

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Papel do alcalóide *N*, β -D-glicopiranosil vincosamida na resposta a dano mecânico e herbivoria em *Psychotria leiocarpa* Cham & Schlttdl.

Hélio Nitta Matsuura

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

Dissertação

Porto Alegre

Março de 2012

Hélio Nitta Matsuura

Papel do alcalóide *N,β*-D-glicopiranosil vincosamida na resposta a dano mecânico e herbivoria em *Psychotria leiocarpa* Cham & Schltdl.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Botânica

Orientador: Arthur Germano Fett-Neto

Porto Alegre

2012

Local de execução e instituições financiadoras

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Botânica e ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca examinadora

Dr. Luís Mauro Gonçalves Rosa

Faculdade de Agronomia, Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dra. Joséli Schwambach

Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Instituto de Biotecnologia
Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Dr. Diogo Denardi Porto

Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Laboratório de Biologia Molecular Vegetal
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dra. Naíla Cannes do Nascimento

Membro suplente da banca examinadora

Departamento de Patobiologia Comparada, Laboratório de Hemoplasmas
Universidade de Purdue (Indiana, EUA)

Dra. Janette Palma Fett

Membro suplente da banca examinadora

Instituto de Biociências, Departamento de Botânica/ Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dê-me um ponto de apoio e moverei o Mundo (Arquimedes)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao Arthur pela orientação e confiança ao longo de todos esses anos de Fisiologia Vegetal e por ser um exemplo de dedicação e ética profissional.

Ao Diogo, por todo conhecimento que me passou, foram de grande valia na execução deste projeto.

Aos ICs Ricardo e Bianca que me auxiliaram neste período e contribuíram, cada um a sua maneira, em minha formação pessoal e profissional.

A todo o pessoal do laboratório de Fisiologia Vegetal por tornar o ambiente de trabalho um lar, mesmo que muitas vezes conturbado.

À banca examinadora pela disponibilidade, prontidão e paciência.

À Profa. Dra. Amélia Teresinha Henriques e ao Laboratório de Farmacognosia pelo uso do MPLC, fundamental em uma das etapas da purificação de GPV, e conseqüentemente, todo o andamento do mestrado.

À Anna, por acidentalmente quase estragar semanas de trabalho, e exatamente ao mesmo tempo, poupar meses de trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira e a Carolina Millán Jiménez do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos pelas lagartas (*Heliconius erato*) fornecidas.

A amiga e malacóloga Janine pela consultoria e por nos presentear com muitos exemplares de agradáveis caracóis (*Helix aspersa*).

Aos meus pais e meu irmão, Eizo, Yumi e Eiji, por todo amor incondicional, educação e suporte. À minha avó Harume por existir e ser a dedicação, paciência e bondade em pessoa. Aos mascotes Toti (*in memorian*), Cobi e Sophie pela inesgotável fonte de alegria.

Aos colegas que se tornaram amigos e aos amigos que se tornaram família; e a quem é muito especial. Aos cafés e cupcakes, chás, apostas e sorvetes, cevas e jogatinas, almoços e dias de sol, às caminhadas, e aos jantares; e a quem me faz muito bem e muito feliz.

A todos amigos, novos e antigos, pertos ou distantes. Em especial ao Flávio e a Susa por dividirem um pedacinho de suas vidas comigo, e aos Taniguchi por me incluírem como parte de sua família.

Lista de abreviaturas

- ANOVA:** *Analysis of Variance* (Análise de Variância)
- APG III:** *Angiosperm Phylogeny Group III*
- DAB:** 3,3'-diaminobenzidina
- DW:** *dry weight* (peso seco)
- GPV:** *N,β-D-glicopiranosil vincosamida*
- HPLC:** *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- ICN:** Instituto de Ciências Naturais
- IPP:** isopentenil difosfato
- MEP:** *methylerythritol phosphate* (metileritritol fosfato)
- MIA:** *monoterpene indole alkaloid* (alcalóide monoterpeneo indólico)
- MPLC:** *Medium-Pressure Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Média Pressão)
- NBT:** nitroblue tetrazolium chloride (cloreto de tetrazólio-nitroazul)
- PAL:** *phenylalanine ammonia-lyase* (fenilalanina amônia-liase)
- pH:** potencial hidrogeniônico
- ROS:** *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)
- SPSS:** *Statistical Package for the Social Sciences*
- TBA:** *thiobarbituric acid* (ácido tiobarbitúrico)
- TCA:** *trichloroacetic acid* (ácido tricloroacético)
- TFA:** *trifluoroacetic acid* (ácido trifluoroacético)
- UV:** radiação ultravioleta (comprimentos de onda de 180 nm a 400 nm)
- UV-A:** radiação ultravioleta-A (comprimentos de onda de 320 nm a 400 nm)
- UV-B:** radiação ultravioleta-B (comprimentos de onda de 280 nm a 320 nm)

Resumo

Metabólitos secundários são produzidos por alguns grupos vegetais e são essenciais nas diferentes estratégias de adaptação às adversidades ambientais, atuando na proteção e comunicação das plantas, sendo responsivos a diversos fatores bióticos e abióticos. Entre as diversas categorias de metabólitos secundários, os alcalóides apresentam principal função relacionada à defesa contra herbívoros; atuam também na proteção contra patógenos e na interação química com outras plantas (alelopatia). Alcalóides monoterpênicos indólicos (MIAs) são uma classe de alcalóides de origem biossintética mista, e apresentam propriedades farmacológicas conhecidas (e.g. MIAs de *Catharanthus roseus* e *Rauwolfia serpentina*). MIAs provenientes de algumas espécies de *Psychotria* do Sul do Brasil são descritos como agentes antioxidantes, antimutagênicos, ansiolíticos, antidepressivos, antipsicóticos e analgésicos, apresentando grande potencial farmacológico. *N*, β -D-glicopiranosil vincosamida (GPV) é o alcalóide majoritário de *Psychotria leiocarpa* (Rubiaceae – APG III), apresentando estrutura semelhante a alguns alcalóides bioativos de *Psychotria* da região, com a peculiaridade de ser *N*-glicosilado. No presente trabalho, foi avaliado o efeito de dano mecânico e aplicação de jasmonato sobre o acúmulo de GPV no contexto de um possível papel do alcalóide em respostas à herbivoria, além de propriedades antioxidantes do composto. O teor de GPV se manteve constante após a aplicação dos tratamentos, ao longo de todo o experimento. Portanto, a estratégia de acúmulo deste alcalóide segue o padrão de fitoanticipina. No ensaio de dano mecânico os teores de compostos fenólicos também foram monitorados e se mantiveram constantes. Ensaio de herbivoria utilizando dois modelos generalistas e um especialista, não constataram eficácia do GPV na proteção contra estes predadores. Ensaio de atividade contra oxigênio singlete, ânions superóxido, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio revelaram ampla atividade antioxidante, com alguns resultados similares ao controle positivo (Trolox, um análogo da vitamina E). Os resultados obtidos neste trabalho, juntamente com dados existentes da literatura para metabólitos correlatos, sugerem uma função fundamentalmente antioxidante de MIAs de *Psychotria*, atuando como um modulador de estresse oxidativo.

Palavras chave: alcalóides monoterpênicos indólicos, herbivoria, atividade antioxidante, fitoanticipina, radiação UV-B

Abstract

Some plants groups accumulate secondary metabolites, which may play a major role in different strategies to deal with environmental challenges, being responsive to several biotic and abiotic factors and functioning as protection and communication agents. Among secondary metabolites, alkaloids play a major role as anti-feedant agents and are also involved in pathogen protection and chemical interaction (allelopathy). Monoterpene indole alkaloids (MIAs) are derived from two distinct biosynthetic pathways and possess well known pharmacological properties (e.g. MIAs from *Catharanthus roseus* and *Rauwolfia serpentina*). MIAs from Southern Brazilian *Psychotria* have been characterized as antioxidant, antimutagenic, anxiolytic, antidepressive, antipsychotic and analgesic agents, therefore bearing relevant pharmacological potential. *N*, β -D-glucopyranosil vincosamide (GPV) is the major alkaloid from *Psychotria leiocarpa* (Rubiaceae - APG III) and its structure, besides being additionally glycosylated in the *N* indol ring, is similar to a few bioactive alkaloids from native *Psychotria* species. In the present work, the effects of wounding and jasmonate application on GPV accumulation, and also antioxidant properties, were evaluated in the context of a potential role of the alkaloid in herbivory responses. GPV content remained constant after treatments, at all times of exposure. Therefore, GPV seems to present a phytoanticipin-like accumulation pattern. In the mechanical wounding *assay*, phenolic compounds content was also monitored and remained constant. In two herbivory *assay* models, a generalist and a specialist, GPV was not efficient to prevent herbivore feeding. Singlet oxygen, superoxide anions, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide *assays* showed GPV has broad antioxidant activity, in some cases with activity equivalent to the positive control (Trolox, a vitamin E analog). The results obtained in this work, together with published results from our research group, strongly suggest an antioxidant role for *Psychotria* MIA alkaloids, which may act as oxidative stress modulators.

Key words: monoterpene indole alkaloids, herbivory, antioxidant activity, phytoanticipin, UV-B radiation

Sumário

Lista de abreviaturas.....	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Introdução	1
1.1 Metabolismo secundário.....	2
1.1.1 Terpenos	3
1.1.2 Compostos fenólicos	5
1.1.3 Compostos nitrogenados	5
1.1.3.1 Alcalóides monoterpeneo indólicos	6
1.2 Espécies reativas de oxigênio	7
1.3 <i>Psychotria</i>	7
1.3.1 <i>Psychotria leiocarpa</i>	9
Justificativa	12
Objetivos.....	12
Capítulo I: Alcalóide GPV	13
Discussão geral.....	30
Conclusões	32
Perspectivas.....	32
Referências bibliográficas.....	33
Anexo I: <i>Curriculum vitae</i>	40
Anexo II: Fotoelicitação de metabólitos secundários por UV-B.	43
Anexo III: Alcalóides bioativos de <i>Psychotria</i>.....	46

Introdução

Por apresentarem uma condição sésbil, ao longo do processo evolutivo, diversas e complexas estratégias de proteção e ocupação do habitat foram selecionadas nas plantas, como eficientes agentes de adaptação destes organismos às adversidades do ambiente. Entre estas estratégias de defesa, compostos considerados provenientes do metabolismo primário, como as ceras presentes na cutícula, além da prevenção contra a perda excessiva de água, atuam modulando a refletância e absorbância, auxiliando na proteção contra o excesso de radiação incluindo radiação ultravioleta, podendo variar em sua forma e quantidade (Grant *et al.*, 2003; Krauss *et al.*, 1997). Substâncias como a cutina (presente na cutícula), e a suberina (presente no súber), previnem a entrada de patógenos além de evitar a perda de água, devido à natureza hidrofóbica (Taiz & Zeiger, 2010).

A deposição de cristais de oxalato de cálcio no protoplasma de células especializadas, tanto em partes vegetativas como reprodutivas, ocorre em algumas famílias (Araceae, Aquifoliaceae, Oxalidaceae - APG III) e auxilia a evitar o ataque de herbívoros. Outras formas de proteção, de natureza física, incluem anexos epidérmicos como acúleos ou modificações estruturais na forma de espinhos.

Mecanismos mais complexos podem envolver associações ecológicas, como o caso de algumas espécies de *Cecropia* que abrigam formigas do gênero *Azteca*, altamente agressivas contra invasores, conferindo assim uma vantagem durante o crescimento por afastar herbívoros (Sehupp, 1986), além de propiciarem um maior aporte de nitrogênio proveniente de resíduos dos recursos utilizados pelas formigas (Sagers *et al.*, 2000).

Algumas famílias de plantas desenvolveram uma estratégia adicional e distinta para lidar com a pressão seletiva, envolvendo a produção de metabólitos secundários.

1.1 Metabolismo secundário

Considerando o metabolismo das plantas, é questionável a real validade da separação entre dois tipos de metabolismo (primário e secundário), uma vez que para o organismo que a detém, ambos são essenciais (Firn & Jones, 2009). Classicamente, no entanto, estes termos são utilizados para melhor compreensão, definição e comunicação a respeito do tema.

