção de relativamente mais esteviosídeo, que então passou a ocupar 40% dos açúcares totais (Tabela 13, Figura 31A).

As diferenças observadas no conteúdo proteico foliar em DL e DC são também interessantes, neste sentido, e esclarecem o entendimento do destino e da utilização de carbono e nitrogênio. Embora os tratamentos recebessem iguais suprimentos de nutrientes, e portanto nitrogênio, a quantidade de proteína foliar em DC foi pequena em comparação com DL, estando então limitada ainda mais a taxa potencial de fotossíntese (Figura 29A,B). Estes dados demonstram que em condição de DC o carbono requerido para a formação de esqueletos de aminoácidos é divergido para a produção de altas

¹Com o objetivo de facilitar o texto, esteviosídeo é referido como sendo parte dos açúcares solúveis totais, quando de fato, mais corretamente, deveria ser denominado de glicosídeo diterpênico tetracíclico presente na fração solúvel. Com o propósito de discussão e pelo fato do esteviosídeo ser principalmente glicose esta terminologia será usada.

concentrações de esteviosídeo, novamente por estar a produção deste composto sob controle genético. Neste sentido, condição de DL permite que as plantas sejam mais eficientes na respectiva utilização de carbono e nitrogênio. Estas observações estão de acordo com Cates (1975) que estabelece que o ganho em sucesso pela planta causado pela produção de substâncias repelentes de insetos sobrepuja os gastos metabólicos. Assim, pode-se especular que se plantas em DC, nestes experimentos em que nutrientes não foram limitantes, tivessem a capacidade de abandonar a síntese de esteviosídeo e incorporar mais carbono em proteína foliar, simulando, portanto, plantas em DL na utilização do nitrogênio disponível, o aumento resultante na danificação por insetos, reduzindo a área foliar e por sua vez a fotossíntese, não seria compensado pelo emprego original do carbono na síntese de esteviosídeo. É interessante observar que a produção de mecanismos químicos de defesa, embora tenha um custo metabólico para a planta, exige um custo correspondente por parte dos herbívoros que consumirão os compostos tóxicos. Free land & Janzen (1974) apontam que o consumo de compostos secundários vegetais é um empreendimento potencialmente perigoso e metabolicamente caro. Herbívoros que ingerem alimentos contendo pouca ou nenhuma toxina dispõem de pequenos gastos metabólicos, não requerendo mecanismos especiais para eliminar a toxicidade.

Em S. rebaudiana, portanto, parece existir um limiar determinado geneticamente para produção de esteviosídeo, apenas acima do qual o excesso de carbono pode ser incorporado em outros açúcares e compostos nitrogenados, quando nutrientes estiverem disponíveis. Este modelo para o destino e utilização do nitrogênio e carbono explica porque a relação entre esteviosídeo e peso seco foliar (Figura 31B) parece contínua, no sentido de ser independente do comprimento do dia, enquanto que a relação entre proteína e peso seco foliar (Figura 29B) pode ser vista em dois gráficos dis-

tintos, claramente dependentes do comprimento do dia ou mais propriamente, da disponibilidade de carbono. Na primeira relação, portanto, como o fotossintato aumentou, relativamente mais carbono foi incorporado em esteviosídeo. Deste modo o esteviosídeo é função e proporção da quantidade total de açúcares solúveis (Figura 31A). Este não foi o caso para proteína e além disto as inclinações dos gráficos de DL e DC são diferentes sendo o valor de b maior para DL, o que indica que a diferença no conteúdo proteico em DL e DC foi mais acentuada para folhas maiores, novamente evidenciando a importância do carbono disponível. Interações semelhantes entre ambiente, particularmente comprimento do dia e alta intensidade luminosa, e produção de terpenos tem sido verificadas por Grahle & Holtzel (1963), Burbott & Loomis (1967, 1969), Shine & Loomis (1974), Lincoln & Langenheim (1978).

Embora o conteúdo de esteviosídeo seja determinado geneticamente em S. rebaudiana, é bem provável que existam diferenças absolutas e variação intra-específica, como foi mostrado para ecotipos químicos de Thymus vulgaris, Mentha piperita, Satureja douglasii, Abies lasiocarpa, Pinus ponderosa, Hymenaea courbaril, He deona sp, Micromeria sp, e Salvia sp. Todos estes ecotipos químicos, embora sejam idênticos morfológica e cariologicamente, mostram grande variação no nível absoluto e na composição de monoterpenos (Zavarin & Cobb, 1970; Zavarin et al., 1970; Granger & Passet, 1973; Lincoln & Langenheim, 1978, Rice et al., 1978). Estas diferenças intra-específicas também foram verificadas para outros compostos secundários, particularmente para os alcalóides, que são bem estabelecidos como repelentes de insetos, conforme visto em vários trabalhos com Strophanthus sarmentosus, Solanum dulcamara, Papaver somniferum, Phalaris arundinacea. Aconitum napellus, Argemone pleiacantha, e espécies de Datura sp, Catharanthus sp, Cinchona sp e Lupinus sp (Levin & York, 1978).

