

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**Influência da Radiação Ultravioleta e do Dano Mecânico na
Concentração do Alcalóide Braquicerina em Folhas de *Psychotria
brachyceras* Mull. Arg.**

Diogo Denardi Porto

NEW 122
AUT
Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto
Co-orientadora: Tatiana Schäffer Gregianini

Porto Alegre, 2003

Dissertação submetida ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da UFRGS, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Ênfase em Biologia Molecular, Celular e Funcional.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da UFRGS e na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Cris

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Arthur Germano Fett-Neto pela luminosa orientação e críticas construtivas à minha interpretação e apresentação dos resultados.

À minha "sub-chefe" Tatiana Gregianini pela amizade, ajuda e presença de espírito, tornando nosso trabalho um exercício de construção do pensamento científico, profissional e pessoal.

À minha mãe pela ajuda habitacional, nutricional, financeira, moral, afetiva, psicológica e sociológica.

À Prof^a. Dr^a. Amélia Henriques da Faculdade de Farmácia da UFRGS pelo empréstimo do equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Performance e ao Prof. Dr. Vitor Kerber da Faculdade de Farmácia da UFPR por fornecer Braquicerina purificada.

Ao todos os colegas do laboratório 205, velhos e novos amigos de inestimável valor.

À segurança da UFRGS, especialmente os setores da cavalaria e do canil, pela escolta ao Morro Santana mesmo em ocasiões não marcadas com antecedência.

A Raymond Daniel Manzarek, James Douglas Morrison, Robbie Krieger e John Densmore pela brilhante composição musical.

Ao pessoal do curso de Ciências Biológicas da barra 99/1.

A todas as contribuições não citadas por falta de espaço, mas não de estima, que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

As plantas superiores sintetizam uma ampla variedade de compostos, denominados classicamente metabólitos secundários, que as ajudam a se adaptar ao seu ambiente. Um subconjunto de metabólitos secundários são os alcalóides. Essas substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular desempenham funções variadas nas plantas, podendo apresentar propriedades antibióticas, repelentes de herbívoros ou alelopáticas.

O alcalóide monoterpeneo indólico Braquicerina, de estrutura inédita, foi extraído da planta arbustiva *Psychotria brachyceras* (Rubiaceae). Esse composto revelou ação específica como antiinflamatório em testes de quimiotaxia, possuindo, portanto, potencial valor farmacológico.

Neste trabalho, é descrito o aumento dose-dependente da concentração do alcalóide Braquicerina em folhas de *P. brachyceras* quando expostas à radiação ultravioleta e sua capacidade de extinção de oxigênio *singlet* em ensaios *in vitro*. O incremento transitório do teor de Braquicerina após elicitación com dano mecânico aplicado a folhas de estacas da planta também é demonstrado.

Os resultados sugerem que o alcalóide Braquicerina tem um papel protetor contra danos causados pela penetração de luz ultravioleta bem como contra o estresse oxidativo resultante da mesma. Os dados obtidos com o experimento de dano mecânico fornecem evidências de ação anti-herbivoria.

ABSTRACT

Higher plants synthesize a wide range of compounds, classically known as secondary metabolites, which help plants adapt to their environment. A subgroup of secondary metabolites are the alkaloids. These nitrogen-containing low molecular weight substances play several roles in plants due to antimicrobial, herbivore deterrents or allelopathic properties.

The monoterpene indole alkaloid Brachycerine, which has a novel structure, was extracted from the shrub *Psychotria brachyceras* (Rubiaceae). This compound showed antiinflammatory activity in chemotaxis assays, indicative of pharmacological potential.

In this work, the dose-dependent increase of Brachycerine concentration in *P. brachyceras* leaves exposed to ultraviolet radiation and its *singlet* oxygen quenching capacity in *in vitro* assays are described. The transient increase in Brachycerine content of leaves after wounding applied to these organs is also reported.

The results suggest that Brachycerine has a protective function against damage derived from ultraviolet light exposure and also the oxidative stress caused by this radiation. The data of the wounding experiment provide evidence for an anti-herbivore action.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	1
1.2 - ALCALÓIDES.....	2
1.3 - DANO MECÂNICO	3
1.4 - ALCALÓIDES E UV.....	5
1.5 - PSYCHOTRIA.....	8
1.6 - PSYCHOTRIA BRACHYCERAS	9
1.7 - OBJETIVOS.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1 - OBTENÇÃO DAS ESTACAS DE <i>PSYCHOTRIA BRACHYCERAS</i>	13
2.2 – ENSAIOS COM UV	14
2.2.1 – <i>Exposição dos clones à UV</i>	14
2.2.2 – <i>Ensaio de atividade de extintor de oxigênio singlet</i>	15
2.2.2.1 – Caracterização dos reagentes utilizados	15
2.2.2.2 – Experimentação com oxigênio <i>singlet</i>	17
2.3 ENSAIOS COM DANO MECÂNICO	20
2.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS	21
2.5 - TESTES ESTATÍSTICOS	22
3 – RESULTADOS	23
3.1 - ACÚMULO DE BRAQUICERINA EM FOLHAS DE ESTACAS EXPOSTAS À UV.....	23
3.2 ATIVIDADE EXTINTORA DE OXIGÊNIO <i>SINGLET</i> PELA BRAQUICERINA	25
3.3 ELICITAÇÃO POR DANO MECÂNICO.....	27
4 – DISCUSSÃO	28
4.1 – PROPAGAÇÃO CLONAL COMO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO....	28
4.2 – OS ALCALÓIDES PODEM SER FILTROS DE UV	28
4.3 – BRAQUICERINA É UM EXTINTOR EFICIENTE DE OXIGÊNIO <i>SINGLET</i>	31
4.4 – O DANO MECÂNICO AUMENTA TRANSITORIAMENTE O CONTEÚDO FOLIAR DE BRAQUICERINA	32
5 – CONCLUSÕES.....	35
6 – PERSPECTIVAS.....	36
7 - BIBLIOGRAFIA.....	37

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - METABOLISMO SECUNDÁRIO

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula (Santos, 2002). A presença de enzimas específicas garante uma certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, respectivamente, são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação.

De acordo com a teoria evolucionista, todos os seres vivos derivam de um precursor comum, do qual conservam algumas características. Isso explica, por exemplo, porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos), que vêm a ser os constituintes celulares, são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal, quer num animal. Da mesma forma, os processos metabólicos relacionados a essas macromoléculas apresentam um elevado grau de similaridade entre os organismos, especialmente numa unidade sistemática, o que permite fazer generalizações. Por serem considerados essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidos como integrantes do *metabolismo primário*.

Duzentos anos de pesquisa em química e biologia moderna descreveram o papel dos metabólitos primários nas funções vitais básicas como divisão celular e crescimento, respiração e reprodução (Bourgaud *et al.*, 2001). Em Biologia, o conceito de metabólito secundário pode ser atribuído a Kossel (1891), que o define como compostos orgânicos que, na sua grande maioria, não parecem participar diretamente do crescimento e desenvolvimento. Ele foi o primeiro a definir esses metabólitos como opostos aos primeiros. Trinta anos depois um importante passo foi dado por Czapek (1921). Ele dedicou um volume inteiro de sua série "Plant Biochemistry" para o que chamou "endproduct", produtos que derivariam do metabolismo de nitrogênio pelo que chamou de "modificações secundárias" como desaminação.

Graças ao avanço das técnicas de análise química e ao surgimento da biologia molecular, foi demonstrado que esses produtos têm uma função importante na adaptação das plantas ao seu ambiente. Entre suas funções constam ação antibiótica, antiviral, alelopática a outras plantas, absorvedora de luz ultravioleta (UV), antidigestiva ou análoga hormonal, as duas últimas combatendo danos causados por herbívoros.