Metabolismo primário pode ser definido como aquele envolvido diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando em processos como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese protéica, assimilação de nutrientes, diferenciação celular e formação de metabólitos primários (carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos) (Taiz & Zeiger, 2010). Metabolismo secundário não participa diretamente dos processos citados anteriormente, sendo os diferentes compostos secundários restritos a algumas famílias botânicas. A manutenção deste metabolismo requer gastos energéticos consideráveis (alocação de recursos como carbono e nitrogênio), sendo regido por pressões seletivas onde a indução de defesas ocorreria predominantemente em situações energeticamente favoráveis (Stamp, 2003; Macías *et al.*, 2007). A definição mais clássica acerca dos produtos secundários do metabolismo define que os mesmos são compostos formados durante o metabolismo que não são utilizados na formação de novas células (Sachs, 1873 *apud* Hartmann, 2007).

O isolamento da morfina a partir de sementes de papoula em 1806 por Friedrich Wilhelm Sertürner pode ser considerado o início do estudo de compostos secundários. Antes disso, durante muito tempo esses compostos foram considerados rejeito metabólico, produtos da detoxificação ou subprodutos do metabolismo primário. Por volta de 1970, já não eram considerados apenas subprodutos inertes, mas componentes dinâmicos do metabolismo vegetal. Atualmente é aceita sua função indispensável como componente na estratégia de sobrevivência das plantas em diversos ambientes. Há uma enorme diversidade de compostos secundários, compreendendo mais de 200.000 estruturas diferentes (Hartmann, 2007). Os metabólitos secundários nas plantas auxiliam em sua reprodução, dispersão, interações tritróficas, proteção contra herbívoros e patógenos, ou seja, estão diretamente ligados à habilidade da planta de competir e sobreviver no ambiente.

Estratégias de defesa utilizando metabólitos secundários ocorrem tanto diretamente (e.g. conferindo amargor, inibidores de digestão), quanto indiretamente, podendo seus produtos ser percebidos por outros organismos. Neste contexto, metabólitos secundários

podem prevenir ataques futuros (Arimura *et al.*, 2001), incitar a presença de inimigos naturais de seu predador (Choh & Takabayashi, 2006) e atrair polinizadores, em alguns casos fazendo o uso de estratégias mais elaboradas. Por exemplo, o caso de *Ophrys exaltata* que mimetiza feromônios emitidos pelo seu polinizador, porém levemente alterados, sendo mais efetivo na atração das fêmeas que o feromônio emitido pelo próprio macho da espécie o que possivelmente traz vantagem à planta em termos de variabilidade genética (Vereecken & Schiestl, 2008). Por vezes, outros organismos podem utilizar estes sinais químicos para localizar uma planta em uma complexa interação tritrófica, como no processo de ataque de alguns besouros a coníferas (Phillips & Croteau, 1999). Outros organismos co-evoluíram de modo a se beneficiar da propriedade tóxica de muitos metabólitos secundários para proteção própria, sequestrando, incorporando e modificando as moléculas de interesse. Um caso bem estudado deste fenômeno é o acúmulo de substâncias tóxicas (e.g. cardenolídeos) adquiridos através da alimentação de espécies de *Asclepias*, durante o estágio larval de *Danaus plexippus* L. (borboleta-monarca), evitando sua predação por pássaros após a metamorfose (Trigo, 2000; Frick & Wink, 1995); outro caso bem estudado, utilizado por diversas tribos indígenas, são os anuros da família Dendrobatidae que obtêm toxinas através da ingestão de besouros do gênero *Choresine*, que por sua vez modificam substâncias a partir de plantas obtidas em sua alimentação (Dumbacher *et al.*, 2004).

Diversos metabólitos secundários podem ser elicitados por diferentes sinais ambientais, incluindo a radiação UV-B (Zhang & Björn, 2009), que pode ser uma importante ferramenta na indução de compostos de interesse, principalmente devido ao custo relativamente baixo de sua aplicação.

Os metabólitos secundários podem ser didaticamente classificados em três grandes grupos, de acordo com as estruturas químicas dos compostos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Taiz & Zeiger, 2010).

1.1.1 Terpenos

Os terpenos constituem a maior classe dentro dos metabólitos secundários (pelo menos 65000 estruturas já elucidadas) e são derivados de grupamentos de isopentanos ou isoprenos (5 carbonos). Isopentenil difosfato (IPP) é a unidade básica (5 carbonos) utilizada na formação de terpenos e pode ser formada através de 2 vias metabólicas distintas: a rota do

mevalonato (via predominantemente citosólica) e a rota do MEP (metileritritol fosfato) (via predominantemente plastídica) (Fig. 1) (Taiz & Zeiger, 2010).

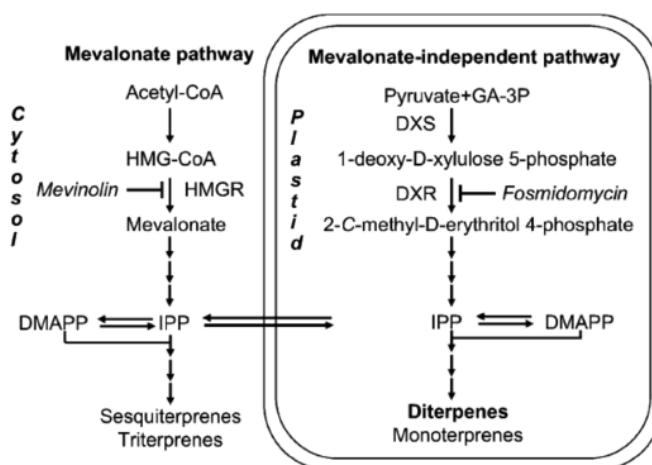


Figura 1: Esquema da rota biossintética de terpenos, retirado de Xiuchun & Jianyong (2005).

Estes metabólitos são caracterizados por sua insolubilidade em água e a classificação dentro deste grupo ocorre de acordo com o número de carbonos utilizados em sua síntese, sendo terpenos de 10 carbonos (2 unidades de IPP) chamados de monoterpenos. Os terpenos contendo 15, 20, 30 e 40 carbonos são denominados respectivamente sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos; acima de 40 carbonos (8 unidades de IPP) são chamados politerpenóides. Sua biossíntese se inicia a partir de acetil-CoA ou intermediários glicolíticos (Taiz & Zeiger, 2010).

As funções das moléculas deste grupo incluem as giberelinas e os brassinosteróides, ambos relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal; carotenóides, importantes no processo fotossintético; e as fitoecdisonas, que interferem no desenvolvimento de insetos. Também entre os terpenos estão os óleos essenciais, que constituem uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, possuindo ação repelente contra insetos bem conhecida. Frequentemente estes óleos essenciais estão localizados em pêlos glandulares projetados acima da epiderme, servindo como um alerta da toxidez da planta (Taiz & Zeiger, 2010). As piretrinas são ésteres monoterpênicos que ocorrem em folhas e flores de espécies de *Chrysanthemum* e apresentam forte ação inseticida, sendo seus análogos sintéticos (piretróides) utilizados na composição de inseticidas comerciais por apresentarem baixa toxidez a mamíferos e não permanecerem no ambiente por muito tempo (Taiz & Zeiger, 2010).

1.1.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem um grupo fenol (hidroxila ligada a um anel aromático). A maioria dos compostos fenólicos é sintetizada através da rota do chiquimato a partir da fenilalanina, envolvendo a enzima fenilalanina amonia liase (PAL) (Taiz & Zeiger, 2010). A enzima PAL está na interface entre o metabolismo primário e secundário, atuando tanto na produção de compostos fenólicos como na síntese de proteínas, não sendo possível que os dois processos ocorram simultaneamente em altas taxas (Jones & Hartley, 1999 *apud* Macías *et al.*, 2007). Dentre as funções descritas para metabólitos desta categoria, a lignina desempenha papel crucial na sustentação e revestimento das plantas. A liberação de alguns compostos fenólicos no solo pode também limitar o crescimento de outras plantas (alelopatia) (Taiz & Zeiger, 2010).

Flavonóides são uma classe de compostos fenólicos caracterizados por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos. São classificados em quatro grupos principais: antocianinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas. As flavonas e flavonóis participam na proteção contra radiação UV; antocianinas são importantes na atração de polinizadores e também podem atuar no processo de proteção à radiação UV-B (Moria *et al.*, 2005); e algumas isoflavonas apresentam atividade antimicrobiana (Taiz & Zeiger, 2010).

Taninos, outra classe de compostos fenólicos, são divididos em dois grupos: taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Essa categoria frequentemente está associada à capacidade de deter a predação por herbívoros. É também relatada propriedade alelopática neste grupo de metabólitos (Taiz & Zeiger, 2010).

1.1.3 Compostos nitrogenados

Compostos nitrogenados são caracterizados por possuírem um átomo de nitrogênio em sua estrutura e apresentarem características frequentemente alcalinas no caso de alcalóides. Em pHs comumente observados no citosol (pH 7,2) e vacúolo (pH 5-6), o átomo de nitrogênio está protonado, sendo solúvel em água (Taiz & Zeiger, 2010). A função mais descrita para estes compostos, principalmente alcalóides, glicosídeos cianogênicos e aminoácidos não-protéicos, é a proteção contra herbívoros, por conferir sabor amargo, gerar proteínas não funcionais após ingestão ou ainda afetar o sistema nervoso central (Harborne, 1993).

1.1.3.1 Alcalóides monoterpêno indólicos

Alcalóides são um subgrupo dos compostos nitrogenados caracterizados por possuir um anel heterocíclico contendo um átomo de nitrogênio e por derivar biossinteticamente de um aminoácido. A síntese de alcalóides consome nitrogênio, um nutriente de alta importância, presente na estrutura de proteínas e clorofilas e, por vezes, escasso no ambiente. Na literatura, há relatos mostrando que os alcalóides apresentam funções relacionadas à defesa, incluindo proteção contra UV (Mayser *et al.*, 2002; Ahsan *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008) e proteção contra herbívoros (Siciliano *et al.*, 2005), além de possuírem propriedades antioxidantes (Fragoso *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2007; Porto 2009).

Alcalóides são classificados de acordo com o aminoácido precursor de sua origem, sendo o triptofano precursor dos alcalóides indólicos. A descarboxilação do triptofano é o primeiro passo da biossíntese de alcalóides indólicos. Alguns exemplos conhecidos de alcalóides indólicos são psilocibina, reserpina e a estriquinina, além dos alcalóides vincristina e vinblastina, com ação antitumoral, de *Catharantus roseus* e a reserpina, de *Rauwolfia serpentina*, utilizada no tratamento de problemas neurológicos, sendo o primeiro fármaco sintetizado a atuar no Sistema Nervoso Simpático.

Alcalóides monoterpêno indólicos são alcalóides de origem biossintética mista, uma fração indólica onde o precursor é um derivado do triptofano (rota do chiquimato/ triptofano), e outra fração terpênica proveniente da rota do mevalonato/ piruvato.

1.2 Espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como oxigênio singlete, ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil (Fig. 2) são considerados altamente tóxicos e reativos, causando dano oxidativo às células. Por outro lado, as ROS podem ser acumuladas em condições de estresses bióticos e abióticos, como moléculas sinalizadoras para controlar morte celular, resposta hormonal e outros processos celulares (Apel and Hirt 2004).

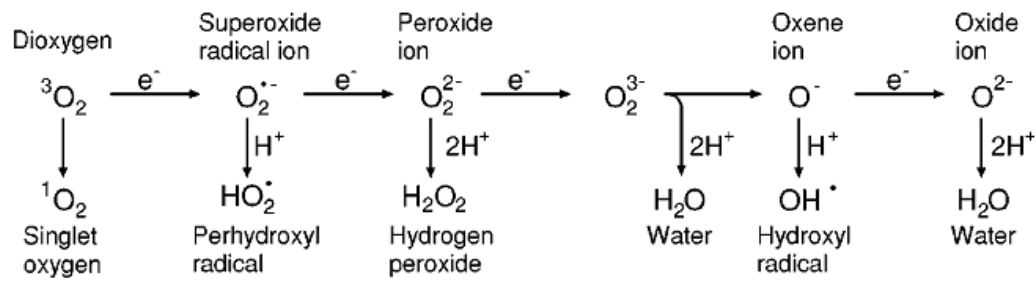


Figura 2: Esquema da rota da formação de espécies reativas de oxigênio, retirado de Apel & Hirt (2004).