Zaidan et al. (1978) estabelece, do mesmo modo, que tipos morfológicos diferentes de S. rebaudiana contêm níveis absolutos de esteviosídeo diferentes. Há ainda, dados sobre a existência, nesta espécie, de outros compostos estruturalmente relacionados com o esteviosídeo, denominados esteviolbiosídeo, rebaudiosídeos A e B e dulcosídeos. Tais compostos diferem do esteviosídeo em alguns radicais (Kohda et al., 1976; Yamasaki et al., 1976; Kobayashi et al., 1977). Talvez pesquisas futuras revelem diferenças absolutas e na composição de diterpenos de S. rebaudiana da mesma maneira como já visto para os monoterpenos de várias espécies, como carvona, pulegona, mentona, limoneno, piperitona (Lincoln & Langenheim, 1978).

É interessante que os diferentes tipos morfológicos de S. rebaudiana examinados também mostrem diferentes respostas ao comprimento do dia, no que se refere à floração, mas não há relação entre o fotoperíodo crítico e o conteúdo de esteviosídeo (Zaidan et al., 1978), reforçando novamente que o esteviosídeo não parece ter papel hormonal mediado pelo fitocromo.

Para produção comercial de esteviosídeo, portanto, poderia ser possível aumentar o nível deste composto através de seleção e tornando máxima a expressão genética, pelo uso de ótimos comprimento do dia durante o crescimento.

Como os dados deste trabalho estão de acordo com aqueles citados em vários trabalhos fisiológicos e ecológicos, particularmente sobre espécies onde o papel dos compostos secundários é ser repelente, é razoável supor que a função do esteviosídeo em S. rebaudiana seja parecida e não incomum.

É interessante notar que plantas perenes lenhosas tendem a conter mais substâncias tóxicas que plantas anuais mais efêmeras. Várias razões têm sido dadas para explicar esta observação: (a) plantas perenes podem a longo prazo destinar relativamente mais

energia para produção de substâncias secundárias de defesa, enquanto que aquelas anuais convergem mais energia para produção de sementes; (b) sendo perenes, permanecem continuamente no ambiente expostas aos ataques de herbívoros; (c) a maior biomassa destas plantas pode atrair mais herbívoros ou fornecer nichos de proteção para pequenos animais (Cates, 1975). A este respeito Cates & Orians (1975) e Feeny (1968) sugerem que o compromisso de uma planta com a defesa química também poderia estar relacionado com a posição que a planta ocupa durante a sucessão, até a comunidade atingir o clímax, pois as plantas que aparecem cedo na comunidade tendem a ser anuais enquanto que aquelas que surgem no estágio de clímax são perenes.

Levin & York (1978) estabelecem que insetos que são muito especializados na eliminação da toxicidade de alcalóides específicos restringem a variedade de alimento potencial, mas como muitas classes de alcalóides são largamente distribuídas, um predador não é necessariamente obrigado a ser monófago. Estes autores observaram que a capacidade de eliminar a toxicidade de alcalóides indóis de Loganiaceae também confere habilidade ao predador, de se alimentar de Apocynaceae e Rubiaceae. Assim, espécies que empregam vários e diferentes compostos na defesa poderiam ter vantagem e seriam, provavelmente, as que mais persistiriam. Deste modo, o fato de que o esteviosídeo parece existir apenas em S. rebaudiana confere grande vantagem a esta espécie, pois o predador não poderia evoluir no sentido de evitar este composto através de contato com outra espécie. Além disto, o fato de que parecem existir vários produtos secundários que não esteviosídeo (esteviolbiosídeo, rebaudiosídeos A e B, dulcosídeos) deixaria a defesa química de S. rebaudiana mais eficiente, pois o predador teria que desenvolver, simultaneamente, imunidade contra todos estes compostos.

Finalmente, certas observações feitas em S. rebaudiana cres

cida em condição natural apoiam esta hipótese. Folhas de S. rebaudiana não sofrem danos por insetos na mesma proporção que outras plantas que crescem nas vizinhanças como Amaranthus sp, Capsicum sp e Glycine sp. Experimentos em andamento com o coleóptero polí-fago Epicauta mostram que este herbívoro ingere livremente folhas de várias espécies de Capsicum sp, Lycopersicum sp, Emilia sp e Amaranthus sp, o que não ocorre com folhas de S. rebaudiana, mesmo quando isolado com esta espécie, quando então se torna faminto, às vezes morrendo. Quando a este herbívoro são oferecidos pedaços de folhas de Capsicum sp ou de S. rebaudiana, ou mistura de ambas, ingere todo o Capsicum sp rejeitando S. rebaudiana, sendo portanto capaz de distinguir entre as plantas (Metivier, com. pes.)

A toxicidade do esteviosídeo em outros animais tem sido verificada. Em ratos tem sido observado que este composto causa dificuldade de movimento nos animais (Akashi & Yokoyama (1975) in Felipe, 1977c), o que sugere a interferência no metabolismo animal.

