

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**O ALCALÓIDE BRAQUICERINA E ESTRESSE OXIDATIVO**  
**EM *Psychotria brachyceras* E *Saccharomyces cerevisiae***

Naíla Cannes do Nascimento

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jenifer Saffi

Porto Alegre, março de 2007

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Radiobiologia Molecular do Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia da mesma Universidade com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Agradecimentos**

Muitíssimo obrigada!

À minha pequena família amada, mãe e seus quatro filhotes únicos, os gêmeos grandes amores da minha vida, que graças às imperfeições perfeitas contribuiu para a formação do meu caráter, do qual me orgulho muito.

Ao meu orientador Arthur Germano Fett-Neto que, como um pai, sabe equilibrar a responsabilidade da cobrança e a sensibilidade da compreensão.

À professora Janette Palma Fett, amiga e mãezona, pela revisão da dissertação e pela participação na minha Comissão de Acompanhamento.

À professora Jenifer Saffi pela co-orientação.

Ao professor Giancarlo Pasquali que, junto com a professora Janette, participou da minha Comissão de Acompanhamento.

Às queridas Dinara e Ana Catarina pela super ajuda e participação em todos os ensaios com leveduras.

À amiga, alma gêmea, Paloma, para a qual não existem palavras que a descrevam a altura do seu valor, por toda a enorme lista de coisas compartilhadas, a qual não caberia aqui, pelo amor incondicional da nossa amizade.

À Vare, eterna camela do meu coração, pelas melhores conversas carregadas dos conselhos mais sensatos, porém cheios de carinho, e pelo valioso incremento cultural na minha vida.

À grande família do Lab de Fisio Vegetal, composta por pessoas especiais que tornam o trabalho mais prazeroso ainda e que não se limitam à qualificação profissional, que é enorme, cumprindo com excelência o papel de amigos. Obrigada pela amizade!

Aos amigos e colegas Diogo e Juli pela doçura e disposição inigualáveis.

Aos amigos e colegas Guilherme, prestativo em todas as horas, e Ricardo pela valiosa ajuda nos ensaios de atividade enzimática.

Aos amigos e colegas Felipe e Carol por serem os melhores exemplos de competência/diversão.

À amiga Tati Gregianini pela acolhedora introdução ao maravilhoso mundo das *Psychotrias*.

À professora Amélia T. Henriques da Faculdade de Farmácia da UFRGS pelo empréstimo do HPLC.

Aos apoios financeiros da CAPES e CNPq que tornaram possível a realização desse trabalho.

## Índice

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>1</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>3</b>
<b>Lista de Abreviaturas, Símbolos e Fórmulas Químicas.....</b>	<b>4</b>
<b>I. Introdução Geral.....</b>	<b>7</b>
1. Metabolismo Secundário .....	7
1.1 Alcalóides .....	9
2. O gênero <i>Psychotria</i> .....	11
2.1 <i>Psychotria brachyceras</i> .....	12
3. Efeitos de Estresses Abióticos e Oxidativos e do Fitormônio Ácido Abscísico sobre o Acúmulo de Metabólitos Secundários.....	15
3.1 Estresses Abióticos e Oxidativos nas Plantas.....	15
3.2 O Fitormônio Ácido Abscísico.....	18
4. Considerações Importantes Sobre as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS- <i>Reactive Oxygen Species</i> ).....	20
4.1 Geração de ROS nos sistemas biológicos .....	20
4.2 Tipos de ROS .....	21
4.2.1 Ânion Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	21
4.2.2 Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ).....	22
4.2.3 Radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ).....	22
4.3 Algumas Enzimas Envolvidas na Detoxificação de ROS .....	24
4.3.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	24
4.3.2 Catalase (CAT).....	25
5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como Organismo Modelo para Estudos de Respostas Eucarióticas ao Estresse Oxidativo.....	25
6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e Testes de mutação <i>forward</i> .....	28
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>30</b>
1. Objetivo Geral .....	30
2. Objetivos Específicos .....	30
<b>III. Material e Métodos .....</b>	<b>32</b>
1. Material Vegetal e Confecção dos Discos Foliares.....	32
2. Tratamentos de Estresse Osmótico/Hídrico .....	32
3. Ensaio de Atividade Enzimática .....	33
3.1 Preparação dos Extratos Enzimáticos.....	33
3.2 Atividade de APX.....	34
3.3 Atividade de SOD.....	34
4. Extração e Quantificação do Alcalóide Braquicerina.....	35
5. Análise Estatística .....	36
6. Ensaio com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
6.1 Substâncias Químicas.....	37
6.2 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e meios de cultivo .....	37
6.3 <i>Central Disc</i> (Ensaio de Inibição do Crescimento).....	38
6.4 Ensaio de Mutagênese e Antimutagênese .....	39
6.5 Ensaio <i>in vitro</i> (Hipoxantina/xantina oxidase).....	39
6.6 Estatística.....	40