1.2 - ALCALÓIDES

Alcalóides (termo derivado da palavra árabe *al-qali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida) são compostos que são encontrados predominantemente nas angiospermas (Henriques *et al.*, 2002). São metabólitos secundários nitrogenados de baixo peso molecular com característica toxicidade e atividade farmacológica. Essas propriedades, as quais são exploradas tradicionalmente pelos humanos para caça e envenenamento, também são usadas atualmente para tratamento de doenças (De Luca & St-Pierre, 2000). Aproximadamente 20% das espécies vegetais acumulam alcalóides, que são derivados em sua maioria dos aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano, lisina e ornitina. Mais de 12000 alcalóides diferentes já foram descritos, indicando sua elevada diversidade estrutural e biossintética comparada à dos outros metabólitos.

1.3 - DANO MECÂNICO

As plantas sintetizam uma ampla variedade de metabólitos secundários, incluindo alcalóides e terpenóides, que são tóxicos a herbívoros e patógenos, e por isso acredita-se que atuem como compostos de defesa (Wittstock & Gershenzon, 2002). A produção desses compostos pode ser constitutiva, ou seja, a planta acumula as substâncias nos tecidos de forma não regulada (Buchanan *et al.*, 2000); ou induzida, que significa que a célula vegetal aumenta a biogênese do composto quando elicitada por um sinal externo. Respostas induzidas por

herbivoria são comuns e bem documentadas em plantas (Agrawal & Karban, 1999). Entre as vantagens da acumulação induzível estão redução dos custos de alocação, ou seja, a planta pode direcionar os recursos que seriam utilizados na produção dos compostos para crescimento e reprodução, redução da autotoxicidade do composto e prevenção do afastamento dos polinizadores da planta devido à alta concentração das substâncias no néctar, por exemplo.

O papel de defesa química dos alcalóides nas plantas é comprovado por seu amplo leque de efeitos fisiológicos em animais e por atividades antibióticas que vários alcalóides possuem (Buchanan *et al.*, 2000). Alcalóides como nicotina e cafeína são toxinas efetivas contra insetos e outros herbívoros. Em alguns casos, como o da nicotina em tabaco, evidências convincentes têm mostrado que os alcalóides estão envolvidos em defesas químicas induzíveis. Em resposta a dano mecânico, plantas de tabaco aumentam o conteúdo foliar do alcalóide, inclusive nas folhas que não sofreram o tratamento. Esse acúmulo é transitório, isto é, a concentração do alcalóide na planta retorna aos níveis basais em um período de 14 dias (Buchanan *et al.*, 2000).

A síntese induzida de nicotina e outros alcalóides parece ser controlada por metil-jasmonato. Jasmonatos são reguladores lipídicos potentes que mediam tanto trauma mecânico quanto patogênico em plantas (Liechti & Farmer, 2002). Biossintetizados a partir do ácido linolênico, controlam rotas de defesa como a da produção de compostos voláteis repelentes a insetos e a reprogramação transcricional que ocorre em resposta a dano mecânico.

Respostas a dano mecânico têm sido estudadas em plantas de interesse econômico, pois o dano sofrido por elas em processos como colheita, transporte e armazenamento encarecem os produtos vegetais (Díaz & Merino, 1998). No entanto, estudos mais determinantes provêm de tecidos não excisados, que nos permitem fazer melhores conjecturas quanto à distribuição e à estratégia do uso desses compostos pela planta.

1.4 - ALCALÓIDES E UV

Radiação ultravioleta é uma parte da região não-ionizante do espectro eletromagnético que compreende aproximadamente oito a nove por cento da radiação solar total (Hollósy, 2001). Esta radiação é tradicionalmente dividida em três faixas. A UV-C (200-280 nm) é extremamente perigosa aos organismos, mas irrelevante em condições naturais de irradiação solar. Isso porque a camada de ozônio que recobre o planeta tem grande afinidade por esse comprimento de onda, bloqueando a penetração dos raios. UV-B (280-320 nm) é de interesse particular, pois, apesar de constituir apenas aproximadamente 1,5% do espectro luminoso total, pode induzir uma ampla variedade de efeitos nas plantas. UV-A (320-400 nm) representa em torno de 6,3% da radiação solar e é a menos perigosa radiação entre as UV, podendo inclusive auxiliar no reparo enzimático de danos causados ao DNA através da enzima fotoliase (Jansen *et al.*, 1998).

Os efeitos decorrentes da exposição dos tecidos vegetais à UV, especialmente UV-B, incluem danos diretos e indiretos, incluindo prejuízos ao DNA, proteínas e membranas, alterações na transpiração e fotossíntese, alterações no crescimento, no desenvolvimento e na morfologia (Jansen et al, 1998). Várias adaptações do vegetal visam diminuir esses efeitos. Em nível morfológico, há o desenvolvimento de tricomas nas folhas, que frequentemente refletem a radiação. Acompanhando essa adaptação da epiderme, podem aparecer ceras epicuticulares que incrementariam a refletividade da superfície do órgão.

Entretanto, em poucas espécies conhecidas a refletividade da superfície foliar é alta o suficiente (entre 20 e 70%) para gerar proteção significativa. Para a maioria das espécies vegetais, essa refletividade na faixa da UV tem importância secundária (menos que 5%) (Hollósy, 2001). As defesas mais eficientes nessas últimas são de natureza bioquímica, sendo enzimática ou não.

As plantas evoluíram três diferentes mecanismos enzimáticos de reparo para minimizar o impacto causado pela UV ao material genético (Hollósy, 2001). Danos ao DNA induzidos por UV podem ser revertidos por fotorreativação, excisão ou reparo recombinatório. A fotorreativação é realizada pela enzima fotoliase, especialista em monomerizar dímeros de pirimidina induzidos por UV. A excisão é realizada por endonucleases que clivam regiões do DNA próximas ao dano e ressintetizam a fita. A rota de recombinação faz uso da informação contida na

região homóloga à atingida para realizar o reparo, especialmente em eventos de quebra dupla do DNA (Hollósy, 2001).

Entre as formas mais prejudiciais de dano indireto à célula vegetal desencadeado por UV está a formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres de oxigênio. Durante a fotossíntese, ocorre um aumento da concentração interna de oxigênio, aumentando a probabilidade de formação de espécies reativas de oxigênio, especialmente sob condições de estresse (He & Häder, 2002). Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo coletivo frequentemente usado por cientistas para incluir não apenas os radicais livres de oxigênio, como o radical hidroxila (OH•), mas também alguns derivados não-radicaís, ou seja, que não possuem elétrons desemparelhados, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), oxigênio *singlet* (¹Δ_gO₂) e íon superóxido (O₂⁻) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados.

A enzima chave do mecanismo de defesa enzimática contra EROs é a superóxido dismutase (Hollósy, 2001), que converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. A catalase, que reage com o peróxido de hidrogênio formando oxigênio e água, é o passo seguinte ao processo.

Entre os mecanismos não-enzimáticos de proteção encontra-se o acúmulo de moléculas que têm ação de proteção tanto direta quanto indireta à irradiação por UV. Os flavonóides são um bom exemplo. Biossintetizados a partir da via dos

fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. (Zuanazzi, 2002). Flavonóides absorvem a luz na faixa dos 220-380 nm e são conhecidamente fotoestáveis. Além disso, possuem uma ação extintora de radicais livres, ou seja, tornam os radicais indisponíveis para outras moléculas celulares, minimizando seus efeitos nocivos (Jansen *et al.*, 1998).

Alguns alcalóides também podem possuir função semelhante, ou seja, absorvendo comprimentos de onda correspondentes à UV, sequestrando EROs decorrentes da penetração do mesmo na célula ou disponibilizando a eles seus elétrons, fazendo com que retornem a seu estado mais estável, processo a partir de agora chamado de extinção, sendo a molécula disponibilizadora de elétrons a extintora (do inglês “quencher”). Lydon *et al.* (1987) descreveram um incremento dose-dependente do alcalóide psicotrópico Δ^9 -tetrahydrocannabinol em plantas de *Cannabis sativa* quando sujeitas à UV. A variação de concentração do alcalóide nessa planta também foi encontrada comparando indivíduos que cresciam em altitudes elevadas (1000 m), onde há maior irradiância de UV-B, e indivíduos oriundos de menores altitudes (250 e 0 m). Essa variação ocorreu de modo direto com a altitude, sugerindo atividade protetora do alcalóide.