Concluindo, um modelo pode ser proposto para função e síntese de esteviosídeo em S. rebaudiana. Durante a evolução desta espécie pode-se supor que a seleção natural eliminou tipos com baixo conteúdo de esteviosídeo. Assim, a planta moderna tem determinação genética para produção de um mínimo de esteviosídeo, mesmo em DC, quando o carbono é limitante e a planta, mesmo assim, ainda produz 29% deste diterpeno. Quando o comprimento do dia aumenta o carbono disponível também cresce e o nível de esteviosídeo se eleva acima do limite mínimo estabelecido geneticamente, passando agora a ser função da quantidade total de açúcares solúveis, podendo alcançar 40% do total em 16 horas de luz, uma expressão fenotípica. Este controle da utilização do carbono para um sistema de defesa química é importante na sobrevivência desta espécie, considerando que a proporção de sementes viáveis produzidas pela planta é muito baixa (Felipe et al., 1971) e que o cres-

cimento inicial da mesma é extremamente lento (v. seção 3.2.b). Assim, Cates (1975) e Levin & York (1978) apontam que na ausência de pressão de pastagem, indivíduos que crescem rapidamente tem vantagem sobre os que crescem lentamente mas que destinam mais energia para um mecanismo de defesa contra os herbívoros. Entretanto, sob pressão de pastagem o vigor dos indivíduos de paladar desagradável aumentará desde que somente menores quantidades de tecido fo tossintético serão consumidas. Além disto, o desenvolvimento de uma defesa química pode determinar que espécies permanecerão componentes da flora e quais não persistirão.

5. RESUMO

Stevia rebaudiana Bert. contém um diterpeno tetracíclico ligado a três moléculas de glicose, o esteviosídeo, que é 300 vezes mais doce que a sacarose e apresenta, portanto, importância econômica.

O esteviosídeo de extratos de plantas é rapidamente separado e quantificado através de cromatografia sobre camada delgada em desenvolvimento bidimensional, eluição em água com perdas insignificantes e ensaio colorimétrico com antrona contra padrão de esteviosídeo ou glicose. Os solventes utilizados nos desenvolvimentos em duas dimensões são butanol:acetato de etila:isopropanol:água(35:100:60:30) e acetato de etila:ácido acético:água(8:4:1), que propiciam o deslocamento do esteviosídeo em Rf 0,56 e 0,12, respectivamente. O emprego de glicose como padrão é possível devido à existência de razão constante entre as densidades ópticas de quantidades iguais de glicose e esteviosídeo que está relacionada com os pesos moleculares destas substâncias.

No crescimento de folhas são distinguidas duas fases: uma fase inicial de expansão rápida, principalmente pela entrada de água, em que o material seco permanece constante, e uma segunda fase, após atingidos 10 cm² de área foliar, na qual material seco e conteúdo proteico aumentam devido à concomitante fixação de carbono na folha. Os conteúdos absolutos e relativos de proteína e açúcares solúveis totais mostram padrões de mudanças diferentes durante a ontogenia, resultado de suas diferentes funções no tecido foliar jovem.

Conteúdos de açúcares totais e proteína correlacionam-se positivamente. Folhas menores possuem nível relativamente mais alto

de açúcares solúveis totais do que de proteína e a medida que crescem os níveis de proteína e açúcares aproximam-se, o que faz com que a razão proteína:açúcar aproxime-se de 1.

Em condição natural os açúcares totais perfazem 16-19% do peso seco foliar e proteína 13%. Os conteúdos absolutos de açúcares solúveis totais e proteína correlacionam-se positivamente com peso seco, peso fresco e área foliar. Folhas maiores em termos de peso seco tendem a ser mais concentradas em açúcares solúveis totais e proteína.

Condição fotoperiódica não indutora de dias longos (16 horas de luz diária) promove o crescimento em altura das plantas, área, peso fresco, peso seco dos pares foliares e acelera o aparecimento dos mesmos em relação a dias curtos (8 horas de luz diária), que promovem desenvolvimento do escapo floral e floração.

Dias longos aumentam significativamente os níveis absolutos e relativos de proteína, açúcares solúveis totais e esteviosídeo. Em dias longos a produção de esteviosídeo é o dobro da de dias curtos sendo de 72 g/kg de tecido foliar seco, comparado com somente 36 g/kg na última condição. A proporção do esteviosídeo nos açúcares solúveis totais também aumenta significativamente, passando de 29% em dias curtos para 40% em dias longos.

Estes resultados são discutidos em termos fisio-ecológicos e uma hipótese é proposta para explicar a possível função do esteviosídeo no tecido como repelente de herbívoros, protegendo a planta através da conservação de sua área foliar máxima.

6. SUMMARY

Stevia rebaudiana Bert. contains a tetracyclic diterpene glycoside, stevioside, which is three hundred times sweeter than sucrose. As such this compound is of potential economic interest.

Stevioside from plant extracts may be rapidly isolated and quantified through bi-dimensional thin layer chromatography. Isolated samples may be eluted in water, with insignificant losses and then assayed colorimetrically by the anthrone method against stevioside or glucose standards. The solvents employed for chromatography are butanol:ethyl acetate:isopropanol:water (35:100:60:30) in the first dimension and ethyl acetate:acetic acid:water (8:4:1) in the second. In this system stevioside is located at R_f 0,56 and 0,12 in the first and second dimensions respectively. When assaying stevioside, glucose may be employed as a standard due to the optical densities of equal quantities of these substances bearing a constant ratio related to their molecular weights.

Two phases are distinguishable during leaf growth: firstly, a rapid expansion phase in which dry weight remains constant and growth is due mainly to the entry of water, followed by the second phase (beyond leaf areas of 10 cm^2) in which dry matter and protein contents increase due to concomitant carbon fixation in the leaf. The absolute and relative levels of proteins and sugars show different patterns of development during ontogeny reflecting their divergent functions in young leaf tissue.

Soluble sugars and proteins are positively correlated. Smaller leaves possess relatively higher concentrations of soluble sugars than proteins: as leaf size increases the contents of sugars and proteins in absolute terms become increasingly similar

so that the ratio leaf protein:sugar approaches 1.