ROS são produzidas continuamente, principalmente no cloroplasto e mitocôndria (loais de intensa atividade metabólica), e encontram-se normalmente em condições de equilíbrio, onde há um balanço entre produção e o aprisionamento de ROS por ação de compostos antioxidantes (Apel and Hirt 2004). O aprisionamento de ROS através de mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos, regulados pelas condições do ambiente, podem detoxificar níveis elevados dos mesmos, gerados por alguma situação de estresse, aliviando esta condição (Jansen *et al.* 1998).

1.3 *Psychotria*

O gênero *Psychotria*, apresenta mais de 1800 espécies (Nepkroeff *et al.*, 1999; Nepkroeff *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2009) distribuídas mundialmente representando o maior grupo dentro da família Rubiaceae (APG III) e um dos mais ricos em número de espécies dentro das angiospermas. As espécies de *Psychotria*. Geralmente apresentam porte arbustivo e têm como habitat regiões de sub-bosque.

Frequentemente as espécies de *Psychotria* acumulam alcalóides indólicos, sendo estes uma ferramenta importante no auxílio à taxonomia deste grupo, uma vez que diferenças morfológicas são sutis entre as espécies (Nepkroeff *et al.*, 1999). As espécies neotropicais deste gênero pertencem ao subgênero *Heteropsychotria*, sendo a presença de alcalóides monoterpênicos indólicos nas mesmas uma constante. Apesar de sua distribuição, *P. ipecacuanha* não pertence ao clado *Heteropsychotria* e, similarmente a *P. borucana* (Nepkroeff *et al.*, 1999) e *P. klugii* (Muhammad *et al.*, 2003), apresenta alcalóides iridóides derivados de dopamina, e não de triptamina.

Entre os usos etnobotânicos descritos para algumas espécies de *Psychotria*, no México é relatado o uso de *P. papantlensis* no tratamento de doenças inflamatórias (Alonso-Castro *et al.*, 2011); na Amazonia Peruana, *P. tenuicaulis*, *P. pilosa*, *P. poeppigiana*, *P. marcgraviella* e *P. carthagenensis* são utilizadas em diferentes tratamentos tais como hemorragia do útero, vômito, febre, diarreia, espasmos, analgésicos, calmantes e tônicos (Valadeau *et al.*, 2010; Janz-Biset & Cañigual, 2011); na Papua Nova Guiné, é relatado o uso de *P. microlabastra*, entre outros males, no tratamento contra Malária e doenças venéreas (Khan *et al.*, 2001).

As moléculas bioativas sintetizadas por *Psychotria* são diversas e incluem pigmentos, peptídeos, naftoquininas, benzoquinonas e alcalóides (Beretz *et al.*, 1985; Hayashi *et al.*, 1987; Witherup *et al.*, 1994; Glinski *et al.*, 1995; Solis *et al.*, 1995), e, dentre as atividades biológicas já descritas, destacam-se: atividades antibiótica, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, antiparasítica, citotóxica, além de regulador hormonal (Rasolonjanahary *et al.*, 1995; Dunstan *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2001; Muhammad *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2010).

P. ipecacuanha está entre as espécies mais estudadas de *Psychotria* e produz os alcalóides isoquinolínicos emetina e cefalina, ambos com propriedades eméticas (indutoras de vômito) (Sousa *et al.*, 1991). Emetina possui efeito comprovado no tratamento de amebíase (Lewis & Elvin-Lewis, 1977); entretanto, apresenta alguns efeitos colaterais indesejados como fraqueza muscular e danos cardíacos. Outra espécie bem conhecida é a *P. viridis*, da qual são utilizadas as folhas como um dos ingredientes no preparo de uma bebida alucinógena (Ayahuasca) consumida com propósitos religiosos. A principal razão do efeito alucinógeno é o alcalóide dimetiltriptamina (DMT) de *P. viridis* (Freedland & Mansbach, 1999); outra planta que é adicionada à bebida sendo essencial para seu efeito é *Banisteriopsis caapi*, que sintetiza harmina, atuando na inibição de monoamino oxidases, evitando a degradação do DMT, tornando sua disponibilidade maior e, conseqüentemente, potencializando seu efeito (Naranjo, 1979).

No sul do Brasil, seis espécies (*Psychotria brachyceras*, *P. carthagenensis*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella* e *P. umbellata*) revelaram atividade analgésica em uma análise inicial (Leal, 1994), estimulando a busca por novas atividades farmacológicas e melhor compreensão do processo de biossíntese destes compostos, em especial os alcalóides. Dentre as espécies analisadas nesta região, apenas *P. carthagenensis* não apresentou alcalóides (Leal & Elisabetsky, 1996).

1.3.1 *Psychotria leiocarpa*

P. leiocarpa Cham. & Schltdl. (Fig. 3) possui porte arbustivo, podendo atingir até 2m de altura, ocorrendo na Argentina, Paraguai e Brasil (Smith & Downs, 1956), apresentando ampla distribuição no Sul do Brasil (Dillenburg & Porto, 1985).

Em observações a campo, uma alta densidade desta planta é constatada, não podendo ser explicada por rápida germinação ou crescimento acelerado. Diferentes estratégias para ocupar o ambiente e se proteger de agressores são adotadas pelas plantas, podendo haver um investimento em tolerância ou resistência (Vilariño & Ravetta, 2008); além disso, outros mecanismos, tais como propagação assexuada e inibidores químicos (compostos alelopáticos) podem conferir uma vantagem na competição por recursos e ocupação do ambiente. O extrato aquoso de folhas desta planta apresenta ação alelopática negativa sobre a germinação e o crescimento de *Lactuca sativa* e *Mimosa bimucronata*, não sendo este efeito devido à presença de alcalóides (Côrrea *et al.*, 2008).

Outra atividade biológica já relatada na literatura inclui atividade analgésica não específica (ensaio de movimentação da cauda) do extrato etanólico de folhas de *P. leiocarpa* (Elisabetsky *et al.*, 1997).

N, β -D-glicopiranosil vincosamida (GPV) (Fig. 4) é o alcalóide majoritário presente nas folhas desta planta, sendo detectado apenas nas partes aéreas, e atingindo teores próximos a 2,5% do peso seco. Este alcalóide apresenta uma peculiaridade entre outros MIAs, devido à presença de um resíduo de glicose adicional ligado ao nitrogênio do anel indólico, sendo o primeiro caso descrito para esta classe. Experimentos com plântulas desenvolvidas de modo asséptico demonstraram que o acúmulo deste alcalóide é dependente da luz e idade das mesmas; maiores teores de alcalóide são observados na luz, com aumento da idade da plântula, e em partes reprodutivas (Henriques *et al.*, 2004).



Figura 3: *Psychotria leiocarpa*

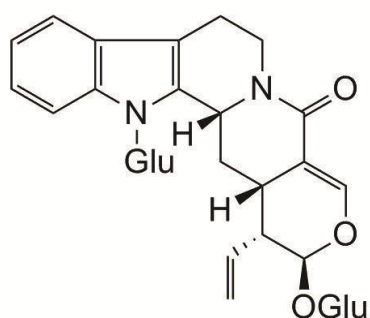


Figura 4: N,β-D-glicopiranosil vincosamida (GPV)

Embora muitos alcalóides sejam geralmente tidos como metabólitos participantes de processos de proteção contra herbivoria, os alcalóides indólicos das espécies de *Psychotria* parecem não ter essa função. Porto (2009) verificou a ineficácia do alcalóide indólico braquicerina (de *P. brachyceras*) quanto à sua capacidade de deter herbivoria utilizando modelos generalistas, e estudos preliminares demonstram que psicolatina (*P. umbellata*) e GPV (*P. leiocarpa*) também são ineficazes neste quesito. Os resultados até o momento com espécies relacionadas apontam para uma função fundamentalmente antioxidante destes alcalóides (Gregianini *et al.* 2003; Nascimento *et al.* 2007; Fragoso *et al.* 2008; Porto 2009).

Entre as atividades antioxidantes já relatadas para braquicerina (Porto, 2009) e psicolatina (Fragoso *et al.*, 2008) encontra-se a capacidade de capturar peróxido de hidrogênio, um sinalizador de dano mecânico que, quando em excesso, é tóxico para a planta.

Estes alcalóides poderiam atuar na proteção contra o estresse oxidativo gerado nas regiões danificadas, por exemplo, detoxificando o excesso de peróxido de hidrogênio gerado durante um ataque; braquicerina se mostrou eficiente também na captura de oxigênio singlete (Gregianini *et al.*, 2003), radicais hidroxil (Nascimento *et al.*, 2007) e ânions superóxido (Porto, 2009), apresentando ampla ação antioxidante. A restrição da indução da braquicerina ao sítio de dano pode indicar uma função local, e não de sinalização ou defesa sistêmica.

Justificativa

Diferentemente do alcalóide correlato braquicerina, pouco se conhece sobre os mecanismos de regulação de GPV frente a estresses e sobre as funções deste alcalóide para a planta. No presente trabalho buscou-se verificar e melhor compreender se o alcalóide GPV possui um perfil de acúmulo constitutivo (fitoanticipina-*like*) ou induzido (fitoalexina-*like*) frente a diversos estresses. Da mesma forma, procurou-se responder qual o possível papel *in planta* deste alcalóide: deterrente de herbivoria ou modulador de estresse oxidativo geral.

Objetivos

Foram objetivos do trabalho:

- Avaliar a cinética da resposta temporal da biossíntese do alcalóide GPV em relação a alguns estímulos bióticos em *P. leiocarpa*;
- Averiguar possíveis atividades do GPV como agente deterrente de herbívoros;
- Analisar possíveis atividades antioxidantes do GPV.

Capítulo I: Artigo a ser submetido ao periódico Natural Product Research.

The major indole alkaloid N, β -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV) from leaves of *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldl. is not an antifeedant but shows broad antioxidant activity

RESEARCH ARTICLE**The major indole alkaloid N, β -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV) from leaves of *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltld. is not an antifeedant but shows broad antioxidant activity***

Hélio Nitta Matsuura and Arthur Germano Fett-Neto

Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

CP 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

Email: fettneto@cbiot.ufrgs.br

* This paper is dedicated to Prof. Dr. Atta-ur-Rahman (University of Karachi), outstanding scientist in the field of natural products research, on occasion of his 70th birthday.

The major indole alkaloid N, β -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV) from leaves of *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltld. is not an antifeedant but shows broad antioxidant activity

N, β -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV), a major alkaloid of *Psychotria leiocarpa*, constitutes up to 2.5 % of the dry weight in leaves. Alkaloid content was not elicited by mechanical wounding or jasmonate. At concentrations found in natural conditions or 2.5 fold higher, GPV did not inhibit herbivory in two unrelated generalist models (*Helix aspersa* and *Spodoptera frugiperda*) or in a specific interaction model (*Heliconius erato* fed with *Passiflora suberosa*). *In situ* staining assay showed quenching activity of hydrogen peroxide by GPV. Exposure of *P. leiocarpa* to acute UV-B stress did not change GPV or chlorophyll content, indicating high tolerance to this stress by the species. *In vitro* antioxidant tests against singlet oxygen, superoxide anions and hydroxyl radicals showed efficient quenching activity of the alkaloid. GPV was not effective as antifeedant, but it may act indirectly in *P. leiocarpa* protection against oxidative stress generated upon wounding, UV exposure, and perhaps other environmental stresses.