<b>IV. CAPÍTULO I.....</b>	<b>41</b>
<b>“Efeitos de Diferentes Tratamentos de Estresse Osmótico Sobre o Acúmulo de Braquicerina em Discos Foliare de <i>Psychotria brachyceras</i>” .....</b>	<b>41</b>
1. Estresse osmótico/hídrico/oxidativo em discos foliares de <i>Psychotria brachyceras</i> ...	42
2. Atividades de Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD) em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com PEG .....	46
4. Referências Bibliográficas.....	55
<b>V. CAPÍTULO II.....</b>	<b>58</b>
<b>“Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid brachycerine of <i>Psychotria brachyceras</i>” .....</b>	<b>58</b>
<b>VI. Conclusões.....</b>	<b>66</b>
<b>VII. Perspectivas.....</b>	<b>69</b>
<b>VIII. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>70</b>

## Lista de Figuras

### I. Introdução

Figura 1. Fotografia de planta de mata com frutos de <i>Psychotria brachyceras</i> .....	13
Figura 2. Estrutura química do alcalóide braquicerina.....	14
Figura 3. Teores de braquicerina em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	18
Figura 4. Representação da formação do radical OH• pelas reações Haber-Weiss/Fenton (Adaptado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).....	23

### IV. CAPÍTULO I

Figura 1. Teores de braquicerina em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com diferentes concentrações de NaCl e PEG.....	42
Figura 2. Teores de braquicerina em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com diferentes concentrações de NaCl, sorbitol e PEG.....	43
Figura 3. Teores de braquicerina ao longo de quatro dias em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com diferentes concentrações de NaCl, sorbitol e PEG.....	44
Figura 4. Teores de braquicerina em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com 10 mg/L do fitormônio ABA.....	45
Figura 5. Teores de braquicerina em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com 1,0 e 10 mg/L do fitormônio ABA.....	46
Figura 6. Atividade de APX em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com 0,05 M de PEG.....	47
Figura 7. Atividade de SOD em discos foliares de <i>P. brachyceras</i> tratados com 0,05 M de PEG.....	48

## V. CAPÍTULO II

Figure 1. Chemical structure of the monoterpene indole alkaloid brachycerine.....	60
Figure 2. Central Disc Assay with brachycerine.....	62
Figure 3. Central Disc Assay with <i>P. brachyceras</i> crude foliar extract.....	62
Figure 4. Hipoxanthine/xanthine oxidase <i>in vitro</i> Assay with brachycerine and <i>P. brachyceras</i> crude foliar extract.....	63



## Lista de Tabelas

### V. CAPÍTULO II

Table 1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains used in this study.....	61
Table 2. Induction of mutation in haploid N123 strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> after treatment with brachycerine or crude foliar extract from <i>Psychotria brachyceras</i> in the stationary phase in PBS.....	63
Table 3. Effects of brachycerine and crude foliar extract from <i>Psychotria brachyceras</i> on induced mutagenicity by hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) in haploid N123 strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in the stationary phase in PBS.....	63

### Lista de Abreviaturas, Símbolos e Fórmulas Químicas

ABA: Ácido abscísico

ABRE: *ABA-responsive element* (Elemento de resposta a ABA)

APX: enzima Ascorbato peroxidase

AREB: *ABA-responsive element binding protein* (Proteína que se liga ao elemento de resposta a ABA)

ATP: adenosina trifosfato

°C: grau(s) Celsius

*CAN1*: gene que codifica o Can1p

Can1p: transportador de arginina de algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