In plants raised in natural conditions the soluble sugar levels represent 16-19% of the leaf dry weight and proteins around 13%. Absolute sugar and protein contents are positively correlated with leaf dry weight, fresh weight and area. Larger leaves, in terms of dry weight, possess higher concentrations of soluble sugars and proteins.

Non inductive long days (16 hours light/day) increase plant height, leaf area, leaf number, dry weight and fresh weight as well hastening the emergence of successive leaf pairs in relation to short days (8 hours light/day) which promotes bolting and flowering.

Long days significantly increase the absolute and relative levels of leaf protein, soluble sugars and stevioside. In long days the leaf stevioside content is double that found in short days being around 72 g/kg of dry tissue as compared to only 36 g/kg in the latter. The proportion of stevioside as a fraction of the total leaf sugar is also significantly greater in long days: here this compound accounts for 40% of the soluble leaf sugars compared with only 29% in short days.

These findings are discussed in physio-ecological terms and a hypothesis is proposed whereby stevioside in the tissue functions as repellent to herbivores thus protecting the plant through the maintenance of maximum leaf area.

7. BIBLIOGRAFIA

- ALVES, L. M. - The gibberellins and the gibberellin like substances of Stevia rebaudiana Bertoni. Chem. Abstr. 84: 118457 a , 1975.
- ANÓNIMO - Sweetest of all. Chem. Engng News 34: 124-126, 1956.
- ARANDA, J.B., Jr. - La yerba dulce (caa-hee) (Stevia rebaudiana Bert.). Agr. Com. Industr. (Assuncion) 2, 1941.
- ARYA, W. P. - Position & configuration of the carboxyl group in steviol & isosteviol. J. Sci. Industr. Res. 21B:93-95, 1962.
- ATSATT, P. R. & O'DOWD, J. D. - Plant defense guilds. Science 193: 24-29, 1976.
- BALDEV, B. & LANG, A. - Control of flower formation by growth retardants and gibberellin in Sarmolus parviflorus, a long-day plant. Am. J. Bot. 52: 408-471, 1965.
- BARNES, N. F., LIGHT, E. N. & LANG, A. - The action of plant growth retardants on terpenoid biosynthesis. Inhibition of gibberellic acid production in Fusarium moniliforme by CCC and AMO-1618; action of these retardants on steviol biosynthesis. Planta 88: 172-182, 1969.
- BEARDER, J. R., MACMILLAN, J. & WELS, C. M. - The metabolism of steviol to 13-hydroxylated ent-gibberellanes and ent-kaurenes. Phytochemistry 14: 1741-1748, 1975.
- BEARDER, J. R., FRYDMAN, V. M., GASKIN, P., MACMILLAN, J. & WELS, C. M. - Fungal Products. Part XVI. Conversion of isosteviol and steviol acetate into gibberellin analogues by mutant B1-41a of Gibberella fujikuroi and the preparation of ³H gibberellin A₂₀. J. chem. Soc. (Perkin I) 173-178, 1976.
- BECK, S. D. - Resistance of plants to insects. A. Rev. Ent. 10: 207-232, 1965.
- BELL, F. - Stevioside: A unique sweetening agent. Chem. and Industr. 29: 897-898, 1954.
- BENNETT, R. D., LIEBER, E. R., HEFTMANN, E. - Biosynthesis of steviol from (-)-kaurene. Phytochemistry 6: 1107-1110, 1967.
- BERTONI, M.S. - El Caã-êhê (Eupatorium rebaudianum, species nova) Una nueva planta sacarífera. Revta. Agron. (Assuncion) 35-37, 1889.

- BERTONI, M. S. - La Stevia rebaudiana Bertoni. La stevina y la rebaudiana: nuevas substancias edulcorantes. An. Cient. Parag. Ser. II (2): 129-134, 1918.
- BIELESKI, R. L. & TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin layer electrophoresis and chromatography. Analyt. Biochem. 17: 278-282, 1966.
- BLENKINSOP, P. G. & DALE, J. E. - The effects of shade treatment and light on ribulose 1-5 diphosphate carboxylase activity and Fraction I protein level in the first leaf of barley. J. Exp. Bot. 25 (88): 899-912, 1974.
- BOTTLE, R. T. - Synthetic sweetening agents. A survey of the materials available, including cyclamates. Mfg. Chem. 35: 60-65, 1964.
- BRATTSTEN, L. B., WILKINSON, C. F. & EISNER, T. Herbivore - plant interactions: mixed - function oxidases and secondary plant substances. Science 196: 1349-1352, 1977.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R. - Le principe à saveur sucrée du kaà-hê-ê (Stevia rebaudiana Bertoni). Bull. Soc. Chim. biol. 13: 636-655, 1931a.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R. - Le principe à saveur sucrée du kaà-hê-ê (Stevia rebaudiana Bertoni). II. L'hydrolyse diastasique du stevioside. III. Le stéviol de l'hydrolyse acide. Bull. Soc. Chim. biol. 13: 781-796, 1931b.
- BRIDEL, M. & LAVIEILLE, R. - Sur le principe sucrée des feuilles de kaà-hê-ê (Stevia rebaudiana Bertoni). C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 192: 1123-1125, 1931c.
- BRÜCHER, H. - Paraguays 'Süsstoff' Pflanze Stevia rebaudiana. Naturw. Rdsch. 27: 231-233, 1974.
- BURBOTT, A.J. & LOOMIS, W. D. - Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. Pl. Physiol. 42: 20-28, 1967.
- BURBOTT, A. J. & LOOMIS, W. D. - Evidence for metabolic turnover of monoterpenes in peppermint. Pl. Physiol. 44: 173-179, 1969.
- CATES, R. G. - The interface between slugs and wild ginger: some evolutionary aspects. Ecology 56: 391-400, 1975.
- CATES, R. G. & ORIANI, G. H. - Successional states and the palatability of plants to generalized herbivores. Ecology 56: 410-418, 1975.
- CLELAND, C. F. & ZEEVAART, J. A. - Gibberellins in relation to flowering and stem elongation in the long day plant Silene