1.5 - PSYCHOTRIA

O gênero *Psychotria* pertence à família Rubiaceae, tribo Psychotrieae, sub-família Ruboideae. É constituído por cerca de 1.400 espécies amplamente distribuídas no estrato arbustivo das matas tropicais (Santos, 1999). No sul do Brasil o gênero *Psychotria* é representado pelas espécies: *P. brachyceras*, *P. umbellata*, *P. kleinii*, *P. suterella*, *P. birotula*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. carthagenensis*, *P. nitidula*, *P. harconifolia*, *P. longipes*, *P. mapourides*, *P. nuda*, *P. pubigera*, *P. sessilis*, *P. stachioides*, *P. vellosiana* e *P. tenerior* (Santos, 1999).

Ainda segundo a revisão do autor, no gênero *Psychotria*, os alcalóides são derivados em sua maioria do aminoácido triptofano, sendo principalmente do tipo polindólico ou derivados metiltryptamínicos.

A presença de alcalóides e outras substâncias bioativas no gênero *Psychotria* tem despertado interesse. No Brasil, principalmente, a pesquisa desse gênero foi motivada pelo uso de duas espécies, *P. viridis* e *P. carthagenensis* na preparação do daime, uma bebida alucinógena usada para fins religiosos e medicinais pelos caboclos da Amazônia, e, mais recentemente, pela atividade analgésica apresentada pelas espécies *P. colorata* e *P. umbellata*.

1.6 - PSYCHOTRIA BRACHYCERAS

Psychotria brachyceras Mull. Arg. é um arbusto de até 3 metros de altura de distribuição bastante ampla. Seu maior desenvolvimento é encontrado em zona próxima ao litoral, especialmente entre os municípios de Osório e Torres - RS, em Mata de Planície Costeira, onde atinge 3 metros de altura e tem floração mais exuberante do que em outros locais (Dillenburg & Porto, 1985).

A planta produz o alcalóide monoterpêno indólico Braquicerina (Fig. 1, Kerber *et al*, 2000). O alcalóide possui estrutura inédita, pois não é um derivado da secologanina, como é geralmente aceito para os alcalóides indólicos, e sim da 1-*epi*-loganina. A estrutura final do alcalóide é resultado da condensação da substância triptamina, resultado da descarboxilação do aminoácido triptofano, com a 1-*epi*-loganina, proveniente da rota dos terpenos. Outra característica marcante é a manutenção de uma glicose ligada em sua porção terpênica, o que é incomum na forma final dos alcalóides conhecidos. Esse alcalóide mostrou atividade antiinflamatória específica em testes de migração de leucócitos de ratos (A. T. Henriques, comunicação pessoal), tendo portanto valor farmacológico potencial.

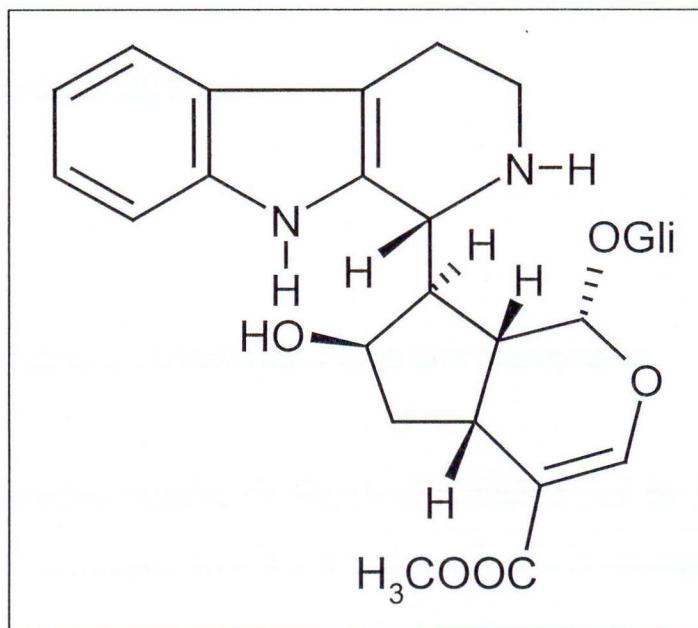


Figura 1 - Estrutura do alcalóide monoterpeneo indólico Braquicerina.

1.7 - OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Avaliar um possível papel protetor do alcalóide Braquicerina contra danos diretos e/ou indiretos causados por irradiação com UV.
2. Determinar, qualitativa e quantitativamente, a resposta da planta à elicitación por dano mecânico quanto à acumulação do alcalóide nos tecidos foliares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - OBTENÇÃO DAS ESTACAS DE *Psychotria brachyceras*

Foram coletadas estacas de *Psychotria brachyceras* de aproximadamente 10 centímetros de comprimento e 4 a 6 folhas na trilha do “mato longo” e na trilha do “Cauê” do morro Santana, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS. As estacas foram lavadas sob água corrente e um segmento dos caules (1 cm) foi cortado na base da estaca sob água destilada para evitar cavitação do xilema.

As estacas passaram por um pulso de 7 dias em meio hidropônico de indução de enraizamento composto de solução aquosa de sais MS (Murashige & Skoog, 1962) a 10% da concentração do protocolo original e sem a adição dos componentes orgânicos da fórmula. Esta solução foi suplementada com a auxina ácido indol-butírico (AIB) na concentração de 10 mg.L⁻¹ nos 7 dias de indução, sendo trocada por outra solução sem a auxina após o período. As estacas permaneceram 60 dias na solução MS sem fitormônio para desenvolvimento de raízes adventícias.

2.2 – ENSAIOS COM UV

2.2.1 – Exposição dos clones à UV

As estacas utilizadas para experimento de exposição à UV passaram, após os dois meses de enraizamento, por aclimação em solução hidropônica contendo sais MS (Murashige & Skoog, 1962) a 10% do protocolo original, exceto os componentes orgânicos, que não foram adicionados. Após 10 dias de aclimação em sala de cultivo ($28 \pm 2^\circ\text{C}$; aproximadamente $73 \mu\text{mol}$ de radiação fotossinteticamente ativa) foram expostas à luz branca suplementada com UV por 16 horas ($10,5 \text{ kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ médios de energia de UV por área) ou 4 horas ($2,6 \text{ kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$) diárias em câmara de UV, um compartimento cúbico de 60 cm de aresta com paredes de acrílico dotada de lâmpada germicida UV Philips (rica em UV-C, com emissão luminosa máxima em $\lambda=254 \text{ nm}$) com aproximadamente $22 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ de intensidade luminosa. Plantas controle foram mantidas apenas sob luz branca. Foram coletadas três repetições de amostras de folhas das estacas em cada repetição no dia zero e a cada dois dias de estresse nos três tratamentos. As repetições continham três folhas aleatoriamente escolhidas. A repetição deste experimento foi feita com estacas retiradas do campo sem raízes, aclimatando-as por 10 dias em solução MS e expondo-as aos tratamentos, com o objetivo de averiguar se a produção do alcalóide necessita da presença das raízes.

2.2.2 – Ensaio de atividade de extintor de oxigênio *singlet*

2.2.2.1 – Caracterização dos reagentes utilizados

O método utilizado para quantificar a atividade extintora de $^1\Delta_g\text{O}_2$ baseou-se nas propriedades da molécula rubreno. Este composto é um hidrocarboneto de cor laranja que reage com $^1\Delta_g\text{O}_2$ para formar um fotoperóxido incolor (Fig. 2.1, Monroe, 1977). O rubreno realiza tanto a função deceptor de $^1\Delta_g\text{O}_2$ quanto de fotossensibilizador, ou seja, absorve a energia dos fótons irradiados na forma de UV* e a cede ao O_2 presente no ambiente, fazendo com que atinja o estado excitado.