CAT: enzima Catalase

*CTAI*: gene que codifica a enzima CAT perioxossomal

*CTTI*: gene que codifica a enzima CAT citosólica

*ctt1Δ*: linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* mutante para o gene que codifica a catalase presente nos peroxissomas

Cu: cobre

Cu/ZnSOD: enzima Cobre/Zinco-Superóxido dismutase

DHBA: *dihydroxybenzoic acids* (ácidos dihidroxibenzóicos)

DMAPP: dimetilalil difosfato

DREB: *Dehydration-responsive element binding factor* (Fator que se liga ao elemento de resposta à desidratação)

DMSO: dimetil sulfoxido

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico)

DW: *dry weight* (peso seco)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe: ferro

g: grama(s)

GPX: enzima Glutathione peroxidase

TDC: enzima Triptofano descarboxilase

h: hora(s)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IPP: isopentenil difosfato

JA: *Jasmonic Acid* (Ácido Jasmônico)

KCl: cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato de potássio monobásico

L: litro(s)

LB: meio de cultivo de bactérias Luria Bertani

M: molar

mg: miligrama(s)

MIAs: *Monoterpene indole alkaloids* (Alcalóides monoterpeneo indólicos)

min: minuto(s)

mL: mililitro(s)

MM: Meio Mínimo para cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

mm: milímetro(s)

mM: milimolar

µg: micrograma(s)

µL: microlitro(s)

µm: micrometro(s)

MnSOD: enzima Manganês-Superóxido dismutase

MS: solução de sais Murashige & Skoog

NaCl: cloreto de sódio

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato de sódio dibásico anidro

NBT: nitroblue tetrazolium

NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato de amônio

nm: nanômetro

O<sub>2</sub>: oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: ânion superóxido

OH<sup>-</sup>: íon hidroxil

OH•: radical hidroxila

PBS: Tampão fosfato salino

PEG: polietilenoglicol

PMSF: fenilmetilsulfonil fluorido

PS: peso seco

PVP: polivinilpirrolidona

4NQO: óxido de 4-nitroquinoleína

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

SC: Meio Completo Sintético para cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, o qual consiste do MM suplementado com os aminoácidos apropriados

SOD: enzima Superóxido dismutase

*SOD1*: gene que codifica a enzima SOD 1

*SOD2*: gene que codifica a enzima SOD 2

*sod1Δ*: linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* mutante para o gene que codifica a SODCuZn

*sod2Δ*: linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* mutante para o gene que codifica a SODMn

*sod1Δsod2Δ*: linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* mutante para ambas as SODs

*sod1Δctt1Δ*: linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* mutante para SODCuZn e catalase

UV: radiação ultravioleta

WT: *wild type* (tipo selvagem)

YPD: meio completo de crescimento para *Saccharomyces cerevisiae*

## I. Introdução Geral

### 1. Metabolismo Secundário

Em função da sua condição sésil, uma das estratégias de defesa adotada pelas plantas é baseada na produção de uma vasta e diversa variedade de compostos orgânicos, dentre os quais a grande maioria parece não participar diretamente no crescimento e desenvolvimento. Essas substâncias, tradicionalmente referidas como metabólitos secundários, freqüentemente são distribuídas diferencialmente entre grupos taxonômicos limitados dentro do reino vegetal. Os metabólitos primários, em contraste, tais como fitoesteróis, acil lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos, são encontrados em todas as plantas e realizam papéis metabólicos que são essenciais e geralmente evidentes (Buchanan *et al.*, 2000).

Muitos metabólitos secundários têm um importante significado adaptativo na proteção contra herbivoria e infecções microbianas, na atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, e atuando como agentes alelopáticos (aleloquímicos que influenciam a competição entre espécies vegetais). Estas funções ecológicas afetam profundamente a sobrevivência da planta, levando a reconsiderar o papel não essencial destes metabólitos secundários (Buchanan *et al.*, 2000).