- armeria. Pl. Physiol. 46: 392-400, 1970.
- COHEN, B. L. - Saccharin - the risks and benefits. Nature 271 : 492, 1978.
- COOK, I. F. & KNOX, J. R. - The synthesis of 13-hydroxylated ent-kaurene 16-ene derivatives using an acyloin-like cyclization of keto esters. Tetrahedron 32: 363-367, 1976.
- CROSS, B. E. & MEYERS, P. L. - The effect of plant growth retardants on the biosynthesis of diterpenes by Gibberella fujikuroi. Phytochemistry 8: 79-83, 1969.
- DENNIS, D. T., UPPER, C. D. & WEST, C. A. - An enzymic site of inhibition of gibberellin biosynthesis by AMO-1618 and others growth retardants. Pl. Physiol. 40: 948-952, 1965.
- DETHIER, V. G. - Chemical interactions between plants and insects. In Chemical Ecology, ed. SONDHEIMER, E. and SIMEONE, J. B. , 83-99. Academic Press New York-London, 1970.
- DHOPTA, A. M. & KALE, V. R. - Effect of GA on growth and yield of fibre of ramie (Boehmeria nivea). J. Maharashtra Agric. Univ. I (1): 18-20, 1976.
- DJERASSI, C., RINIKER, R. & RINIKER, B. - Optical rotatory dispersion studies. VII. Application to problems of absolute configurations. J. Am. chem. Soc. 78: 6362-6377, 1956.
- DJERASSI, C., QUITT, P., MOSETTIG, E., CAMBIE, R. C., RUTLEDGE, P. S. & BRIGGS, L. H. - Optical rotatory dispersion studies LVIII. The complete absolute configurations of steviol, kaurene and the diterpene alkaloids of the Garryfoline and Atisine groups. J. Am. chem. Soc. 83: 3720-3722, 1961.
- DOLDER, F., LICHTI, H., MOSETTIG, E. & QUITT, P. - The structure and stereochemistry of steviol and isosteviol. J. Am. chem. Soc. 82: 246-247, 1960.
- DORFMAN, R. I. & NESS, W. R. - Antiandrogenic activity of dihydroisosteviol. Endocrinology 67: 282-285, 1960.
- EHRlich, P. & RAVEN, P. H. - Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18: 586-608, 1964.
- EISNER, T. - Catnip: its raison d'être. Science 146: 1318-1320, 1964.
- EL-ANTABLY, H. M. M. & WAREING, P. F. - Stimulation of flowering in certain short days plant by abscisic acid. Nature 210: 328-329, 1966.
- ELLIS, R. J. - Fraction I protein. Commentaries in plant science n° 4, July 29-38, 1973.

- FEENY, P. P. - Seasonal changes in the tanin content of oak leaves. Phytochemistry 7: 871-880, 1968.
- FELIPPE, G. M. - Erva-do-paraguai. O Estado de São Paulo. Suplemento Agrícola, 1137: 14, 1977a.
- FELIPPE, G. M. - "Stevia": uma nova fonte adoçante? O Estado de São Paulo. Suplemento Cultural, (55) 14-15, 1977b.
- FELIPPE, G. M. - Stevia rebaudiana Bert.: uma revisão. Ciência e Cultura 29 (11): 1240-1246, 1977c.
- FELIPPE, G. M. - Stevia rebaudiana: a planta doce do Paraguai. O Estado de São Paulo. Suplemento Cultural, 76: 14-15, 1978.
- FELIPPE, G. M., LUCAS, N. M. C., BEHAR, L. & OLIVEIRA, M. A. C. - Observações a respeito de germinação de Stevia rebaudiana Bert.. Hoehnea 1: 81-93, 1971.
- FELIPPE, G. M. & LUCAS, N. M. C. - Estudo da viabilidade dos frutos de Stevia rebaudiana Bert.. Hoehnea 1: 95-105, 1971.
- FLETCHER, H. G. Jr. - The sweet herb of Paraguay. Chemurg. Dig. 14: 7 e 18, 1955.
- FRAENKEL, G. S. - The raison d'être of secondary plant substances. Science 129: 1466-1470, 1959.
- FREELAND, W. J. & JANZEN, D. H. - Strategies in herbivory by mammals: the role of plant secondary compounds. Am. Nat. 108 (961): 269-289, 1974.
- GATTONI, L. A. - Caa-jhee: una planta silvestre nativa del Paraguay (Stevia rebaudiana Bert.). Agr. Com. Industr. (Assuncion), 1945.
- GERSHENZON, J., LINCOLN, D. E. & LANGENHEIM, J. H. - The effect of moisture stress on monoterpenoid yield and composition in Satureja douglasii. Biochem. Syst. & Ecol. 6: 33-43, 1978.
- GIAQUINTA, R. - Source and sink leaf metabolism in relation to phloem translocation. Pl. Physiol. 61: 380-385, 1978.
- GLÓRIA, I. S. - Thin layer chromatography of pharmaceutical agents. Rev. Fac. Farm. Bioq. S. Paulo 4: 341-400, 1966.
- GRAHLE, A. & HOLTZEL, C. - Photoperiodische Abhängigkeit der Bildung des Altherischen öls bei Mentha piperata L.. Naturwissenschaften 50: 552, 1963.
- GRANGER, R. & PASSET, J. - Thymus vulgaris spontane de France: races chimiques et chemotaxonomie. Phytochemistry 12: 1663-1691, 1973.
- HANSON, J. R. - The chemistry of the tetracyclic diterpenoids - V-stereochemical studies in the stachene series. Tetrahedron