Keywords: monoterpene indole alkaloid (MIA); herbivory; wounding; jasmonate; phytoanticipin; UV-B radiation; Reactive Oxygen Species (ROS)

1. Introduction

Psychotria is the largest genus of Rubiaceae and Neotropical species have been found to accumulate indole alkaloids, some of which display relevant pharmacological properties (Elisabetsky et al., 1997), including analgesic, anti-inflammatory, anxiolytic, antidepressant and antioxidant effects (Elisabetsky et al., 1997; Both et al., 2002; Nascimento et al., 2007; Fragoso et al., 2008). *Psychotria leiocarpa* is an understory woody species from Southern Brazil capable of accumulating alkaloids. The monoterpene indole alkaloid N, β -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV) is the major alkaloid in leaves of this species, reaching concentrations of up to 2.5% DW (Henriques et al., 2004).

Secondary compounds may play a major role in plant defense, and direct defenses involve repellent or anti-digestive action, reported for alkaloids, phenolics, glucosinolates, cyanogenic glucosides and proteinase inhibitors (Bonaventure & Baldwin, 2010). Also, different strategies in secondary metabolism accumulation are found in plants, with priority

investment in resistance or tolerance (Vilariño & Ravetta, 2008). The presence of antioxidant compounds may alleviate or spatially restrict oxidative stress generated by wounding (Gould et al., 2002), contributing to overall plant tolerance to herbivores.

Although specific research is needed to evaluate the difference among damage rates in *Psychotria* in forests of Southern Brazil, extensive field observations over the years indicate higher feeding on leaves of *P. carthagenensis* when compared to *P. brachyceras*, *P. leiocarpa* and *P. umbellata*. Tannins were not detected in *P. leiocarpa* (Corrêa et al., 2008) and *P. brachyceras*, but are present in *P. carthagenensis* (unpublished data). Interestingly, *P. carthagenensis* is the only regional species lacking alkaloids (Leal & Elisabetsky, 1996). Brachycerine from *P. brachyceras*, also the major alkaloid in leaves (0.1% DW), is structurally similar to GPV and shows an alkaloid accumulating profile highly responsive to wounding, jasmonate, and UV radiation, increasing its content up to 10-fold (Gregianini et al., 2003; Gregianini et al., 2004). Taking into account the high content of GPV in *P. leiocarpa* leaves and the apparent low predation of the species in natural stands, a putative protective role against herbivores was addressed in this study aiming at determining the possible *in planta* function of GPV. To that end, the dynamics of accumulation, herbivore protective function, changes upon acute UV-B exposure, and antioxidant properties of GPV were investigated.

2. Results and discussion

GPV content in leaves remained constant 96 h after mechanical wounding treatment (Figure 1); the results were similar at earlier time points (6 h, 12 h and 24 h; data not shown). As mechanical damage did not affect GPV content, the process of leaf disk preparation was considered neutral for jasmonate and UV-B tests using this system. Jasmonate is a lipid-derived defense signalling molecule (Kuśnierczyk et al., 2011). Jasmonate exposure was also unable to stimulate GPV accumulation (Figure 1). Mechanical wounding and jasmonate are important elements involved in plant perception to activate defense mechanisms in herbivory responses (Erb, Meldau & Howe, 2012). Phenolics, also often enlisted as defense compounds in herbivory-stress related responses, had stable contents throughout the experiment (data not shown).

GPV can be found in high levels in *P. leiocarpa* leaves, and a phytoanticipin strategy is efficient in plant defense (Zagrobelny et al., 2004). Hence, the lack of GPV induction does

not exclude an herbivory protection role per se. To further examine this issue, deterrence tests were carried out.

In all of the deterrence tests, GPV failed to abolish or inhibit predator feeding. This response was observed in two widely known generalist models, *Helix aspersa* and *Spodoptera frugiperda* (Figure 2) and in a very specific interaction (*Heliconius erato* and *Passiflora suberosa*) (Figure 2). During specific interactions, in evolutionary terms the herbivore is not familiar with the alkaloid. The presence of GPV, however, did not cause feeding deterrence or altered larvae growth (data not shown). In all cases, both positive and negative controls yielded the expected results.

In situ antioxidant assay showed partial quenching of hydrogen peroxide generated by wounding (Figure 3). Hydrogen peroxide is a signalling molecule responsive to wounding and jasmonate (Orozco-Cardenas, Narvaez-Vasquez & Ryan, 2001). GPV was also effective in *in vitro* assays against hydroxyl radicals (Figure 4A), superoxide anions (Figure 4B) and singlet oxygen (Figure 4C), showing a broad range of antioxidant spectrum. GPV effects were often comparable to those of well-known antioxidants included as positive controls for each assay.

A possible role for this alkaloid, similarly to what has been proposed for other alkaloids from related species (Gregianini et al., 2003; Nascimento et al., 2007; Fragoso et al., 2008), is non-enzymatic antioxidant, playing a role in mitigating ROS generated during wounding.

In the UV-B stress assay, chlorophyll content and chlorophyll a/b ratio remained constant, indicating fitness maintenance and no significant damage to photosystem II (data not shown). Changes in anthocyanin, but not flavonoid were observed after 96 h of UV-B exposure (data not shown). GPV content was not affected (Figure 1), also indicating a phytoanticipin-like alkaloid accumulation strategy and a general antioxidant role to the alkaloid.

3. Experimental

3.1. Sample source

Field-grown *Psychotria leiocarpa* Cham & Schldl. cuttings (6-8 leaves) were harvested (February, 2011 – Morro Santana, Porto Alegre, Brazil) and acclimated for a week in 10% (v/v) MS (Murashige & Skoog, 1962) nutrient solution, pH 5.8, under the same experimental conditions (16 h.day⁻¹ photoperiod, 73 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation and 25° ± 3° C) prior to use as entire cuttings or as leaf disk source. These experimental

conditions were used in all experiments with plant tissue. A voucher specimen (138157) is deposited at the ICN herbarium (UFRGS).

3.2. GPV isolation

N, β -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV) was purified from *Psychotria leiocarpa* leaves following previously described method with minor modifications (Both *et al.*, 2002). HPLC was used to evaluate purity index in comparison to authentic GPV. Chromatographic parameters used were similar to those described below for sample analysis (Henriques *et al.*, 2004).

3.3. HPLC GPV analysis from leaf samples

Methanolic extracts were obtained from leaf samples and analyzed in HPLC as previously described (Henriques *et al.*, 2004). Shortly, 250 mg of fresh tissue were ground with mortar and pestle in liquid nitrogen and 1 mL of cold methanol (Merck- HPLC grade); the extract was vortexed and then sonicated for 30 min at 4° C. The extract was centrifuged at 13.000x g 4° C for 15 min and the supernatant recovered for HPLC analysis. For obtaining dry weight, pellets were dried at 60° C until reaching constant weight.

The samples were analyzed by HPLC (Thermo Scientific Surveyor) with 1 mL.min⁻¹ flow in a Shimadzu C18 reverse fase column, equipped with respective guard column, in a linear gradient starting with water:methanol (60:40), and ending with methanol. To both eluents trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma) was added to a final concentration 0.05%. An external standard curve was prepared with authentic GPV. Content of GPV was expressed on a leaf dry weight basis.

3.4. Mechanical wound, jasmonate and UV-B radiation assay

In mechanical wound tests, acclimated shoots had half of their leaves (3-4 leaves) wounded with tweezers by compression (Gregianini *et al.*, 2004). Control samples were kept intact. After 48 h and 96 h of stress exposure, the samples were harvested in liquid nitrogen and stored at -80° C until analysis. The GPV and phenolic compounds contents were then determined.

In the jasmonate assay, leaf disks (1cm diameter) were prepared from previously acclimated shoots. Thirty disks were arranged per Petri dish. In each Petri dish, a filter paper

and 20 mL of MS solution (Murashige & Skoog, 1962) at 10% strength, pH 5.8, were added, in presence or absence of jasmonate at final concentration of 40 μM . After 48 h and 96 h of stress exposure, the samples were harvested, immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. GPV concentration was obtained by HPLC analysis.

Additionally, a UV-B assay was performed. The experimental procedures were the same used for jasmonate assay, but instead of jasmonate exposure, the disks were treated with UV-B radiation [$130.90\text{ KJ.m}^{-2}.\text{day}^{-1}$, $47.14\text{ KJ.m}^{-2}.\text{day}^{-1}$ biologically effective radiation (Caldwell, 1971)]. A glass plate (5 mm thick) was placed above control disks to filter out UV-B and most UV-A wavelengths. GPV content was evaluated in the same pool of disks. Chlorophyll, flavonoid, and anthocyanin concentrations were obtained according to previously described methods (Ross, 1974; Zhishen et al., 1999; Chatterjee et al., 2006, respectively).

3.5. Phenolic compounds analysis

A protocol based on the Folin Ciocalteu method with minor modifications, described in Fetto Neto et al. (1992), was used to quantify phenolic compounds.

3.6. In vitro antioxidant assay

In vitro quenching activity against superoxide, singlet oxygen and hydroxyl radicals were performed based on previously described protocols (Zhishen et al., 1999; Monroe, 1977; Elizabeth & Rao, 1990, respectively). Solvent only (water-methanol, 1:1, v:v), TroloxTM (positive control, same concentration as GPV) or GPV 0.5 mM (superoxide and hydroxyl scavenging assays) or 1 mM (singlet oxygen quenching assay) were added to the medium before reaction. All procedures were performed under dim light.

Shortly, on the singlet oxygen assay, a 0.8 mM rubrene solution in chloroform was evaluated for color decay (absorbance at 440 nm) after white light exposure (22 J.cm^{-2} on a white light transilluminator). Superoxide anions quenching activity was measured by Nitro Blue Tetrazolium (NBT) reduction (solution coloration turns blue); a 3 μM riboflavin, 10 mM methionine, 0.1 mM NBT in phosphate buffer 50 mM pH 7.8 solution was exposed to white light ($350\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and the absorbance at 560 nm of the samples was measured before and after light exposure. For hydroxyl quenching assay, a Fenton reaction (2-deoxy-2-ribose 2.8 mM, FeCl_3 200 μM , EDTA 1.04 mM, H_2O_2 1 mM, ascorbic acid 1mM in KH_2PO_4 -KOH buffer 20 mM pH 7.4, followed by 37°C incubation for 1 h) which generates hydroxyl

radicals by iron oxidation in presence of hydrogen peroxide, was used. After acid revelation (TBA 0.5% and TCA 1.4% 15 min exposure at 90° C) hydroxyl radicals were quantified by absorbance at 532 nm.

3.7. *In situ* antioxidant assay

Coleus blumei Benth variegated leaf disks (1cm diameter) were incubated for 15 min in diamino benzydine (DAB) 1 mg.mL⁻¹ solution or the same solution containing GPV 10 mM or ascorbic acid 10 mM (positive control) to allow the formation of a brown polymer, indicating the presence of hydrogen peroxide. To stop the reaction and improve visualization of hydrogen peroxide spots in leaf-disks margins, leaves were boiled in ethanol 96% for 10 min (Thordal-Christensen et al., 1997).

3.8. Herbivory assays

Three assays were used for GPV deterrence tests; two generalist models, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Helix aspersa* (Stylommatophora: Helicidae); and a specialist herbivore interaction model *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) with *Passiflora suberosa*, its almost exclusive source of food. All assays were performed on a no choice method (van Dam *et al.*, 2005). Leaf-disk eaten area was measured with graph paper.

The *H. aspersa* test was based on the protocol from Smith et al. (2001), with minor modifications. Sixteen lettuce disks (2 cm diameter) per sample treated with 32.89 µL of 10 mM GPV methanolic solution (a 2.5-fold higher content than naturally occurring), tannic acid 8.82 mM in methanol (positive control), or methanol only (negative control) were offered to each snail (6-10 g body weight range) and maintained on half of a transparent plastic container (12 cm diameter cm, 10 cm height) for 48 h in treatment at 15° C, 16 h.day⁻¹ photoperiod in BOD. The snails were kept for 24 h under starvation at 18° C prior to the test.