A biossíntese dessas moléculas é distinta e não está restrita a rotas metabólicas básicas como a glicólise, ciclo de Krebs ou rota do chiquimato (Wink, 1999). Metabólitos secundários são representados pelos alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos (flavonóides, taninos, etc.), glicosinolatos, glicosídeos cianogênicos, aminoácidos não protéicos, entre outros (Roberts & Wink, 1998). Podem ser produzidos em resposta a

estresses ambientais como ataque patogênico, dano mecânico e radiação ultravioleta (UV), atuando como mecanismo de defesa (Facchini, 2001; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Gregianini *et al.*, 2003). Por via de regra, alguns grupos destes compostos são dominantes dentro de um certo táxon, e, dentro de uma mesma planta, o padrão de distribuição dos metabólitos secundários é complexo, variando entre diferentes órgãos e tecidos, estádios de desenvolvimento, entre indivíduos e entre populações (Wink, 2003). Vários destes metabólitos possuem considerável valor econômico e são extensivamente utilizados em medicamentos pela indústria farmacêutica, em alimentos na forma de flavorizantes, como fragrâncias em cosméticos ou, ainda, como inseticidas, fungicidas, antivirais e herbicidas na agricultura.

A enorme biodiversidade vegetal do Brasil coloca o país em posição estratégica para desenvolver a exploração racional e sustentada de novos compostos de valor terapêutico. Estima-se que apenas cerca de 13.000 espécies de plantas têm sido utilizadas com fins medicinais, constituindo uma parcela inferior a 10 % do total de espécies conhecidas (Kutchan, 1995). Aproximadamente 25 % dos medicamentos de uso terapêutico são derivados de plantas e muitos outros são utilizados como compostos puros ou como chás e extratos. Além disso, constituintes de plantas têm também servido como modelos para drogas modernas, como a atropina para tropicamida, quinino para cloroquina e a cocaína para a procaína e tetracaína (Kutchan, 1995).

## 1.1 Alcalóides

O grupo dos alcalóides se destaca dentre os produtos naturais com propriedades terapêuticas. Estes compostos ocorrem em aproximadamente 20 % das espécies de plantas, e o número de estruturas já identificadas excede os 16 mil (Memelink *et al.*, 2001). O termo ‘alcalóide’ deriva da palavra árabe *al-quali*, nome vulgar da planta da qual a soda foi obtida originalmente. Essas moléculas são representadas por compostos orgânicos com baixo peso molecular e caráter básico, formando uma estrutura heterocíclica com a presença de nitrogênio (Kutchan, 1995).

Os alcalóides estão presentes em muitas plantas medicinais e possuem uma longa e importante história na medicina tradicional (Roberts & Strack, 1999). Exemplos de alcalóides utilizados na indústria farmacêutica incluem o analgésico morfina, o analgésico e antitussivo codeína (ambos de *Papaver somniferum*), os agentes quimioterápicos vincristina e vinblastina (de *Catharanthus roseus*), o antimalárico quinina (de *Cinchona officinalis*), o supressor de gota colchicina, o relaxante muscular (+)-tubocurarina (de *Chondodendrum tomentosum*), o antiarrítmico ajmalicina, o antibiótico sanguinarina (de *Eschscholtzia californica*) e o sedativo escopolamina (de *Hyoscyamus niger*). Outros importantes alcalóides oriundos de plantas incluem cafeína, nicotina e cocaína (Kutchan, 1995). Em média, cerca de dez mil substâncias são testadas para o desenvolvimento de um novo medicamento (Payne *et al.*, 1991). Para alguns alcalóides, a síntese química foi desenvolvida; porém, para diversos desses compostos, como os do tipo monoterpene indólico, o baixo rendimento e o alto custo do processo, devido à complexidade química estrutural, inviabilizam o uso comercial da síntese, fazendo com que o cultivo e a extração

de alcalóides da planta produtora (ou de precursores de alcalóides para semi-síntese) permaneçam sendo a alternativa mais viável economicamente (Kutchan, 1995).

Apesar da grande importância dos alcalóides para uso medicinal, relativamente pouco é conhecido sobre a regulação da sua biossíntese e a sua função nas plantas. Estudos indicam que alcalóides desempenham um importante papel ecoquímico na defesa da planta contra patógenos e herbívoros (Rhodes, 1994). Além disso, foi verificado que a biossíntese dos alcalóides nas plantas é frequentemente controlada durante o desenvolvimento (De Luca & Laflamme, 2001) e em resposta a estresses ambientais como infecção por microorganismos, herbivoria, íons de metais pesados, radiação ultravioleta (UV) e choque osmótico (Facchini, 2001; Memelink *et al.*, 2001). Assim, possíveis funções desses compostos nas plantas incluem proteção contra patógenos, atividade anti-herbivoria, proteção contra radiação UV, reserva de nitrogênio e alelopatia por seu poder quelante e efeitos citotóxicos (Wink, 1988; Rhodes, 1994; Hartley & Jones, 1997; Wink, 1999; Gregianini *et al.*, 2003).