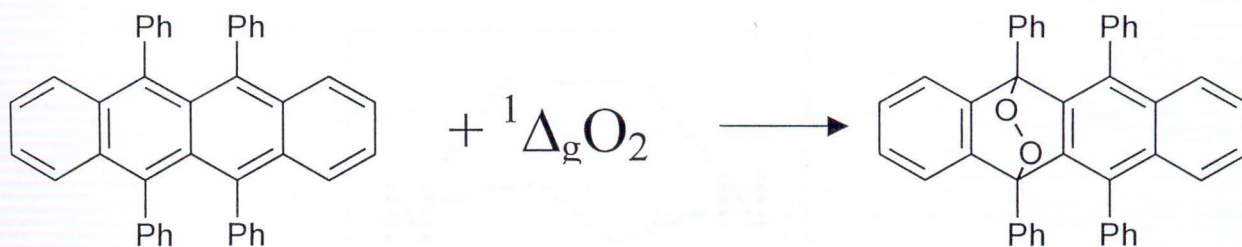


Figura 2.1 - Reação de endoperoxidação do rubreno em presença de oxigênio *singlet*. Ph representa um anel fenólico.

* OU LUZ VISÍVEL

Adicionando-se à solução de rubreno uma molécula com atividade extintora de $^1\Delta_g\text{O}_2$ e expondo a solução à UV, seis reações químicas acontecem. Uma de excitação de rubreno a rubreno *singlet*, duas nas quais acontece a transferência de energia do rubreno ao O_2 e três reações independentes de decaimento do $^1\Delta_g\text{O}_2$: decaimento não-radioativo a O_2 , reação de endoperoxidação do rubreno e captura do $^1\Delta_g\text{O}_2$ pela molécula dotada desta capacidade adicionada à solução.

No controle positivo deste ensaio usou-se a molécula DABCO (1,4-diazobicyclo-[2,2,2]octano, Fig. 2.2). DABCO é uma amina terciária que tem sido muito usada em estudos com $^1\Delta_g\text{O}_2$ por ser altamente ativa em sequestrar esta ERO (Larson & Marley, 1984).

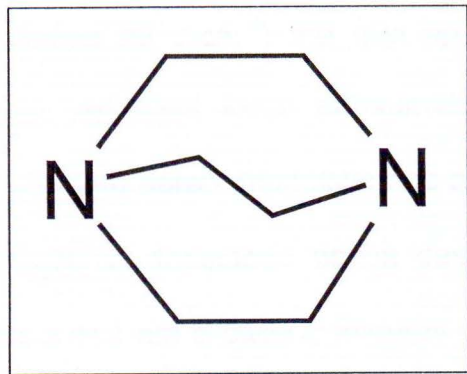


Figura 2.2 - Representação da estrutura da molécula DABCO.

* OU LUZ VISÍVEL

2.2.2.2 – Experimentação com oxigênio *singlet*

As soluções usadas foram: uma solução base de 8×10^{-4} M de rubreno (Acros Organics, Nova Jersey, E.U.A.) em clorofórmio (Nuclear, São Paulo, Brasil), que constituiu o controle negativo; um controle positivo composto da solução base adicionada de 1 mM de DABCO (Acros Organics, Nova Jersey, E.U.A.); e um teste composto da solução base adicionada de 1 mM de Braquicerina autêntica (isolada e purificada de acordo com Kerber *et al.*, 2001). As soluções foram preparadas momentos antes da experimentação. Tanto a preparação das soluções quanto o procedimento experimental foram realizados no escuro com o auxílio de luz amarela, para evitar degradação do rubreno.

Três pequenas placas de Petri, cada uma contendo 5 mL de uma das soluções (controle positivo, negativo e teste), foram irradiadas com UV simultaneamente em uma câmara de acrílico dotada de lâmpada germicida UV Philips (aproximadamente 22 J.cm^{-2}) até que aproximadamente um quarto do rubreno presente nas amostras fosse consumido. As placas permaneceram abertas para que o oxigênio aéreo difundisse nas amostras e estivesse disponível para conversão a $^1\Delta_g\text{O}_2$. A densidade óptica das amostras antes e depois da irradiação foi medida a 440 nm a cada 2 minutos em espectrofotômetro Cintra 5, utilizando-se como parâmetro a solução de rubreno mantida no escuro. Com base na leitura de absorvância, foi calculada a concentração de rubreno nas amostras segundo a equação de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde:

- A = leitura de absorvância da solução a 440 nm;
- ϵ = densidade óptica das amostras (=2300);
- b = distância percorrida pela luz no interior da cubeta (=1cm)
- c = concentração de rubreno na amostra (M);

A partir desses dados a constante de captura das moléculas extintoras foi calculada conforme a equação abaixo (Monroe, 1977):

$$k_q = \frac{k_{ox} ([R]_F^Q - [R]_F^0) + k_d \ln ([R]_F^Q / [R]_F^0)}{[Q] \ln ([R] / [R]_F^Q)}$$

Onde:

- k_q = constante de captura de $^1\Delta_gO_2$;
- $[R]_F^Q$ = concentração final de rubreno na solução com extintor (M);
- $[R]_F^0$ = concentração final de rubreno na solução sem extintor (M);
- $[R]$ = concentração inicial de rubreno (M);
- $[Q]$ = concentração de extintor (“quencher”) (M);
- k_{ox} = constante de razão de adição de $^1\Delta_gO_2$ ao rubreno;
- k_d = constante de decaimento do $^1\Delta_gO_2$.

2.3 ENSAIOS COM DANO MECÂNICO

Após 2 meses de enraizamento, estacas com raízes foram tratadas como segue: duas de suas folhas foram danificadas com tesoura de modo que os cortes fossem paralelos às nervuras que se ramificam diretamente a partir da nervura central da folha. Duas folhas diferentes foram esmagadas com pinça na mesma orientação em que as primeiras foram cortadas. As duas folhas restantes foram deixadas intactas. Uma das folhas danificadas com tesoura teve sua extremidade removida.

As estacas controle não sofreram qualquer dano. Amostras de folhas foram coletadas a 0 e a cada 48 horas após o dano nos dois tratamentos. A repetição desse experimento incluiu, além do protocolo mencionado, um protocolo de análise regional (local ou sistêmica) da acumulação do alcalóide. O objetivo desse protocolo foi a análise da distribuição do alcalóide nas folhas da estaca após dano mecânico, distribuição essa elicitada por dano em apenas uma folha. O órgão que sofreu o dano, a folha oposta à que sofreu o dano posicionada no mesmo nó e as folhas de nós diferentes foram coletadas nos tempos citados acima e os extratos alcaloídicos analisados separadamente.

2.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas em ambos os experimentos foram analisadas como segue. Foi feito o extrato metanólico das folhas macerando as mesmas com pilão em almofariz em nitrogênio líquido, adicionando metanol (grau HPLC) ao macerado, ultrassonicando por 30 minutos e centrifugando por 10 minutos. O sobrenadante foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography, HPLC) da marca Watters Alliance 2690 com coluna de fase reversa Merck Hibar C₈ (tamanho de partícula 0,5 µm) equipada com uma pré-coluna C₈. Usou-se como fase móvel um gradiente líquido iniciando em proporção de metanol:água:ácido trifluoroacético de 35:65:0,05 e terminando em 100:0:0,05 após 20 minutos de corrida. Os compostos eluídos foram analisados por um detector UV de 200 a 400 nm (Waters Millenium versão 2.15.01) com leitura a cada 1 segundo com resolução de 4.8 nm. Uma curva padrão externa foi utilizada para obter a quantificação, e a identidade e pureza da Braquicerina foram baseados no tempo de retenção, espectro de UV e co-cromatografia com Braquicerina autêntica.

A quantidade de Braquicerina em gramas presente na amostra foi calculada medindo a área do pico do cromatograma correspondente aos 11 minutos, tempo no qual o padrão do alcalóide elui da coluna.