In *S. frugiperda* assay, *Lactuca sativa* L. (lettuce) disks (2 cm diameter) were treated with 32.89 µL of methanolic solution of GPV 4.15 mM (naturally occurring content in *P. leiocarpa* leaves), methanolic solution of pyrethroids (imiprothrin 3 µM and cipermetrin 2.5 µM) (positive control) or methanol only (negative control) and offered to two *S. frugiperda* 3rd instar larvae on plastic Petri dishes (9 cm diameter), and kept overnight at 23° C, 16 h.day⁻¹ photoperiod and 75% relative humidity. Prior to the test, the larvae were kept 24 h under starvation and the same experimental conditions. *S. frugiperda* is commonly used in feeding assays (Breuer et al., 2005).

H. erato (4th instar) experimental procedures were very similar to those described for *S. frugiperda*; however, instead *L. sativa*, the animals were fed with *P. suberosa*; 14 disks (1cm diameter) treated with 10 mM GPV methanolic solution, pyrethroids solution (in methanol – positive control) or methanol only were offered on a 6 h diurnal period (3 to 4 feeding cycles) to each animal.

3.9. Experimental procedures and statistics

All assays herein described were performed in biological quadruplicates, one technical duplicate or more when possible and each assay was repeated at least twice independently. The results were analyzed by ANOVA followed by Tukey, $P \leq 0.05$, using statistic package SPSS 17.0.

4. Conclusions

The alkaloid GPV seems to be mainly involved in general oxidative stress modulation, not playing a direct herbivore protection role as extensively reported for several alkaloids. Structurally similar MIAs from closely related *Psychotria* species were also shown to have antioxidant activity, suggesting that these alkaloids may also have a similar function in their respective plants of occurrence.

Acknowledgments

Research was supported by grants from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil). The authors are grateful to Dr. Lúcia Bertholdo Vargas (Center for Biotechnology, University of Caxias do Sul, Brazil) for *Spodoptera frugiperda* larvae, Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira (Department of Zoology, UFRGS) for *Heliconius erato* larvae, and Dr. Amélia Teresinha Henriques (Faculty of Pharmacy, UFRGS) for lending the MPLC equipment used in part of the GPV purification protocol.

References

Bonaventure G., & Baldwin I.T. (2010) Transduction of wound and herbivory signals in plastids. *Commun Integr Biol*, 3, 313–317. doi: 10.4161/cib.3.4.11834

- Both F.L., Kerber V.A., Henriques A.T., Elisabetsky E. (2002) Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharm Biol*, 40, 336-341. doi: 10.1076/phbi.40.5.336.8453
- Breuer M., Loof A.D., Balzarini J., & Huybrechts R. (2005) Insecticidal activity of the pyrimidine nucleoside analogue (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine (BVDU). *Pest Manag Sci*, 61, 737-741. doi: 10.1002/ps.1053
- Caldwell, M.M. (1971) Solar UV irradiation and growth and development of higher plants. In: Giese AC (ed) *Photophysiology* 4th vol. Academic Press, New York
- Chatterjee M., Sharma P., Khurana J.P. (2006) Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation. *Plant Physiol*, 141, 61-74. doi: 10.1104/pp.105.076323
- Corrêa L.R., Soares G.L., & Fett-Neto A.G. (2008) Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understorey species of subtropical forests. *S Afr J Bot*, 74, 583–590. doi: 10.1016/j.sajb.2008.02.006
- Elisabetsky E., Amador T.A., Leal M.B., Nunes D.S., Carvalho A.C.T., Verotta L. (1997) Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. *Ciência e Cultura*, 49, 378-385.
- Elizabeth K., & Rao M.N.A. (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int J Pharm*, 58, 237-240. doi: 10.1016/0378-5173(90)90201-E
- Erb M., Meldau S., & Howe G.A. (2012) Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends Plant Sci*, in press. doi: 10.1016/j.tplants.2012.01.003
- Fett-Neto A.G., Teixeira S.L., Silva, E.A.M., Sant'Anna R.S. (1992) Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D.Don) Endl. *J Plant Physiol*, 140, 720-728.
- Fragoso V., Nascimento N.C., Moura D.J., Silva A.C.R., Richter M.F., Saffi J., Fett-Neto A.G. (2008) Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. *Toxicol in vitro*, 22, 559-566. doi:10.1016/j.tiv.2007.11.010
- Gould K.S., McKelvie J., Markham K.R. (2002) Do anthocyanins function as antioxidant in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell Environ*, 25, 1261-1269. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00905.x

- Gregianini T.S., Porto D.D., Nascimento N.C., Fett J.P., Henriques A.T., Fett-Neto A.G. (2004) Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J Chem Ecol*, 30, 2023-2036. doi: 10.1023/B:JOEC.0000045592.24785.33
- Gregianini T.S., Silveira V.C., Porto D.D., Kerber V.A., Henriques A.T., Fett-Neto A.G. (2003) The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochem Photobiol*, 78, 470–474. doi:10.1562/0031-8655(2003)078<0470:TABIIB>2.0.CO;2
- Henriques A.T., Lopes S., Paranhos J.T., Gregianini T.S., Von Poser G., Fett-Neto A.G., Schripsema J. (2004) N, β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry*, 65, 449-454. doi:10.1016/j.phytochem.2003.10.027
- Kuśnierczyk A., Tran D.H.T., Winge P., Jørstad T.S., Reese J.C., Troczyńska J., Bones A.M. (2011) Testing the importance of jasmonate signalling in induction of plant defences upon cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *BMC Genomics*, 12, 423-439. doi:10.1186/1471-2164-12-423
- Leal M.B., & Elisabetsky E. (1996) Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol*, 54, 37-40. doi:10.1016/0378-8741(96)01448-1
- Monroe B.M. (1977) Quenching of singlet oxygen by aliphatic amines. *J Phys Chem*, 81, 1861–1864. doi: 10.1021/j100534a016
- Murashige T., & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15, 709-714. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nascimento N.C., Fragoso V., Moura D.J., Silva A.C.R., Fett-Neto A.G., Saffi J. (2007) Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. *Environ Mol Mutagen*, 48, 728-734. doi:10.1002/em.20349
- Orozco-Cardenas M.L., Narvaez-Vasquez J., & Ryan C.A. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 13, 179–191.
- Ross C.W. (1974) *Plant Physiology Laboratory Manual*. Wadsworth Publishing Company, Belmont.

- Smith D.B., Roddick J.G., & Jones J.L. (2001) Synergism between the potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine in inhibition of snail feeding. *Phytochemistry*, 57, 229-234. doi: 10.1016/S0031-9422(01)00034-6
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., & Collinge D.B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley-powdery mildew interaction. *Plant J*, 11, 1187–1194. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x
- Van Dam N.M., Vuister L.W.M., Bergshoeff C., Vos H., Meijden E.D.D. (1995) The “raison d’être” of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. *J Chem Ecol*, 21, 507-523. doi: 10.1007/BF02033698
- Vilariño M.P., & Ravetta D.A. (2008) Tolerance to herbivory in lupin genotypes with different alkaloid concentration: interspecific differences between *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. *Environ Exp Bot*, 63, 130-136. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.10.032
- Zagrobelny M., Baka S., Rasmussen A.V., Jørgensen B., Naumann C.M., Møller B.L. (2004) Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, 65, 293–306. doi: 10.1016/j.phytochem.2003.10.016
- Zhishen J., Mengcheng T., & Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64, 555-559. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2

Figure legends:

Figure 1. GPV content ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ leaf dry weight) of *P. leiocarpa* after 2 and 4 days of mechanical damage, jasmonate or UV-B treatment. Data are expressed as % of control treatment content. Bars indicate standard errors of the means. GPV content (% dry weight) of control treatment leaves was 0.02595 ± 0.00157 (mean \pm sem).

Figure 2. Deterrency bioassays. Leaf area, treated with methanol only, GPV or positive control, consumed by *Spodoptera frugiperda* (unhatched portions of bars - bottom), *Heliconius erato* (diagonally hatched portions of bars – intermediate) or *Helix aspersa* (longitudinally hatched portions of bars – top). For *H. aspersa* and *S. frugiperda*, 2 cm diameter lettuce disks were offered, and for *H. erato* disks of *Passiflora suberosa* (1cm diameter) were provided. Different letters indicate significant difference by a Tukey test ($P \leq 0.05$). Valid comparisons apply only within herbivore species.

Figure 3. *In situ* antioxidant bioassay with DAB staining. *Coleus blumei* leaves were incubated in presence of DAB alone or along with GPV 10 mM or ascorbic acid 10 mM (positive control). Dark brown marginal regions indicate hydrogen peroxide formation.

Figure 4. *In vitro* antioxidant tests performed with isolated GPV. (A) Hydroxyl scavenging assay; (B) Superoxide scavenging assay; (C) Singlet oxygen scavenging assay. Different letters indicate significant difference by a Tukey test ($P \leq 0.05$).