23: 793-799, 1967.

- HANSON, J. R. & WHITE, A. F. - The transformation of steviol by Gibberella fujikuroi. Tetrahedron 24: 6291-6293, 1968a.
- HANSON, J. R. & WHITE, A. F. - Studies in terpenoid biosynthesis. II. The biosynthesis of steviol. Phytochemistry 7: 595-597, 1968b.
- HEDDEN, P., MACMILLAN, J. & PHINNEY, B. The metabolism of gibberellins. A. Rev. Pl. Physiol. 29: 149-192, 1978.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, I. D. - The water culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Agr. Exper. Sta. Circ. 347, 1938.
- HOPKINSON, J. M. - Studies on the expansion of the leaf surface. IV. The carbon and phosphorus economy of a leaf. J. exp. Bot. 15: 125-137, 1964.
- HSAIO, T. H. - Chemical basis of host selection and plant resistance in oligophagus insects. Ent. Exp. & Appl. 12: 778-788, 1969.
- ISIMA, N. & KAKAYAMA, O. - Sensory evaluation of stevioside as a sweetener. Rep. Natl. Food Res. Inst. (Tokyo) 31: 80-85, 1976.
- JANZEN, D. H. - Herbivores and the number of three species in tropical forests. Am. Nat. 104 (940): 501-528, 1970.
- JANZEN, D. H. - Tropical agroecosystems. Science 182: 1212-1219, 1973.
- JERMY, T. - Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagus insects. Ent. Exp. & Appl. 9: 1-12, 1966.
- JONES, D. A. - Chemical defense mechanisms and genetic polymorphism. Science 173: 945, 1971.
- KATSUMI, M., PHINNEY, B. O., JEFFERIS, P. R. & HENRICK, C. A. - Growth response of the d-5 and an-1 mutants of maize to some kaurene derivatives. Science 144: 849-850, 1964.
- KAWASHIMA, N. & WILDMAN, S. G. - Fraction I protein. A. Rev. Pl. Physiol. 21: 325-358, 1970.
- KENDALL, W. A. & SHERWOOD, R. T. - Palatability of leaves of tall fescue and reed canarygrass and of some of their alkaloids to meadow voles. Agron. J. 67: 667-671, 1975.
- KOBAYASHI, M., HORIKAWA, S., DEGRANDI, I. H., VENO, J. & MITSUHASHI, H. - Dulcosides A and B, new diterpenes glycosides from Stevia rebaudiana. Phytochemistry 16(9): 1405-1408, 1977.
- KOBERT, R. - Concerning two sweet-tasting drugs. Amer. J. Pharm. 87: 555-559, 1915.

- KOHDA, H., KASAI, R., MURAKAMI, K. & TANAKA, O. - New sweet diterpene glucosides from Stevia rebaudiana. Phytochemistry 15: 981-983, 1976.
- KRISHNAMOORTHY, H. N. - Role of gibberellins in juvenility, flowering and sex expression. In Gibberellins and Plant Growth, ed. KRISHNAMOORTHY, H. N., 115-143. Willey Eastern Limited, New Delhi. 1975.
- LANG, A. - Gibberellins: structure and metabolism. A. Rev. Pl. Physiol. 21: 537-570, 1970.
- LANGENHEIM, J. H. - Amber: a botanical enquiry. Science 163: 1157-1169, 1969.
- LATO, M., BRUNELLI, B., CIUFFINI, G. & MEZZETTI, T. - Bidimensional thin layer chromatography of carbohydrates on silica gel impregnated with boric acid. J. Chromat. 34: 26-34, 1968a.
- LATO, M., BRUNELLI, B., CIUFFINI, G. & MEZZETTI, T. - Analysis of carbohydrates in biological fluids by means of thin layer chromatography. J. Chromat. 36: 191-197, 1968b.
- LEVIN, D. A. - The chemical defense of plants to pathogens and herbivores. A. Rev. Ecol. Syst. 7: 121-160, 1976.
- LEVIN, D. A. & YORK, B. M. - The toxicity of plant alkaloids. Biochem. Syst. & Ecol. 6: 61-78, 1978.
- LINCOLN, D. E. & LANGENHEIM, J. H. - Geographic patterns of monoterpenoid composition in Satureja douglasii. Biochem. Syst. Ecol. 4: 237-248, 1978.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- MARTEN, G. C.; BARNES, R. F., SIMONS, A. B. & WOODING, F. J. - Alkaloids and palatability of Phalaris arundinacea L. Agron. J. 65: 199-201, 1973.
- MAKSYMOWICH, R. & ERICKSON, R. O. - Phyllotaxis in Xanthium shoots altered by gibberellic acid. Science 196(4295): 1201-1202, 1977.
- MEINWALD, J., PRESTWICH, G. D., NAKANISHI, K. & KUBO, I. - Chemical ecology: studies from East Africa. Science 199: 1167-1173, 1978.
- METIVIER, J. R. & DALE, J. E. - The effects of grain nitrogen and applied nitrate on growth, photosynthesis and protein content of the first leaf of barley cultivars. Ann. Bot. 41: 1287-1296, 1977.
- MICHNIEWICZ, M. & LANG, A. - Effect of nine different gibberellins on stem elongation and flower formation in cold-requiring and