Os tecidos vegetais dos quais foi feito o extrato foram secos em estufa a 60 °C por 7 dias mantendo a identificação de proveniência das amostras. Após isso foram pesados em balança analítica eletromecânica. Os valores em gramas da Braquicerina e do peso seco foram usados para gerar o valor de percentagem de Braquicerina por peso seco.

2.5 - TESTES ESTATÍSTICOS

O teste estatístico utilizado foi a análise de variância simples ou fatorial (UV x tempo), tendo sido verificada graficamente a normalidade da distribuição dos dados. As médias foram comparadas por teste de Duncan para $P \leq 0,05$. Dados em percentagem foram transformados para raiz quadrada. As medidas do ensaio com $^1\Delta_9O_2$ foram feitas em duplicatas.

3 – RESULTADOS

3.1 - ACÚMULO DE BRAQUICERINA EM FOLHAS DE ESTACAS EXPOSTAS À UV

A elicitação por UV desencadeou um progressivo aumento do conteúdo do alcaloide nas folhas dos clones expostos a 16 horas diárias da radiação (Fig. 3.1).

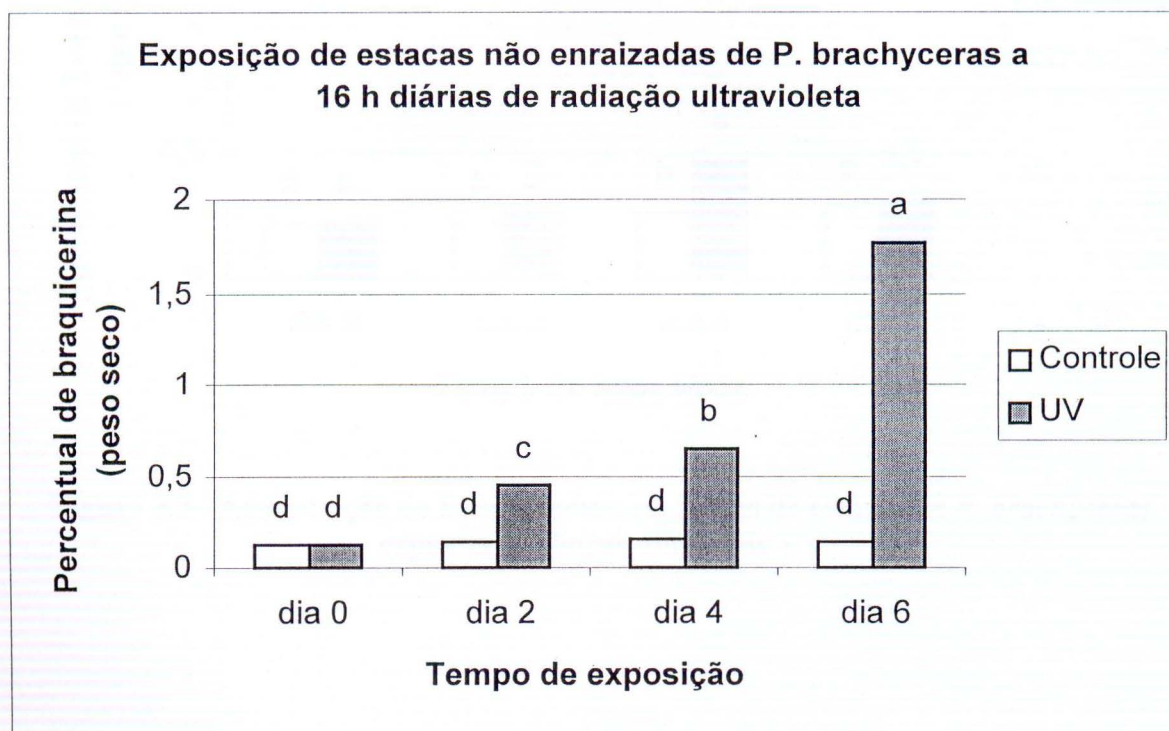


Figura 3.1 - Acumulação de Braquicerina em folhas de estacas de *P. brachyceras* expostas a 16 horas diárias de UV

Exposição das estacas a 4 horas diárias de UV resultou em aumento significativo no quarto dia de tratamento, retornando a níveis controle no sexto dia (Fig. 3.2).

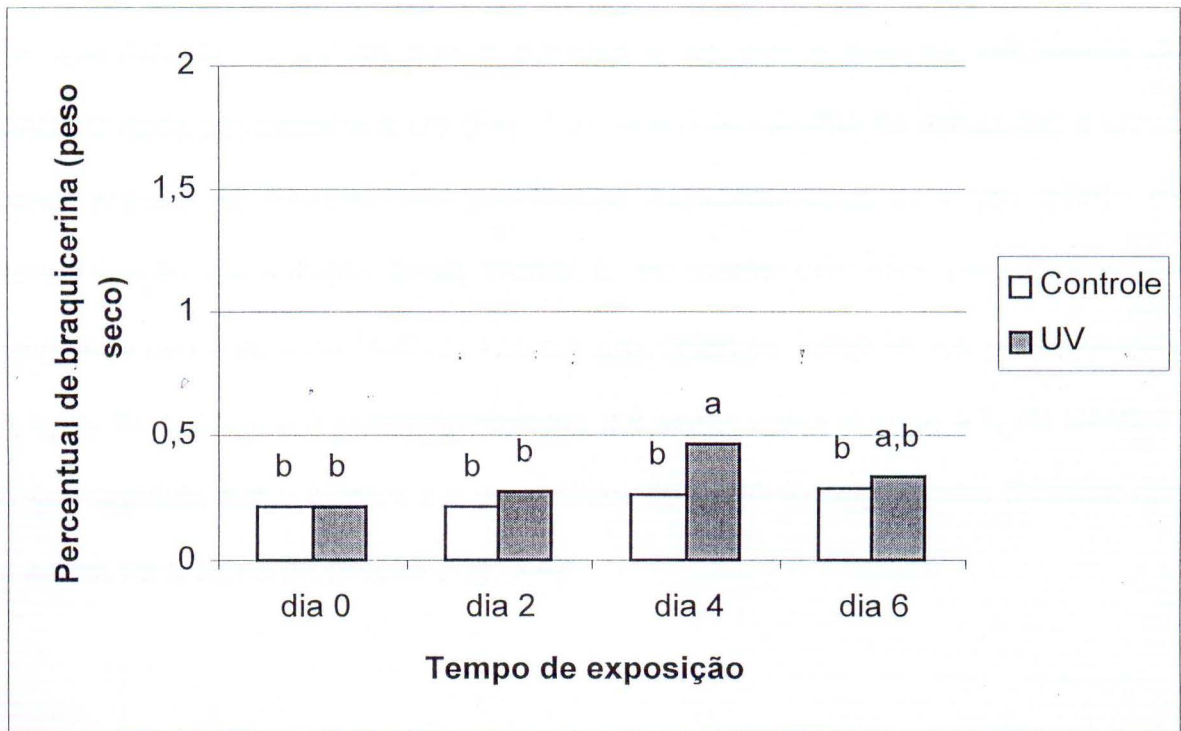


Figura 3.2 –Acumulação de Braquierina em folhas de estacas de *P. brachyceras* expostas a 4 horas diárias de UV

Os controles dos tratamentos 16 e 4 horas mostraram concentrações de Braquicerina semelhantes e constantes nas folhas.

3.2 ATIVIDADE EXTINTORA DE OXIGÊNIO *SINGLET* PELA BRAQUICERINA

A solução de rubreno adicionada de Braquicerina mostrou um decréscimo de absorvância menor do que a controle e do que a solução adicionada de DABCO após ser exposta à UV (Fig. 3.3). Aos dois minutos de exposição à UV, a concentração de rubreno não peroxidado apresentava-se com um quarto da concentração da solução base. Portanto, os dados utilizados para cálculo da constante de captura de $^1\Delta_gO_2$ (k_q) foram provenientes desse tempo de exposição. A k_q da Braquicerina é aproximadamente 2,8 vezes maior do que a k_q do DABCO, o que significa que o alcalóide é um extintor de oxigênio *singlet* mais eficiente que a amina na mesma proporção (Fig. 3.4).