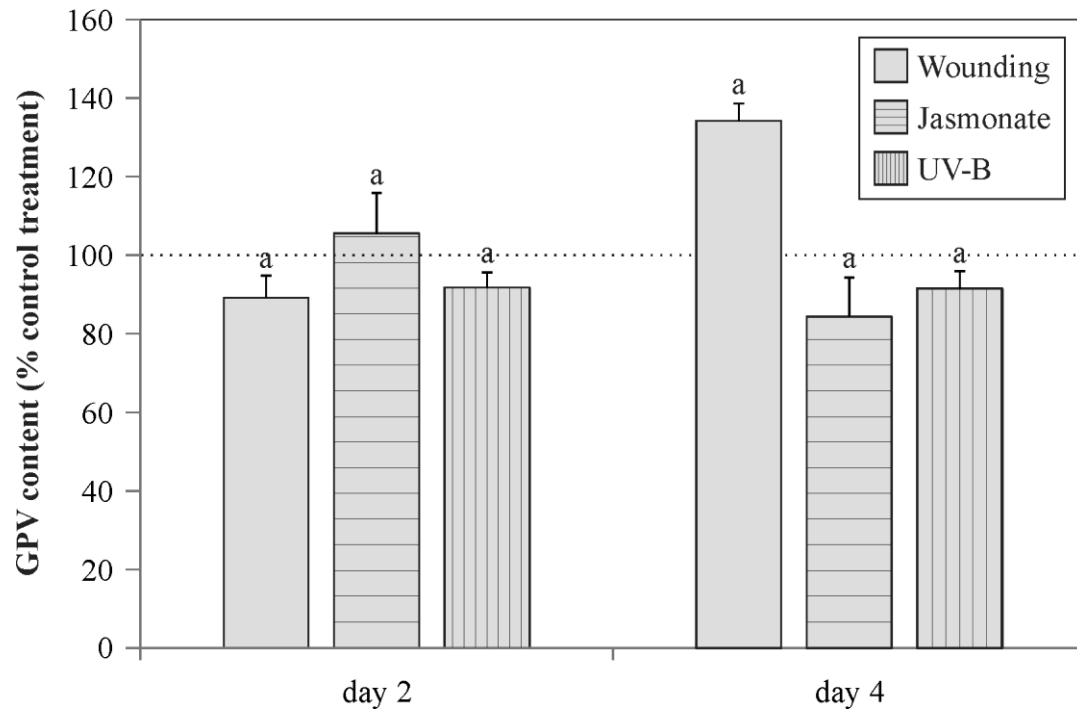
Figure 1

Figure 2

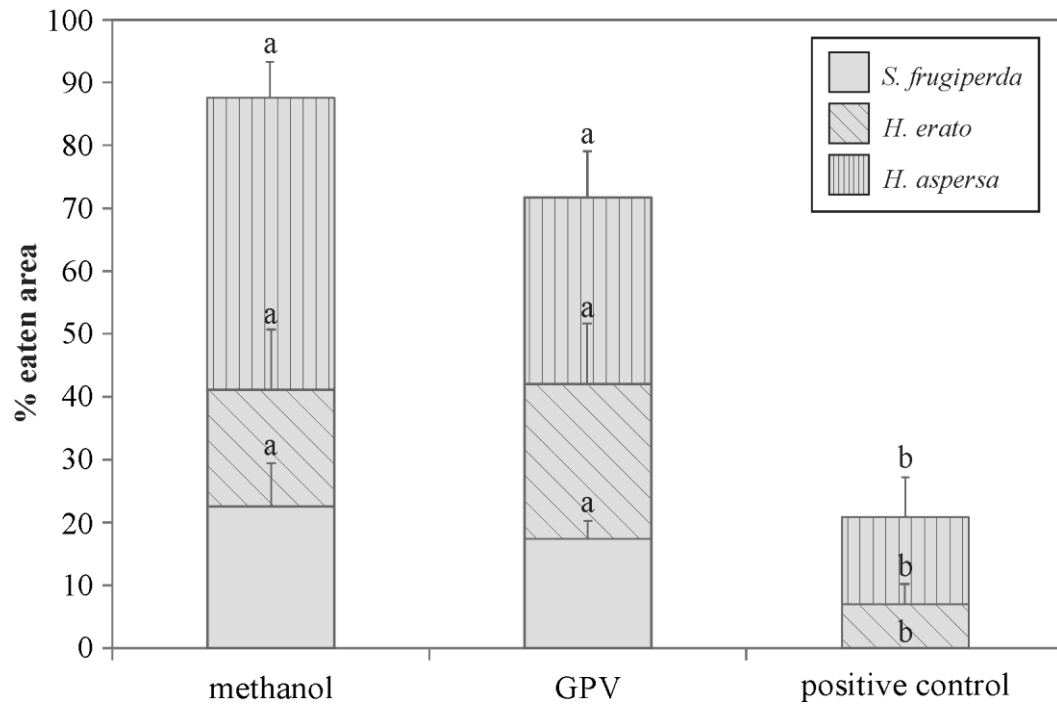


Figure 3

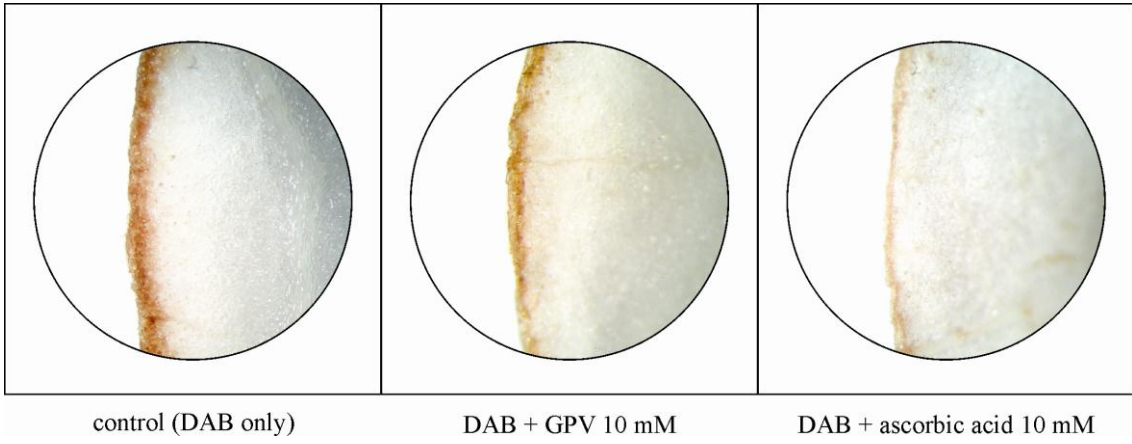
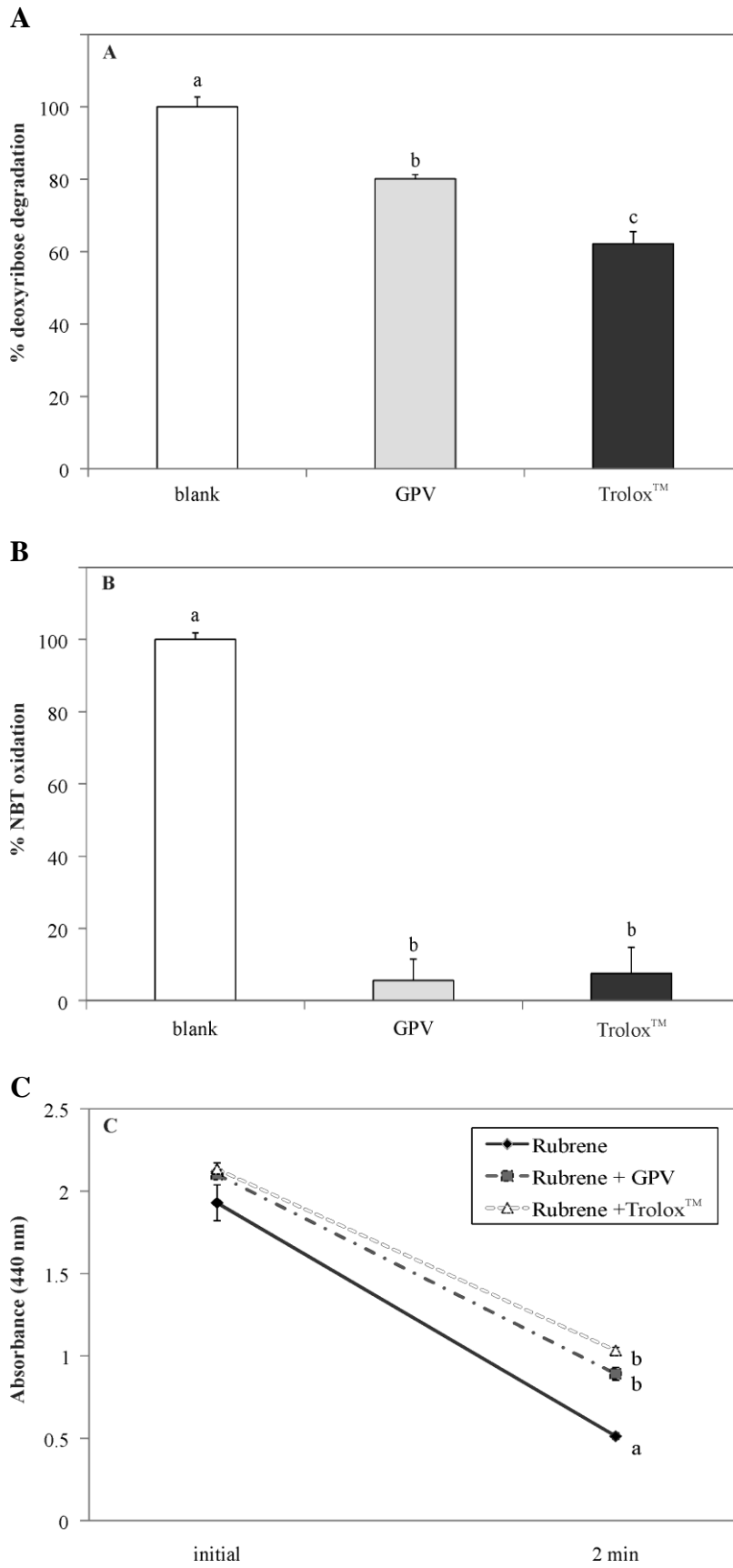


Figure 4



Discussão Geral

Na literatura, diversos alcalóides são conhecidos como metabólitos participantes do processo de proteção à herbivoria (Taiz & Zeiger, 2010). Contudo, os dados existentes até o momento apontam uma função distinta, que não a de proteção direta contra herbívoros, para os alcalóides indólicos das espécies de *Psychotria* (Porto, 2009). Braquicerina tem seu acúmulo restrito ao sítio de dano, diferentemente de nicotina em tabaco (*Nicotiana sylvestris*) onde a indução ocorre em toda planta (Baldwin *et al.*, 1994); ambos apresentando a estratégia fitoalexina-like de acúmulo do alcalóide. GPV também se mostrou ineficaz na proteção contra herbivoria em 3 modelos: *Spodoptera frugiperda*, *Helix aspersa* (modelos generalistas) e *Heliconius erato* (modelo especialista) e apresenta uma estratégia fitoanticipina-like, não sendo influenciada por agentes de estresse tais como aplicação de jasmonato, dano mecânico e exposição à UV-B.

Porém, observações a campo sugerem fortemente que algum fator está conferindo proteção a estas espécies de *Psychotria*, e os resultados até o momento sugerem que não são os alcalóides. GPV demonstrou forte atividade antioxidante contra as principais ROS relevantes em sistemas biológicos, tais como oxigênio singlete, radicais hidroxil e ânions superóxido (Hideg *et al.*, 2002; Šnyrychová *et al.*, 2007); braquicerina e psicolatina também são moléculas com capacidade antioxidante (Gregianini *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2007; Porto 2009; Fragoso *et al.*, 2008). Estes alcalóides de *Psychotria* parecem estar envolvidos na defesa indireta contra herbívoros, através da modulação do estresse oxidativo gerado.

Recentemente, um levantamento de ciclotídeos na família Rubiaceae detectou a presença destas proteínas circulares em algumas espécies de *Psychotria*, incluindo *P. brachyceras* (Gruber *et al.*, 2008), embora, para esta espécie, estas proteínas não tenham sido purificadas, isoladas ou caracterizadas. Estudos recentes sugerem que estes compostos estejam envolvidos na proteção contra herbívoros. Interessantemente, em extratos protéicos de *P. carthagenensis*, não foram observados ciclotídeos (Gruber *et al.*, 2008). Este fato sugere uma possível participação dos ciclotídeos na menor taxa de predação foliar observada em *P. brachyceras* em relação a *P. carthagenensis*.

Proteínas tóxicas vegetais podem conferir resistência a predadores, através de diversos mecanismos de ação (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002), sendo uma alternativa para explicar a base da defesa contra herbívoros nestas plantas. Os ciclotídeos (28-37 aminoácidos) constituem o maior grupo de proteínas circulares e ocorrem naturalmente em algumas

famílias. São caracterizados por possuírem três ligações dissulfeto arranjas em uma conformação chamada “nó de cisteína” (Craik *et al.*, 1999), que somada à natureza circular da proteína proporciona alta estabilidade, sendo resistente à quebra química ou enzimática e à desnaturação por calor (Colgrave & Craik, 2004). As evidências apontam para os ciclotídeos uma função de proteção vegetal, principalmente contra herbívoros, sendo o principal mecanismo de ação proposto a formação de poros em membranas (Huang *et al.*, 2009). É sugerido que os ciclotídeos ultrapassem as proteínas da classe das defensinas em número e diversidade (Trabi *et al.*, 2004) apresentando grande potencial biotecnológico.

Conclusões

O GPV, apesar de apresentar um padrão de acúmulo (fitoanticipina) distinto da braquicerina (fitoalexina), de *P. brachyceras*, parece ter uma função similar para a planta. Os dados obtidos sugerem que este alcalóide não possui a função de defesa direta contra herbívoros e devido à ampla atividade antioxidante suporta a hipótese de que este alcalóide estaria envolvido na modulação de estresses oxidativos não específicos (incluindo ROS geradas por dano mecânico), de acordo com o observado para braquicerina; para psicolatina, proveniente de *P. umbellata* também já foi relatada atividade antioxidante. Estes 3 alcalóides têm a estrutura bastante similar, e esta função como molécula mitigadora de espécies reativas de oxigênio parece estar intimamente relacionada a este fato. Adicionalmente, *P. carthagenensis*, não possui alcalóides e, em observações a campo, é evidente uma maior taxa de predação da mesma quando comparada com suas congêneres que compartilham o habitat. Esta espécie tem como principais diferenças a ausência de alcalóides e ciclotídeos, indicando estas proteínas como fortes candidatas para explicar uma menor suscetibilidade a herbívoros, ao menos em *P. brachyceras*, onde já foi constatada a presença de peptídeos cíclicos.

Perspectivas

Testar outros alcalóides indólicos com estruturas químicas similares a estes provenientes de espécies de *Psychotria* quanto à sua função ecológica para melhor compreensão destes compostos para a planta, possivelmente como agentes antioxidantes e moduladores do estresse oxidativo.

Avaliar compostos possivelmente envolvidos no processo de proteção destas espécies de *Psychotria* contra herbívoros, sendo os ciclotídeos fortes candidatos para explicar a relativa imunidade de algumas espécies de *Psychotria* a herbívoros em detrimento de outras.