Os alcalóides são divididos em diferentes classes como alcalóides tropânicos, esteroidais e indólicos. Cerca de 2000 alcalóides indólicos são conhecidos e dentre estes estão os alcalóides monoterpênicos indólicos (Schripsema *et al.*, 2001). Este tipo de alcalóide tem sido isolado em três principais famílias de plantas tropicais, Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae, todas pertencentes à Ordem Gentianales (Roberts & Strack, 1999). A biossíntese da maioria dos alcalóides monoterpênicos indólicos possui como etapa inicial a condensação da triptamina com o monoterpêneo secologanina formando o alcalóide glicosilado strictosidina, através da atividade da enzima strictosidina sintase. A strictosidina é o precursor comum de uma grande variedade de alcalóides em diversas espécies de plantas. Passos adicionais de modificação por enzimas espécie-específicas e



conversões espontâneas determinam os tipos de alcalóides que serão formados (Kutchan, 1993).

## 2. O gênero *Psychotria*

O gênero *Psychotria*, pertencente à subfamília Rubioideae e à tribo Psychotrieae, é o maior da família Rubiaceae e compreende quase 2000 espécies amplamente distribuídas no estrato arbustivo das matas tropicais (Davis *et al.*, 2001). É um gênero taxonomicamente complexo devido ao grande número de espécies e à relativa falta de caracteres morfológicos utilizáveis para definição de grupos (Nepokroeff *et al.*, 1999). Foram identificadas 18 espécies de *Psychotria* no sul do Brasil (Santos, 1999).

A família Rubiaceae é conhecida pela produção de diversos alcalóides que apresentam propriedades farmacológicas importantes (Elisabetsky *et al.*, 1995; Kutchan, 1995; Roberts & Strack, 1999). O gênero *Psychotria* é conhecido pela presença de alcalóides e outras substâncias bioativas. Os alcalóides deste gênero são derivados, em sua maioria, do aminoácido triptofano, e são do tipo poliindólico ou derivados metiltryptamínicos principalmente (Hart *et al.*, 1974; Libot *et al.*, 1987; Adjibade *et al.*, 1992; Santos, 1999). A análise de várias espécies do sul do Brasil mostrou que os alcalóides identificados são do tipo monoterpene indólico glicosilado, uma característica química peculiar para este gênero (Kerber *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001).

A presença de alcalóides e outras substâncias bioativas no gênero *Psychotria* tem despertado interesse. Foram demonstrados diferentes efeitos farmacológicos para alcalóides de espécies de *Psychotria*, como inibição da agregação plaquetária humana (Beretz *et al.*, 1985), citotoxicidade (Roth *et al.*, 1986) e atividade analgésica (Leal & Elisabetsky, 1996).

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. Estudos etnofarmacológicos entre caboclos da Amazônia identificaram *Psychotria colorata* (perpétua-do-mato) como planta comumente utilizada no tratamento da dor (Elisabetsky & Castilhos, 1990). Estudos químicos e farmacológicos revelaram nesta espécie a presença de diversos tipos de alcalóides pirrolidinoindolínicos com comportamento analgésico do tipo opióide, *i.e.* morfino-símile (Elisabetsky *et al.*, 1995; Elisabetsky *et al.*, 1997).

A análise farmacológica de extratos alcaloídicos de cinco espécies (*P. brachyceras*, *P. leiocarpa*, *P. myriantha*, *P. suterella* e *P. umbellata*), das 18 que ocorrem no sul do Brasil, mostrou atividade analgésica (Leal, 1994; Elisabetsky *et al.*, 1997).