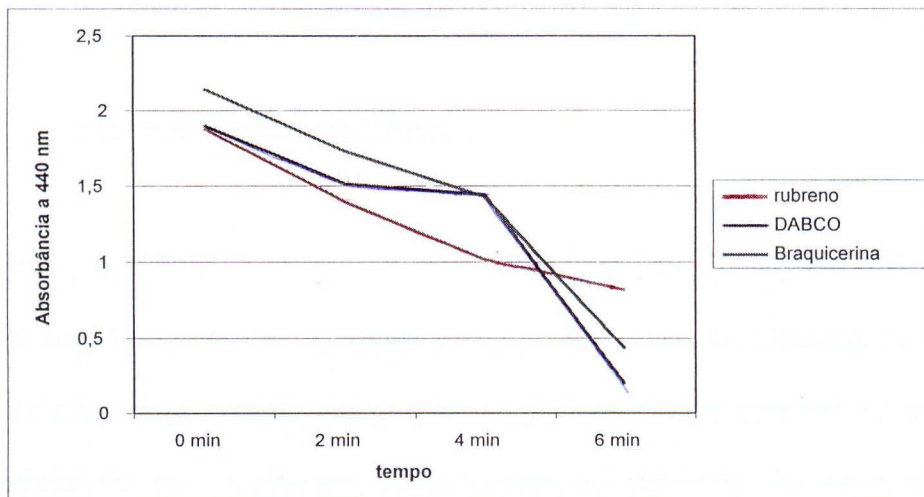


Figura 3.3 - Variação da absorbância das soluções de rubreno com e sem presença de extintor de oxigênio *singlet* em relação ao tempo de exposição à UV

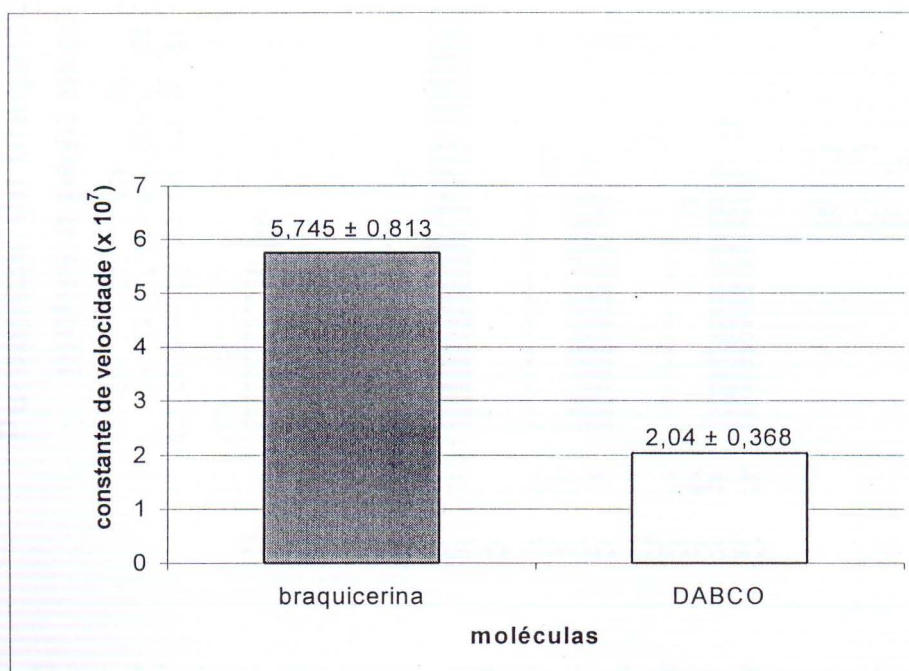


Figura 3.4 - Constante de velocidade calculada para as moléculas extintoras de oxigênio *singlet*

3.3 ELICITAÇÃO POR DANO MECÂNICO

O dano mecânico causou um incremento na concentração da Braquicerina nas folhas estatisticamente significativo após 48 horas de tratamento (Fig. 3.5). Este incremento teve caráter transitório, já que os dados obtidos 72 e 96 horas após a elicitação se mostraram semelhantes ao controle. As estacas controle permaneceram com concentração constante de alcalóide nas folhas no decorrer do experimento.

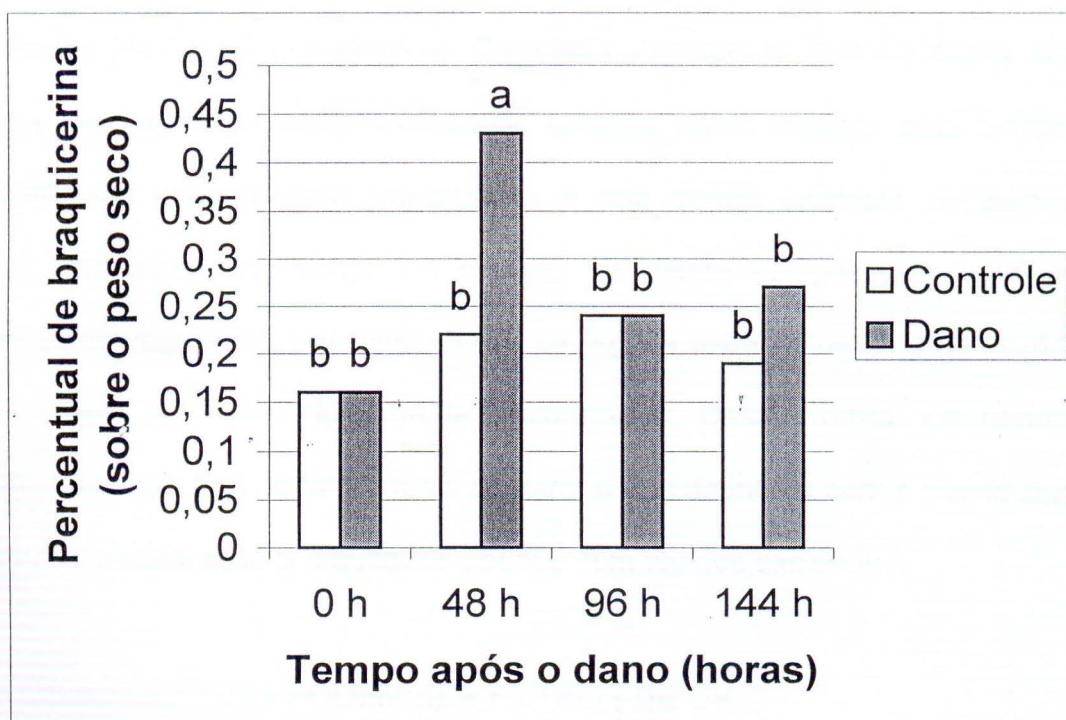


Figura 3.5 - Variação da concentração do alcalóide Braquicerina em folhas de estacas de *Psychotria brachyceras* após elicitação com dano mecânico.

4 – DISCUSSÃO

4.1 – PROPAGAÇÃO CLONAL COMO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO

Concentrações semelhantes de Braquicerina foram encontradas em folhas de estacas de *P. brachyceras* enraizadas em sala de cultivo e em folhas retiradas de indivíduos da espécie encontrados no Morro Santana e imediatamente analisadas (dados não mostrados). Com isso, concluiu-se que os dados obtidos através de experimentação usando-se estacas como modelo não sofrem de interferências experimentais importantes e não geram artefatos de técnica. A estaca enraizada representa um modelo de planta completa em estágio de crescimento vegetativo, possuindo todos os órgãos espacialmente organizados da forma como são mais tipicamente encontrados. Dessa forma, os resultados conseguidos refletem de forma mais próxima o que acontece com a planta zigótica adulta em comparação a resultados obtidos com tecidos excisados.