Referências Bibliográficas

- Ahsan H., Reagan-Shaw S., Eggert D.M., Tan T.C., Afaq F., Mukhtar H., Ahmad N. (2007) Protective effect of sanguinarine on ultraviolet B-mediated damages in SKH-1 hairless mouse skin: implications for prevention of skin cancer. *Photochem Photobiol*, 83, 986–993. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00156.x
- Alonso-Castro A.J., Villarreal M.L., Salazar-Olivo L.A., Gomez-Sanchez M., Dominguez F., Garcia-Carranca A. (2011) Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol*, 133, 945–972. doi:10.1016/j.jep.2010.11.055
- Apel K., & Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-399. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Arimura G., Ozawa R., Horiuchi J., Nishioka T., Takabayashi J. (2001) Plant–plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochem Syst Ecol*, 29, 1049–1061. doi: 10.1016/S0305-1978(01)00049-7
- Baldwin I.T., Schmelz E.A., & Ohnmeiss T.E. (1994) Wound-induced changes in root and shoot jasmonic acid pools correlate with induced nicotine synthesis in *Nicotiana sylvestris* ssp. *sp. gazzini* and *sp. comes*. *J Chem Ecol*, 20, 2139-2153. doi:10.1007/BF02066250
- Beretz A., Roth-Georger A., Corre G., Kuballa B., Anton R., Cazenave J. (1985) Polyindolinic alkaloids from *Psychotria forsteriana*. Potent inhibitors of the aggregation of human platelets. *Planta Med*, 51, 300-303. doi:10.1055/s-2007-969496
- Carlini C.R., & Grossi-de-Sá M.F. (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40, 1515-1539. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00240-4
- Choh Y., & Takabayashi J. (2006) Intact lima bean plants exposed to herbivore-induced plant volatiles attract predatory mites and spider mites at different levels according to plant parts. *Appl Entomol Zool*, 41, 537–543. doi: 10.1303/aez.2006.537
- Colgrave M.L., & Craik D.J. (2004) Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry*, 43, 5965–5975. doi: 10.1021/bi049711q

Corrêa L.R., Soares G.L., & Fett-Neto A.G. (2008) Allelopathic potential of *Psychotria leiocarpa*, a dominant understorey species of subtropical forests. *S Afr J Bot*, 74, 583–590. doi: 10.1016/j.sajb.2008.02.006

Craik D.J., Daly N.L., Bond T., Wayne C. (1999) Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol*, 294, 1327–1336. doi: 10.1006/jmbi.1999.3383

Davis A.P., Govaerts R., Bridson D.M., Ruhsam M., Moat J., Brummittet N.A. (2009) A global assessment of distribution, diversity, endemism, and taxonomic effort in the Rubiaceae. *Ann Mo Bot Gard*, 96, 68-78. doi:10.3417/2006205

Dillenburg C.R., & Porto M.L. (1985) Rubiaceae tribo Psychotrieae. In: Winge H., Buckup L., Vianna E.C., Golber P. (Eds), *Boletim do Instituto de Biociências*. Porto Alegre: Editora UFRGS.

Dumbacher J.P., Wako A., Derrickson S.R., Samuelson A., Spande T.F., Daly J.W. (2004) Melyrid beetles (Choresine): a putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. *P Natl Acad Sci*, 101, 15857–15860. doi: 10.1073/pnas.0407197101

Dunstan C.A., Noreen Y., Serrano G., Cox P.A., Perera P., Bohlin L. (1997) Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. *J Ethnopharmacol*, 57, 35-56. doi:10.1016/S0378-8741(97)00043-3

Elisabetsky E., Amador T.A., Leal M.B., Nunes D.S., Carvalho A.C.T., Verotta L. (1997) Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potential analgesics. *Ciência e Cultura*, 49, 378-385.

Faria E.O., Kato L., Oliveira C.M.A., Carvalho B.G., Silva C.C., Sales L.S., Schuquel I.T.A., Silveira-Lacerda E.P., Delprete P.G. (2010) Quaternary b-carboline alkaloids from *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerl. *Phytochem Lett*, 3, 113–116. doi:10.1016/j.phytol.2010.02.008

Firn R.D., & Jones C.G. (2009) A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. *J Exp Bot*, 60, 719–726. doi: 10.1093/jxb/erp002

Fragoso V., Nascimento N.C., Moura D.J., Silva A.C.R., Richter M.F., Saffi J., Fett-Neto A.G. (2008) Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. *Toxicol in Vitro*, 22, 559-566. doi:10.1016/j.tiv.2007.11.010

Freedland C.S., & Mansbach R.S. (1999) Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Depen*, 54, 183-194. doi:10.1016/S0376-8716(98)00154-9

Frick C., & Wink M. (1995) Uptake and sequestration of ouabain and other cardiac glycosides in *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Danaidae): evidence for a carrier-mediated process. *J Chem Ecol*, 21, 557-575. doi: 10.1007/BF02033701

Glinski J.A., David E., Warren T.C., Hansen G., Leonard S.F., Pitner P., Pav S., Arvigo R., Balick M.J., Panti E., Grob P.M. (1995) Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide a, a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochem Photobiol*, 62, 144-150. doi:10.1111/j.1751-1097.1995.tb05250.x

Grant R.H., Heisler G.G., Gao W., Jenks M. (2003) Ultraviolet leaf reflectance of common urban trees and the prediction of reflectance from leaf surface characteristics *Agr Forest Meteorol*, 120, 127-139. doi: 10.1016/j.agrformet.2003.08.025

Gregianini T.S., Silveira V.C., Porto D.D., Kerber V.A., Henriques A.T., Fett-Neto A.G. (2003) The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochem Photobiol*, 78, 470-474. doi:10.1562/0031-8655(2003)078<0470:TABIIB>2.0.CO;2

Gruber C.W., Elliott A.G., Ireland D.C., Delprete P.G., Dessein S., Goransson U., Trabi M., Wang C.K., Kinghorn A.B., Robbrecht E., Craik D.J. (2008) Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. *Plant Cell*, 20, 2471-2483. doi: 10.1105/tpc.108.062331

Harborne J. (1993) *Introduction to Ecological Biochemistry*. London: Academic Press.

Hartmann T. (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.09.017

Hayashi T., Smith F.T., & Lee K.H. (1987) Antitumor agents. 89. Psychorubrin, a new cytotoxic naphthoquinone from *Psychotria rubra* and its structure-activity relationships. *J Med Chem*, 30, 2005-2008. doi:10.1021/jm00394a013

Henriques A.T., Lopes S., Paranhos J.T., Gregianini T.S., Von Poser G., Fett-Neto A.G., Schripsema J. (2004) N, β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry*, 65, 449-454. doi:10.1016/j.phytochem.2003.10.027

Hideg É., Barta C., Kálai T., Vass I., Hideg K., Asada K. (2002) Detection of Singlet Oxygen and Superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition of UV radiation. *Plant Cell Physiol*, 43, 1154-1164. doi: 10.1093/pcp/pcf145

Huang C.Q., Kim S., Song K., Townshend J.R.G., Davis P., Altstatt A., Rodas O., Yanosky A., Clay R., Tucker C.J., Musinsky J. (2009) Assessment of Paraguay's Forest cover change using landsat observations. *Global Planet Change*, 67, 1–12. doi:10.1016/j.gloplacha.2008.12.009

Jansen M.A.K., Gaba V., & Greenberg B.M. (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci*, 3, 131-135. doi:10.1016/S1360-1385(98)01215-1

Janz-Biset J., & Cañigüeral S. (2011) Plant use in the medicinal practices known as “strict diets” in Chazuta valley (Peruvian Amazon). *J Ethnopharmacol*, 137, 271-288. doi:10.1016/j.jep.2011.05.021

Khan M.R., Kihara M., & Omoloso A.D. (2001) Antimicrobial activity of *Psychotria microlabastra*. *Fitoterapia*, 72, 818-821. doi:10.1016/S0367-326X(01)00312-4

Krauss P., Markstädter C., & Riederer M. (1997) Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell Environ*, 20, 1079-1085. doi: 10.1111/j.1365-3040.1997.tb00684.x

Kuo Y., Chen C., Tsai W., Ho Y. (2001). Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Res*, 51, 95-109. doi:10.1016/S0166-3542(01)00141-3

Leal M.B. (1994) Estudo psicofarmacológico de espécies de *Psychotria* (Rubiaceae) do estado do Rio Grande do Sul (Master's thesis).

Leal M.B., & Elisabetsky E. (1996) Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol*, 54, 37-40. doi:10.1016/0378-8741(96)01448-1

Lewis W.H., & Elvin-Lewis M.P.E. (1977) *Medical botany*. New York: John Wiley and Sons.

Macías F.A., Galindo J.L.G., & Galindo J.C.G. (2007) Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, 68, 2917-2936. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.10.010

Mayser P., Schäfer U., Krämer H., Irlinger B., Steglich W. (2002) Pityriacitrin – an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. Arch Dermatol Res, 294, 131-134. doi: 10.1007/s00403-002-0294-2

Moria M., Yoshida K., Ishigaki Y., Matsunaga T., Nikaido O., Kameda K., Kondo T. (2005) UV-B protective effect of a polyacylated anthocyanin, HBA, in flower petals of the blue morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue. Bioorgan Med Chem, 13, 2015–2020. doi: 10.1016/j.bmc.2005.01.011

Muhammad I., Dunbar D.C., Khan S.I., Tekwani B.L., Bedir E., Takamatsu S., Ferreira D., Walker L.A. (2003) Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. J Nat Prod, 66, 962-967. doi:10.1021/np030086k

Naranjo C. (1979) Psychotropic properties of the harmala alkaloids. In: Efron, D.H., Holmstedt B., Kline N.S. (Eds), Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs. Washington: U.S. Public Health Service Production 1645.

Nascimento N.C., Fragoso V., Moura D.J., Silva A.C.R., Fett-Neto A.G., Saffi J. (2007) Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of *Psychotria brachyceras*. Environ Mol Mutagen, 48, 728-734. doi:10.1002/em.20349

Nepokroeff M., Bremer B., & Sytsma K.J. (1999) Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and rbcL sequence data. Syst Bot, 24, 5–27. <http://www.jstor.org/stable/2419383>. Accessed 15 February 2012

Nepokroeff M., Sytsma K.J., Wagner W.L., Zimmer E.A. (2003) Reconstructing ancestral patterns of colonization and dispersal in the Hawaiian understory tree genus *Psychotria* (Rubiaceae): a comparison of parsimony and likelihood approaches. Syst Biol, 52, 820-838. doi: 10.1080/10635150390251072

Phillips M.A., & Croteau R.B. (1999) Resin-based defenses in conifers. Trends Plant Sci, 4, 184–190. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01401-6

Porto D.D. (2009) Papel do alcalóide braquicerina na resposta ao estresse por radiação ultravioleta e dano mecânico em *Psychotria brachyceras* Müll Arg. (Doctoral dissertation).

Rasolonjanahary R., Sévenet T., Voegelien F.G., Kordon C.K. (1995) Psycholeine, a natural alkaloid extracted from *Psychotria oleoides*, acts as a weak antagonist of somatostatin. Eur J Pharmacol, 285, 19-23. doi:10.1016/0014-2999(95)00345-L

Sagers C.L., Ginger S.M., & Evans R.D. (2000) Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia*, 123, 582–586. doi: 10.1007/PL00008863

Sehupp E.W. (1986) *Azteca* protection of *Cecropia*: ant occupation benefits juvenile trees. *Oecologia*, 70, 379–385. doi: 10.1007/BF00379500

Siciliano T., Leo M., Bader A., Tommasi N., Vrieling K., Braca A., Morelli I. (2005) Pyrrolizidine alkaloids from *Anchusa strigosa* and their antifeedant activity. *Phytochemistry*, 66, 1593–1600. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.05.002

Smith L.B., & Downs R.J. (1956) Resumo preliminar das rubiaceas de Santa Catarina. Itajaí: Sellowia Herbário Barbosa Rodrigues.