## 2.1 *Psychotria brachyceras*

A espécie *Psychotria brachyceras* Müll. Arg. (Figura 1) é uma planta arbustiva com até 3 metros de altura que apresenta ampla distribuição, ocorrendo desde o Estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, na área da Mata Pluvial Costeira e Mata da Planície Litorânea (Dillenburg & Porto, 1985). Seu pico de florescimento ocorre de outubro a dezembro e o ápice da sua frutificação no período de abril a junho. Apresenta flores brancas e frutos drupáceos de cor azul-violácea.



Figura 1. Fotografia de planta de *P. brachyceras* com frutos em seu ambiente natural.

*P. brachyceras* produz o alcalóide monoterpêno indólico braquicerina (Figura 2, Kerber *et al.*, 2001), o qual possui uma estrutura peculiar, pois, além da manutenção da glicose ligada à porção terpênica, o que é incomum na forma final da maioria dos alcalóides conhecidos, é possivelmente derivada de uma forma de *epi*-loganina, diferindo dos demais alcalóides indólicos, os quais são geralmente derivados de secologanina e da subsequente formação de strictosidina, o precursor geral de pelo menos três mil alcalóides indol-terpênicos conhecidos. A unidade indólica é provavelmente derivada do aminoácido triptofano, o qual é convertido em triptamina pela enzima citossólica TDC (triptofano descarboxilase). A porção terpênica em alcalóides monoterpêno indólicos de *Catharanthus roseus* é fornecida por isopentenil difosfato (IPP) ou dimetilalil difosfato (DMAPP) oriundo da rota biossintética triose fosfato/piruvato em plastídios, a rota independente de mevalonato (Contin *et al.*, 1998). A estrutura final do alcalóide parece resultar da condensação direta da substância triptamina com *epi*-loganina, proveniente da rota dos terpenos. Essa hipótese biogenética indica uma rota alternativa para biossíntese dessa molécula, representando uma nova classe de alcalóides indólicos (Kerber *et al.*, 2001).

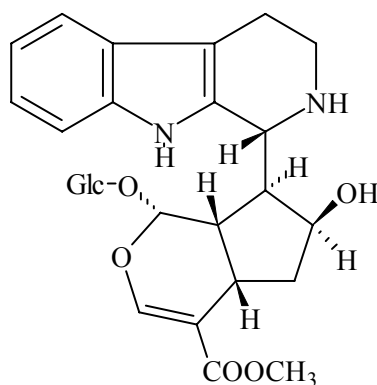


Figura 2. Estrutura do alcalóide monoterpeneo indólico Braquicerina presumivelmente resultante da condensação direta da triptamina (oriunda da descarboxilação do aminoácido triptofano) com *epi*-loganina (proveniente da rota plastídica mevalonato-independente).

A braquicerina é sintetizada nas partes aéreas da planta e não se acumula nas raízes e em tecidos indiferenciados. Observa-se acúmulo preferencial durante a fase reprodutiva, com variação entre os diferentes indivíduos de uma mesma população e sazonalmente (Gregianini *et al.*, 2004). Este alcalóide é fortemente induzido por exposição de estacas à radiação UV, podendo atuar como um cromóforo com atividade de filtro contra UV e como um seqüestrador de espécies reativas de oxigênio induzidas por UV (Gregianini *et al.*, 2003). A biossíntese de braquicerina é ainda induzida por dano mecânico e por aplicação exógena de ácido jasmônico, principal molécula sinalizadora de herbivoria (Gregianini *et al.*, 2004). Dentre as atividades biológicas já identificadas, a braquicerina mostrou efeito antiinflamatório específico em testes de migração de leucócitos em ratos por meio de um ensaio de quimiotaxia (F. Farias e A.T. Henriques, comunicação pessoal), e o extrato aquoso foliar de *P. brachyceras* mostrou atividade alelopática (Correa e Fett-Neto, dados não publicados).

### 3. Efeitos de Estresses Abióticos e Oxidativos e do Fitormônio Ácido Abscísico sobre o Acúmulo de Metabólitos Secundários

#### 3.1 Estresses Abióticos e Oxidativos nas Plantas

Considerando que os principais papéis sugeridos para os metabólitos secundários nas plantas são protegê-las de ataques por insetos, herbívoros e patógenos, ou garantir sua sobrevivência frente a estresses bióticos e abióticos, algumas estratégias para a produção de metabólitos em cultura baseadas neste princípio têm sido desenvolvidas para aumentar a produção de metabólitos secundários vegetais de interesse. Estas estratégias incluem tratamentos com vários elicitores, compostos sinalizadores, e estresses abióticos. Muitos desses tratamentos promovem efetivamente a produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários de plantas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Zhao *et al.*, 2005).