4.2 – OS ALCALÓIDES PODEM SER FILTROS DE UV

Relacionando-se as estruturas conhecidas dos alcalóides, nota-se que a maior parte delas é composta de núcleos aromáticos altamente absorventes de

UV (Henriques *et al.*, 2002), por isso sua função como protetores dessa radiação tem sido fortemente sugerida. Lydon *et al* (1987), após observarem visível acréscimo do conteúdo de Δ^9 -tetrahydrocannabinol em seus experimentos com *Cannabis sativa*, concluíram que a acumulação induzível do alcalóide sugere fortemente um papel protetor contra UV especialmente em tecidos relacionados à reprodução, como as brácteas florais, apesar de não atribuírem a tolerância à radiação exclusivamente aos alcalóides da planta.

Irradiação com UV gera acumulação de Braquicerina nas folhas de estacas irradiadas. A biossíntese da molécula pode ser realizada de diferentes formas: nas raízes, sendo o produto translocado para a parte aérea, como ocorre com os alcalóides de *Nicotiana tabacum* (De Luca & St Pierre, 2000), ou nas folhas, ou ainda em ambos. A primeira e a terceira hipóteses não têm suporte nos experimentos realizados por nosso grupo, já que calos rizogênicos da espécie não produzem quantidades detectáveis por HPLC de Braquicerina, mesmo após tratamento com UV (dados não mostrados). O alcalóide também não foi encontrado no extrato das raízes das estacas nem de plantas crescidas no Morro Santana (dados não mostrados). Outro resultado que não corrobora a primeira hipótese é o obtido com a repetição do experimento de irradiação com UV, realizado com estacas não enraizadas. Os dados obtidos foram semelhantes aos do primeiro experimento, no qual foram usadas estacas enraizadas.

Supondo que o aumento do conteúdo foliar de Braquicerina observado nas estacas poderia ser causado por realocação do alcalóide das folhas que caíam no decorrer do experimento para as folhas ainda fixas ao caule (De Luca & St Pierre,

2000), o conteúdo de Braquicerina dessas folhas caídas no tratamento de irradiação por UV foi quantificado. A concentração do alcalóide mostrou-se igualmente alta (dados não mostrados), evidenciando que ocorre síntese *de novo* de Braquicerina quando as folhas da planta são expostas à UV.

Traçando o espectro de absorção luminosa da molécula de Braquicerina, observa-se que os valores máximos de absorção (226 e 280 nm, Kerber *et al.*, 2000) estão contidos nas faixas de comprimentos de onda correspondentes à luz UV-C e UV-B. Outro dado interessante é observado relacionando-se os dados mostrados na Figura 3.1 e na Figura 3.2, onde se observa que o acréscimo da concentração de Braquicerina varia de forma proporcional, dose-dependente, com o período de luz UV ao qual as estacas estão sujeitas. Os dados das Figuras 3.1 e 3.2, tanto individual quanto conjuntamente interpretados, sugerem um papel protetor da Braquicerina contra danos diretos causados por UV nas folhas, de forma a impedir a penetração da luz nos tecidos do órgão. Para confirmar essa hipótese deverão ser feitos experimentos usando-se fontes ricas em UV-B.. Em *Catharanthus roseus*, existe uma região responsiva à UV-B na região promotora da enzima Triptofano Descarboxilase, uma das responsáveis pela biossíntese da ampla variedade de alcalóides monoterpreno indólicos presente na planta (De Luca & Laflamme, 2001). Essa enzima está na rota sugerida para biossíntese de Braquicerina, podendo ser regulada pelo mesmo mecanismo.

4.3 – BRAQUICERINA É UM EXTINTOR EFICIENTE DE OXIGÊNIO *SINGLET*

Espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas de diversas formas. O oxigênio *singlet* é mais frequentemente gerado em laboratório por reações de fotossensibilização. Se certas moléculas são iluminadas com luz de comprimento de onda correto, elas a absorvem e a energia modifica a molécula para um estado excitado. A energia de excitação pode então ser transferida para uma molécula de O₂ adjacente, convertendo-a para o estado *singlet*, enquanto a molécula fotossensível retorna a seu estado mais estável (Halliwell & Gutteridge, 1999).

As reações de fotossensibilização são importantes em muitas situações biológicas, especialmente em cloroplastos, que contêm clorofilas e uma alta concentração de O₂. Pigmentos como clorofilas, quinonas e ficobiliproteínas têm absorção de UV, agindo como fotossensibilizadores na formação de ¹Δ_gO₂ (He & Häder, 2002). Além disso, o decréscimo da atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) causada por UV desencadeia uma inibição do ciclo de Calvin. Com isso, é bloqueada a reoxidação do NADPH e a energia dos elétrons excitados pela absorção de luz é transferida para o O₂ ambiente levando à formação de ¹Δ_gO₂ no fotossistema II (Grassmann *et al.*, 2002; He & Hader, 2002).

Muitas funções têm sido atribuídas aos alcalóides, principalmente as ecoquímicas. No entanto, várias drogas alcaloídicas são eficientes como inibidores de peroxidação lipídica *in vitro* causada por ¹Δ_gO₂, segundo Larson e Marley

(1984). Os autores encontraram diversos alcalóides com propriedades extintoras de $^1\Delta_g\text{O}_2$ semelhantes ou até melhores que o DABCO, reagente de eficiência conhecida. Entre esses alcalóides estão a nicotina, atropina, estricnina e brucina, alguns há muito isolados e caracterizados. Os alcalóides talvez sejam destruídos por reações oxidativas e repostos de forma rápida no "turnover", deste modo protegendo as estruturas celulares contra EROs.

O alcalóide de *P. brachyceras*, Braquicerina, revelou forte afinidade por $^1\Delta_g\text{O}_2$ em ensaio específico *in vitro*. A porção indólica da molécula parece ser a responsável por essa atividade, mais especificamente o anel benzênico. A natureza eletrofílica do $^1\Delta_g\text{O}_2$ resulta em reações químicas com compostos dotados de ligas duplas ou grupos funcionais ricos em elétrons (Knox & Dodge, 1984). Essa afinidade pode implicar um papel protetor contra $^1\Delta_g\text{O}_2$ *in vivo*.

4.4 – O DANO MECÂNICO AUMENTA TRANSITORIAMENTE O CONTEÚDO FOLIAR DE BRAQUICERINA

Geralmente, os alcalóides não são os principais responsáveis pela defesa vegetal, visto que estão presentes em apenas 20% das angiospermas e estão praticamente ausentes em samambaias, musgos e gimnospermas (Harbone, 1997). Entretanto, experimentos com dano mecânico têm acusado aumento tanto na quantidade de alcalóides, em plantas que os produzem, quanto na atividade de suas rotas de biossíntese.

A elicitação por dano mecânico causou aumento da transcrição do gene que codifica para a enzima putrescina *N*-metil transferase de *Nicotiana tabacum* (Sachan & Falcone, 2002), responsável pelo primeiro passo da síntese dos alcalóides pirrolizidínicos da planta. Em folhas de pimenta, a enzima chiquimato desidrogenase apresentou maior atividade após a indução por dano mecânico (Díaz & Merino, 1998). A enzima é central na rota de biogênese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, substratos para síntese biológica de muitos alcalóides, inclusive Braquicerina, derivada deste último.

Triptofano Descarboxilase (TDC) é a enzima-chave na biossíntese dos alcalóides indólicos, já que perfaz a inter-relação entre o metabolismo primário e o secundário (Facchini *et al.*, 1999). A enzima é ativada tanto por dano mecânico quanto por sinalização de jasmonatos, que desencadeiam produção dos fatores de transcrição da família ORCA (do inglês octadecanoid-responsive *Catharanthus* APETALA2/domain protein, Memelink *et al.*, 2001). Superexpressão de ORCA3 aumentou a expressão de TDC e outros genes da biossíntese de alcalóide de *Catharanthus roseus*. A rota proposta para a biossíntese de Braquicerina inclui a TDC, já que a triptamina, produto da enzima, é aparentemente necessária para a biogênese do alcalóide. Portanto, uma explicação possível para o aumento da concentração foliar de Braquicerina em *P. brachyceras* é a sinalização dependente de jasmonatos desencadeada por dano mecânico.