Šnyrychová I., Kós P.B., & Hideg É. (2007) Hydroxyl radicals are not the protagonists of UV-B induced damage in isolated thylakoid membranes. *Funct Plant Biol*, 34, 1112–1121. doi: 10.1071/FP07151

Solis P.N., Lang'at C., Gupta M.P., Kirby G.C., Warhurst D.C., Phillipson J.D. (1995) Bio-active compounds from *Psychotria camponutans*. *Planta Med*, 61, 62–65. doi:10.1055/s-2006-958001

Sousa M.E., Matos M.E.O., Matos J.E.A., Machado M.I.L., Craveiro A.A. (1991) Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Editora UFC.

Stamp N. (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Q Rev Biol*, 78, 23–55. doi: 10.1086/367580

Taiz L., & Zeiger E. (2010) *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates.

The Angiosperm Phylogeny Group (2009) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc*, 161, 105–121. doi: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x

Trabi M., Svargard E., Herrmann A., Goransson U., Claeson P., Craik D.J., Bohlin L. (2004) Variations in cyclotide expression in *Viola* species. *J Nat Prod*, 67, 806–810. doi: 10.1021/np034068e

Trigo J.R. (2000) The chemistry of anti-predator defense by secondary compounds in neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. *J Brazil Chem Soc*, 11, 551–561. doi: 10.1590/S0103-50532000000600002

Valadeau C., Castillo J.A., Sauvainc M., Lorese A.F., Bourdy G. (2010) The rainbow hurts my skin: medicinal concepts and plants uses among the Yanéscha (Amuesha), an

Amazonian Peruvian ethnic group. *J Ethnopharmacol*, 127, 175–192. doi:10.1016/j.jep.2009.09.024

Vereecken N.J., & Schiestl F.P. (2008) The evolution of imperfect floral mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 7484-7488. doi: 10.1073/pnas.0800194105

Vilariño M.P., & Ravetta D.A. (2008) Tolerance to herbivory in lupin genotypes with different alkaloid concentration: interspecific differences between *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. *Environ Exp Bot*, 63, 130-136. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.10.032

Witherup K.M., Bogusky M.J., Anderson P.S., Ramjit H., Ransom R.W., Wood T., Sardana M. (1994). Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *J Nat Prod*, 57, 1619-1625. doi:10.1021/np50114a002

Xiuchun G., & Jianyong W. (2005) Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. *Plant Science*, 168, 487–491. doi:10.1016/j.plantsci.2004.09.012

Zhang D., Yang X., Kang J.S., Choi H.D., Son B.W. (2008) Circumdatin I, a new ultraviolet-A protecting benzodiazepine alkaloid from a marine isolate of the fungus *Exophiala*. *J Antibiot*, 61, 40–42. doi: 10.1002/chin.200831203

Zhang W.J., & Björn L.O. (2009) The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80, 207–218. doi: 10.1016/j.tote.2009.02.006

Anexo I: *Curriculum vitae*

1. Dados pessoais

Nome: Hélio Nitta Matsuura

Filiação: Eizo Matsuura e Yumi Nitta Matsuura

Nascimento: 04/06/1985

Endereço profissional: Laboratório de Fisiologia Vegetal

Departamento de Botânica – Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves 9500, Agronomia

Porto Alegre- RS, Brasil. CEP: 91501-970

Prédio 43423.2, Sala 205. Telefone: (51) 3308-7637

2. Formação acadêmica

2003-2004: Graduação em Engenharia Bioquímica- EEL/USP (interrompido)

2005-2009: Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase Ambiental- UFRGS

Monografia: Avaliação de efeitos deterrente e alelopático de alcalóides indólicos
de *Psychotria* do Sul do Brasil

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

3. Estágios

3.1 Iniciação científica

2005-2006: Estágio voluntário de iniciação científica

Projeto: Espécies medicinais comercializadas como quebra-pedras
em Porto Alegre

Orientadora: Profa. Dra. Mara Rejane Ritter

2007-2009: Bolsista PIBIC/CNPq

Projeto: Regulação da produção de alcalóides analgésicos em espécies
de *Psychotria*

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

3.2 Estágio supervisionado curricular

2009: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária- Laboratório de Química Agrícola

Endereço: Rua Gonçalves Dias 570, Menino Deus, Porto Alegre- RS. CEP: 90130-060

Supervisor: Dr. André Dabdab Abichequer

4. Prêmios e títulos

2010: Prêmio: First place poster (pôster/ resumo)

Trabalho: Brachycerine treatment prevents photosystem II inactivation upon UV stress
in *Psychotria carthagenensis*

Evento: First Brazilian Symposium about the Effects of Increased UV Radiation on
Agriculture – São José dos Campos, SP

2011: Prêmio: Melhores trabalhos (pôster/ resumo)

Trabalho: The content of the glycosylated indole alkaloid N, β -D-glucopyranosyl
vincosamide (GPV) is not affected by acute UV-B stress on leaf disks of
Psychotria leiocarpa

Evento: XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal – Búzios, RJ

5. Produção científica

5.1 Artigos completos publicados em Periódicos

Aita, A. M.; Matsuura, H. N.; Machado, C. A.; Ritter, M. R. 2009. Espécies medicinais comercializadas como quebra-pedras em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia 19: 471-477.

5.2 Resumos publicados em Anais de Congressos e outros eventos científicos

- Aita, A. M.; Matsuura, H. N.; Machado, C. A. Espécies medicinais comercializadas como quebra-pedras em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. In: XVIII Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de Resumos UFRGS/PROPESQ.
- Matsuura, H. N.; Aita, A. M.; Machado, C. A.; Ritter, M. R. Padrões Morfológicos de Espécies Conhecidas como Quebra-pedras Utilizadas na Medicina Popular em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. In: 57º Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado. Resumos do 57º CNBOT.
- Weege, S.; Matsuura H. N.; Souza, G. P. C.; Kubo, R. R.; Ritter, M. R. Espécies utilizadas como medicinais na Farmácia Caseira Comunitária (FCC) da comunidade de Soldão (Maquiné), Litoral Norte do Rio Grande do Sul. In: XIX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2007, Porto Alegre. Livro de Resumos UFRGS/PROPESQ.
- Matsuura, H. N.; Porto, D. D.; Fett-Neto, A. G. Aplicação de braquicerina em plantas sensíveis à UV-B e danos causados por essa radiação. In: XX Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2008, Porto Alegre. Livro de Resumos UFRGS/PROPESQ.
- Matsuura, H. N.; Fett-Neto, A. G. Avaliação de efeitos deterrente e alelopático de alcalóides indólicos de *Psychotria* do Sul do Brasil. In: XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos UFRGS/PROPESQ.
- Matsuura, H. N.; Porto, D. D.; Rosa, L. M. G.; Fett-Neto, A. G. Brachycerine treatment prevents photosystem II inactivation upon UV stress in *Psychotria carthagenensis*. In: First Brazilian Symposium about the Effects of Increased UV Radiation on Agriculture, 2010, São José dos Campos. Poster abstracts UVRAG.
- Telini B. P.; Matsuura, H. N.; Fett-Neto, A. G. O alcalóide N, β -D-glicopiranosil vincosamida (GPV) não confere proteção contra herbívoros em um sistema de interação específica. In: XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2011, Búzios. Livro de Resumos SBFV.
- Matsuura, H. N.; Fett-Neto, A. G. The content of the glycosylated indole alkaloid N, β -D-glucopyranosyl vincosamide (GPV) is not affected by acute UV-B stress on leaf disks of *Psychotria leiocarpa*. In: XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2011, Búzios. Livro de Resumos SBFV.

Anexo II: Capítulo de livro escrito durante o período de Mestrado; submetido e em fase final de publicação.

Photoelicitation of bioactive secondary metabolites by ultraviolet radiation: mechanisms, strategies and applications

Livro: Biotechnology for Medicinal Plants - Micropropagation and Improvement

Editora: Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Editores: S. Chandra, H. Lata e A. Varma

Ano: 2012

ISBN: 978-3-642-29973-5

Chapter 10

Photoelicitation of bioactive secondary metabolites by ultraviolet radiation: mechanisms, strategies and applications

Hélio Nitta Matsuura, Fernanda de Costa, Anna Carolina Alves Yendo and Arthur Germano Fett-Neto*

*Corresponding author:

Arthur Germano Fett-Neto

Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

CP 15005, Porto Alegre, RS 91501-970

Brazil

Email: fettneto@cbiot.ufrgs.br

Hélio Nitta Matsuura

Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany - UFRGS

CP 15005, Porto Alegre, RS 91501-970

Brazil

Email: helio_nitta@yahoo.com.br

Fernanda de Costa

Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany - UFRGS

CP 15005, Porto Alegre, RS 91501-970

Brazil

Email: fernandadecosta@yahoo.com.br

Anna Carolina Alves Yendo

Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany - UFRGS

CP 15005, Porto Alegre, RS 91501-970

Brazil

Email: anna.yendo@yahoo.com.br

Abstract

As sessile organisms, plants are exposed to various environmental factors that lead to changes in physiology and morphology. One of these factors is ultraviolet radiation. Plants have protective mechanisms, both constitutive and induced, or can activate repair responses to cope with UV-B stress. One of the most common protective responses is the accumulation of secondary metabolites capable of absorbing radiation in the ultraviolet wavelength range, such as anthocyanins, flavonols and flavones. These compounds can also scavenge free-radicals, mainly reactive oxygen species (ROS). Examples of UV-induced accumulation of compounds belonging to virtually all classes of secondary metabolites are available. Exposure to UV-B radiation stimulates expression of an array of genes involved in defense responses. Increased input of UV light has been shown to increase ROS production, activity of antioxidative enzymes and secondary metabolite pathways in different plant species. UV is a powerful tool to modulate secondary metabolism pathways in plants. Besides field level manipulation of UV-B incidence, the use of acute treatments and UV-C pulses may be useful strategies for changing profiles and yields of plant secondary compounds of medicinal interest at commercial scale.

Anexo III: Capítulo de livro escrito durante o período de Mestrado; submetido e em fase de revisão.

Bioactive Alkaloids from South American *Psychotria* and related Rubiaceae

Livro: Handbook of Natural Products- Phytochemistry, Botany, Metabolism

Editora: Springer-Verlag Publication

Editores: K.G. Ramawat, J.M. Merillon e M. Henry

Chapter VI

Bioactive Alkaloids from South American *Psychotria* and related Rubiaceae

Hélio Nitta Matsuura¹, Diogo Denardi Porto², Arthur Germano Fett-Neto^{1*}

*Corresponding author:

¹Plant Physiology Laboratory, Center for Biotechnology and Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), CP 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil; email: fettneto@cbiot.ufrgs.br

²Plant Molecular Genetics Laboratory, Brazilian Agricultural Research Corporation, Bento Gonçalves, RS, 95700-000, Brazil.

Abstract

The largest fraction of global plant diversity is located in the Neotropics, with the Atlantic Forest and the Amazon being a rich untapped reservoir of species that may lead to new drug discovery. Bioactive molecules are often isolated from Rubiaceae species. Ethnobotanic and chemotaxonomic studies may provide clues to guide the prospection of bioactive molecules of interest. In South America, three genera are of special interest due to the bioactivities of their phytochemicals along with their importance to local human populations: *Uncaria*, *Cinchona*, and *Psychotria*. The numerous bioactivities of alkaloids from species in these genera include emetic, cytotoxic, analgesic, anxiolytic, antidepressant, psychotropic, antipsychotic, antipyretic, antiinflammatory, antioxidant, antimutagenic, immunomodulatory, vasorelaxant, antiviral, antimicrobial and anti-protozoan. Indole alkaloids are widely represented in these plant groups. Detailed studies *in planta* and *in vitro* on the dynamics of biosynthesis, accumulation and distribution of some of these metabolites in *Psychotria* of Southern Brazil have revealed complex regulatory controls, encompassing responses to both developmental and environmental signals. In addition, even closely related alkaloids may present distinct dynamic profiles of accumulation, varying from constitutively produced to highly responsive to environmental signals.

Keywords *Psychotria* · monoterpene indole alkaloid · bioactivity · Rubiaceae · biodiversity