- photoperiodic plants grown under non-inductive conditions .
Planta 58: 549-563, 1962.
- MOSETTIG, E., & NES, W. R. - Stevioside. II. The structure of the aglucon. J. org. Chem. 20: 884-889, 1955.
- MOSETTIG, E., BEGLINGER, U., DOLDER, F., LICHTI, H., QUITT, P. & WATERS, J. A. - The absolute configuration of steviol and isosteviol. J. Am. chem. Soc. 85: 2305-2309, 1963.
- NITSCH, J. P. & NITSCH, C. - Terpénoides naturels actifs sur la croissance végétale. Annls. Physiol. vég. 7: 259-272, 1965a.
- NITSCH, J. P. & NITSCH, C. - The induction of flowering in Nicotiana. III. Variations in the level of endogenous growth substances. Am. J. Bot. 52 (16): 591-598, 1965b.
- OATES, J. F., SWAIN, T. & ZANTOVSKA, J. - Secondary compounds and food selection in Colobus monkey. Biochem. Syst. & Ecol. 5: 317-321, 1977.
- OGAWA, Y. - Biological activities of gibberellin biosynthesis - related substances in the barley endosperm test. Pl. Cell Physiol. 16: 265-270, 1975.
- OSBUN, J. L., VOLK, R. J. & JACKSON, W. A. - Effects of light and darkness on gaseous exchange of bean leaves. Pl. Physiol. 39: 523-527, 1964.
- PARKER, K. U. - Alternatives to sugar: the search for an ideal non nutritive sweetener is almost a century old. Nature 271: 493-495, 1978.
- PHINNEY, B. O. - Dwarfing genes in Zea mays and their relation to the gibberellins. In Plant Growth Regulation, Iowa State, Univ. Press 498-501, 1961.
- PLANAS, G. M. & KÚC, J. - Contraceptive properties of Stevia rebaudiana. Science 162: 1007, 1968.
- POMARET, M. & LAVIEILLE, R. - Le principe à saveur sucrée du kaà-hê-é (Stevia rebaudiana Bert.). IV. Quelques propriétés physiologiques du stéviósíde. Bull. Soc. Chim. biol. 13:1248-1252, 1931.
- RHOADES, D. F. - Integrated antiherbivore, antidesicant and ultraviolet screening properties of Cresotebush resin. Biochem. Syst. & Ecol. 5: 281-290, 1971.
- RICE, R. L., LINCOLN, D. E. & LANGENHEIM, J. H. - Palatability of monoterpenoid compositional types of Satureja douglasii to a generalist molluscan herbivore Ariolimax dolichophallus .

- Biochem. Syst. & Ecol. 6: 45-53, 1978.
- ROCHA, R. F. - Estudos em Stevia rebaudiana Bert.: Fotoperiodismo, esteviosídeo e substâncias giberelínicas. Esc. Paulista de Medicina. Tese de Mestrado, 1975.
- ROE, R. & MOTTERSHEAD, B. E. - Palatability of Phalaris arundinacea L.. Nature 193: 255-256, 1962.
- RUDDAT, M. - Inhibition of the biosynthesis of steviol by a growth retardant. Nature 211: 971-972, 1966.
- RUDDAT, M. - Biosynthesis and metabolism of steviol. In Biochemistry and Physiology of plant growth substances, ed. WIGHTMAN, F. & SETTERFIELD, G., 341-346. The Runge Press Ltd. , Ottawa . 1968.
- RUDDAT, M., HEFTMANN, E. & LANG, A. - Biosynthesis of steviol. Arch. Biochem. Biophys. 110: 496-499, 1965a.
- RUDDAT, M., HEFTMANN, E. & LANG, A. - Conversion of steviol to a gibberellin-like compound by Fusarium moniliforme. Arch. Biochem. Biophys. 111: 187-190, 1965b.
- RUDDAT, M., LANG, A. & MOSETTIG, E. - Gibberellin activity of steviol, a plant terpenoid. Naturwissenschaften 50: 23, 1963.
- SAKAMOTO, I., KOHDA, H., MURAKAMI, K. & TANAKA, O. - Quantitative analysis of stevioside. Yakugaku Zasshi 95: 1507 - 1511 , 1975.
- SCHMELING, G. A. von - Caã-heê. Edulcorante natural não calórico (Stevia rebaudiana Bertoni). Bolm Sanat S Lucas 29 (5):67-78, 1967.
- SCHMELING, G. A. von, CARVALHO, F. V. & ESPINOSA, A. O. - Stevia rebaudiana Bertoni. (II). Efeito hipoglicemiante em coelhos aloxinizados. Ciência e Cultura. Suplemento: 28 (7):571, 1976.
- SCHOONHOVEN, L. M. - Some aspects of host selection and feeding in phytophagous insects. In Insect and Mite Nutrition, ed. RODRIGUES, J. G., 557-566. North-Holland, Amsterdam, 1972.
- SHARMA, R. & NANDA, K. K. - Effect of photoperiod on growth and development of Eschscholtzia californica. Indian J. Pl. Physiol. 19 (2): 202-206, 1976.
- SHECHTER, I. & WEST, C. A. - Biosynthesis of gibberellins. IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl pyrophosphate. J. biol. Chem. 244: 3200-3209, 1969.
- SHINE, W. E. & LOOMIS, W. D. - Isomerization of geraniol and geranyl phosphate by enzymes from carrot and peppermint. Phytochemistry 13: 2095-2101, 1974.