A acumulação de Braquicerina nas estacas teve um caráter transitório, similar ao observado em folhas de *Nicotiana* sp. (Buchanan *et al.* 2000),

retornando aos valores iniciais 72 horas após o tratamento. A produção do alcalóide pela planta pode ser um processo custoso, necessitando drenar muitos recursos que não são de fácil aquisição em condições naturais, como o Nitrogênio. O protocolo de análise regional de distribuição do alcalóide demonstrou que a concentração foliar de Braquicerina aumenta especificamente no órgão que sofreu dano, através de biossíntese *de novo* do alcalóide (dados não mostrados). Através disso, a planta pode estar restringindo a produção do alcalóide, diminuindo ao máximo os custos metabólicos do mesmo, ou seja, evitando o uso desnecessário de carbono e nitrogênio. Ainda no âmbito de economia metabólica, a translocação das reservas de alcalóide de folhas adjacentes para a folha que sofreu o dano seria um mecanismo menos custoso para estabelecer acúmulo órgão-específico do alcalóide (De Luca & St Pierre, 2000), no entanto não foi encontrada evidência desse processo nas folhas de *P. brachyceras*. Os custos de armazenamento podem estar sujeitos à seleção natural (Agrawal & Karban, 1999), de forma que o balanceamento entre uma estratégia de defesa eficiente e uma economia de recursos é fundamental para a sobrevivência em um ambiente competitivo.

5 – CONCLUSÕES

1. O Acúmulo de Braquicerina é induzido por UV-C e por dano mecânico em tecidos foliares de *P. brachyceras*, independente da presença de raízes;
2. A Braquicerina é capaz de extinguir oxigênio *singlet in vitro* com alta eficiência;
3. A produção do alcalóide para estudos farmacológicos pode ser aumentada com manejo das plantas por exposição à UV ou dano mecânico;
4. Tomados em conjunto, os dados obtidos sugerem um papel protetor *in vivo* contra EROs.

6 – PERSPECTIVAS

Para subsidiar ainda mais a confirmação da hipótese de que a Braquicerina desempenha um papel importante na proteção das folhas de *P. brachyceras* contra danos oxidativos causados por UV, ensaios de quantificação da expressão do gene da enzima TDC (*TDC*) estão sendo feitos a partir de folhas da planta previamente expostas à UV comparando com folhas controle não expostas. Sabendo-se que provavelmente o produto dessa enzima é um precursor direto da molécula de Braquicerina e que sua atividade desvia produtos do metabolismo primário diretamente para o secundário, a caracterização de sua regulação poderá responder várias perguntas relacionadas ao controle da biossíntese de Braquicerina na planta.

Para testar o papel protetor da Braquicerina contra estresse oxidativo *in vivo*, serão feitas medições da concentração de malondialdeído, um sub-produto da oxidação de lipídios de membrana causada por EROs, nos tecidos da planta após ser submetida à UV. Ensaio como esse são pertinentes para estudo da ação do alcalóide em ambiente oxidante no contexto biológico.

A regulação da biossíntese do alcalóide Braquicerina poderá ser melhor compreendida por aplicações de jasmonatos diretamente nas folhas e quantificando tanto a acumulação do alcalóide quanto à transcrição de *TDC*. Os resultados desses experimentos serão importantes para entendimento do papel do alcalóide em relação ao ataque de herbívoros.

7 - BIBLIOGRAFIA

- AGRAWAL, A. A.; KARBAN, R. 1999. Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. In: TOLLRIAN, R.; HARVELL, C. D. **The Ecology and Evolution on Indutible defenses**, Princeton University Press, Princeton, p. 45-61.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: An historical perspective. **Plant Science** n. 161, p. 839-851.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 1367 p.
- CZAPEK, F. 1921. Spezielle Biochemie, **Biochemie der Pflanzen**. Vol. 3, G. Fischer Jena, p.369.
- DE LUCA, V.; ST-PIERRE, B. 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, vol 5, n. 4, p. 168-173.
- DE LUCA, V.; LAFLAMME, P. 2001. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 4, p. 225-233.
- DÍAZ, J.; MERINO, F. 1998. Wound-induced Shikimate Dehydrogenase and Peroxidase Related to Lignification in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Leaves. **Journal of Plant Physiology**, vol. 152, p. 51-57.

- DILLENBURG, C.; PORTO, M. L. 1985. Boletim do Instituto de Biociências – n° 39. UFRGS, Porto Alegre, 82 p.
- FACCHINI, P.J.; HUBER-ALLANACH, K. L.; TARI, L. W. 1999. Plant aromatic L-aminoacid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. **Phytochemistry**, n. 54, p. 121-138.
- GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F. 2002. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress.
- HARBONE, J. B. 1997. Plant Secondary Metabolism. In: CRAWLEY, M. J. **Plant Ecology**. Oxford University Press, 2ª ed., Oxford, 717 p.
- HE, Y.; HÄDER, D. 2002. UV-B induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp.: protective effects of ascorbic acid and *N*-acetyl-L-cysteine. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, n. 66, p. 115-124.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ª ed, Oxford University Press, Oxford, 936 p.
- HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. 2002 Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Ed Universidade UFRGS/Ed. da UFSC. Cap 29, p. 651-666.
- HOLLÓSY, F. 2001. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. **Micron**, vol. 33, 197-197.

- KOSSEL, A. 1891. Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle Archiv für Physiologie. P. 181-186.
- JANSEN, M. A. K; GABA, V.; GREENBERG, B. M. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in plant science** vol. 3, n. 4.
- KERBER, V. A.; GREGIANINI, T. S.; PARANHOS, J.; SCHWAMBACH, J.; FARIAS, F.; FETT, J. P.; FETT-NETO, A. G.; ZUANAZZI, J. A. S.; QUIRION, J.; ELISABETSKY, E.; HENRIQUES, A. T. 2001. Brachycerine, a Novel Monoterpene Indole Alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Natural Products**, vol. 64, n° 5, p. 677-679.
- KNOX, J. P.; DODGE, A. D. 1985. Singlet Oxygen and Plants. **Phytochemistry**, vol. 24, n. 5, p. 889-896.
- LARSON, R. A.; MARLEY, K. A. 1984. Quenching of Singlet Oxygen by Alkaloids and Related Nitrogen Heterocycles. **Phytochemistry**, vol. 23, n°10, p. 2351-2354.
- LIECHTI, R.; FARMER, E. E. 2002. The Jasmonate Pathway. **Science**, vol 296, p. 1649-1650.
- LYDON, J.; TERAMURA, A.; COFFMAN, C. B. 1987. UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two *Cannabis sativa* chemotypes. **Photochemistry and Photobiology**, vol. 46, n. 2, p. 201-206.
- MEMELINK, J.; VEPOORTE, R.; KIJNE, J. W. 2001. ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. **Trends in Plant Science**, vol. 6, n. 5, p. 212-219.

- MONROE, B. M. 1977. Quenching of Singlet Oxygen by Aliphatic Amines. **Journal of Physical Chemistry**, vol. 81, n° 19, p. 1861-1864.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, n. 15, p. 709-714.
- SACHAN, N.; FALCONE, D. L. 2002. Wound-induced gene expression of putrescine *N*-methyltransferase in leaves of *Nicotiana tabacum*. **Phytochemistry**, n. 61, p. 797-805.
- SANTOS, L. V. 1999. *Psychotria suterella* Mull. Arg.: Caracterização dos alcalóides, análise farmacológica e cultivo *in vitro* de calos e raízes. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 116 p.
- SANTOS, R. I. 2002. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Ed Universidade UFRGS/Ed. da UFSC. Cap 16, p. 333-364.
- WITTSTOCK, U.; GERSHENZON, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role on defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 5, p. 1-8.
- ZUANAZZI, J. A. S. 2002. Flavonóides. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Ed Universidade UFRGS/Ed. da UFSC. Cap. 23, p. 499-526.