- SNEDECOR, G. H. & COCHRAN, W. G. - Statistical Methods. 6th ed., Ames, The Iowa State University Press, 1967.
- STUBBLEBINE, W. H. & LANGENHEIM, J. H. - Effects of Hymenaea courbaril leaf resin on the generalist herbivores Spodoptera exiqua (beet armyworm). J. chem. Ecol. 3: 633-647, 1977.
- STUBBLEBINE, W. H., LANGENHEIM, J. H. & LINCOLN, D. - Vegetative growth and leaf resin composition in Hymenaea courbaril under photoperiodic extremes. Biochem. Syst. & Ecol. 3: 219-228, 1975.
- SUGE, H. & RAPPAPORT, L. - Role of gibberellins in stem elongation and flowering in radish. Pl. Physiol. 43: 1208-1214, 1968.
- THAINE, R., OVENDEN, S.L. & TURNER, I. S. - Translocation of labelled assimilates in the soybean. Aust. J. biol. Sci. 12: 349-372, 1959.
- THOMAS, E. - Stevia rebaudiana. Bull. Assoc. Chim. 54: 844 - 847, 1937.
- UMBREIT, W. W. & BURRIS, R. H. - Method for glucose and other sugars. In Manometric Techniques, ed. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. & STAUFFER, J. F., 203-210. Minneapolis Burgess Publishing Company. 1964.
- VALIO, I. F. M. & ROCHA, R. F. - Physiological effects of steviol. Z. Pflanzenphysiol. 78: 90-94, 1976.
- VALIO, I. F. M. & ROCHA, R. F. - Effect of photoperiod and growth regulator on growth and flowering of Stevia rebaudiana Bertoni. Japan. J. Crop. Sci. 46 (2): 243-248, 1977.
- VINCE-PRUE, D. - Photoperiodism in plants. McGraw-Hill, London. 1975.
- VIS, E. & FLETCHER, H. G. Jr. - Stevioside. IV. Evidence that stevioside is a sophoroside. J. Am. chem. Soc. 78: 4709-4710, 1956.
- WATERS, J. A., BECKER, E. B. & MOSETTIG, E. - Anodic decarboxylation of isostevic acid. J. org. Chem. 27: 4689-4691, 1962.
- WHITTAKER, R. H. & FEENY, P. P. - Allelochemicals: chemical interactions between species. Science 171: 757-770, 1971.
- WOOD, H. B. Jr. & FLETCHER, H. G. Jr. - Stevioside. III. The anomeric 2, 3, 4, 6 - tetra-o-acetyl-1-o-mesitoyl-Dglucopyranoses and their behavior with alkali. J. Am. chem. Soc. 78: 207-210, 1956.
- WOOD, H. B. Jr., ALLERTON, R., DIEHL, H. W. & FLETCHER, H. G. Jr. - Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. J. org.

- Chem. 20: 875-883, 1955.
- YAMASAKI, K., KOHDA, H., KOBAYASHI, T., KASAI, R. & TANAKA, O. - Structures of Stevia diterpene-glucosides. Tetrahedron Lett. 13: 1005-1008, 1976.
- YEMM, E. W. & WILLIS, A. J. - The estimation of carbohydrates in extracts by anthrone. Biochem. J. 57: 508-514, 1954.
- ZAIDAN, L. B. P., DIETRICH, S. M. C. & FELIPPE, G. M. - Observações sobre a floração e o conteúdo de esteviosídeo em plantas de S. rebaudiana Bert. recém introduzidas no Brasil. Res. II Congresso Latino-Americano de Botânica, Brasília. 1978.
- ZAVARIN, E. & COBB, F. W. - Oleoresin variability in Pinus ponderosa. Phytochemistry 9: 2504-2515, 1970.
- ZAVARIN, E., SNAJBERK, K., REICHERT, T. & TSIEN, E. - On the geographic variability of the monoterpenes from the cortical blister oleoresin of Abies lasiocarpa. Phytochemistry 9: 377-395, 1970.
- ZEEVAART, J. A. D. - Effects of the growth retardant CCC on floral initiation and growth in Pharbitis nil. Pl. Physiol. 39: 402-408, 1964.
- ZEEVAART, J. A. D. - Effects of photoperiod on growth rate and endogenous gibberellins in the long-day rosette plant spinach. Pl. Physiol. 47: 821-827, 1971.