Elicitores, quando se referem a plantas, podem ser caracterizados como moléculas provenientes de várias fontes que podem disparar respostas fisiológicas e morfológicas e acúmulo de fitoalexinas. Fitoalexinas são compostos antibióticos de baixo peso molecular formados e acumulados em células vegetais em resposta à infecção por microorganismos (Maraschin & Verpoorte, 1999). Elicitores podem ser abióticos, tais como íons de metais e compostos inorgânicos, e bióticos, de fungos, bactérias, vírus ou herbívoros, componentes da parede celular vegetal, bem como compostos químicos liberados pelas plantas atacadas por patógeno ou herbívoro no local de ataque. Sabe-se que o tratamento de plantas com elicitores, ou ataque por patógenos incompatíveis, causa um conjunto de reações de defesa, incluindo o acúmulo de uma variedade de metabólitos secundários de defesa como fitoalexinas em plantas intactas ou em cultura de células (Zhao *et al.*, 2005).

Imediatamente após a ocorrência do dano, as plantas produzem espécies reativas de oxigênio (ROS- do inglês, *Reactive Oxygen Species*) tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, ambos localmente no tecido danificado e sistemicamente pela planta (Kessler & Baldwin, 2002). Tratamento com paraquat, um herbicida com alto poder redutor, resulta na formação de ânion superóxido (Ahrens, 1994) e causa estresse oxidativo, similar àquele frequentemente associado com respostas a patógenos. A aplicação exógena de peróxido de hidrogênio simula uma explosão oxidativa e atua como um sinal difusível para ativar genes de defesa e estimular a produção de alguns alcalóides indólicos (Mehdy, 1994). Existem evidências de que o peróxido de hidrogênio e o ácido salicílico atuam como um sistema de auto-amplificação na resistência adquirida contra patógenos e aclimação a estresses abióticos (Van Breusegem *et al.*, 2001).

Um dos principais tipos de estresse abiótico sofrido pelas plantas é o estresse por salinidade. Altos níveis de salinidade no meio externo, como cloreto de sódio (NaCl), por exemplo, são capazes de afetar muitos processos fisiológicos e metabólicos, levando à redução do crescimento celular (Ashraf & Harris, 2004). Os efeitos de vários estresses ambientais nas plantas são mediados, ao menos em parte, pela produção aumentada de ROS. As plantas contêm um complexo sistema antioxidante para eliminar ROS, incluindo enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), peroxidases e enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione (Elkhoui *et al.*, 2005). A tolerância à salinidade é geralmente atribuída tanto à alta atividade constitutiva das enzimas antioxidantes quanto à atividade induzida das mesmas (Elkhoui *et al.*, 2005).

Outro estresse abiótico importante é o estresse de seca. Em recente trabalho, foi mostrado que genes relacionados ao metabolismo secundário foram precocemente

induzidos de forma transiente em radículas de *Medicago trunculata* sensíveis à dessecação durante a incubação das mesmas com polietilenoglicol (PEG), molécula simuladora de situação de estresse de seca, sugerindo a participação dos produtos desses genes no processo de tolerância à seca/dessecação (Buitink *et al.*, 2006).

Estudos realizados previamente, os quais tinham como objetivo avaliar o efeito da exposição de estacas de *P. brachyceras* a *Agrobacterium rhizogenes* sobre o acúmulo de braquicerina, mostraram que o acúmulo de braquicerina foi fortemente induzido em estacas de *P. brachyceras* tratadas com meio de cultivo de bactérias LB (meio rico de Luria Bertani) em comparação ao controle (solução de sais MS) (Figura 3). Experimento no qual foram testados os efeitos dos três componentes (NaCl, extrato de levedura e triptona) do meio LB sobre o acúmulo de braquicerina mostrou que apenas o NaCl foi capaz de aumentar a concentração do alcalóide (dados não mostrados). Além disso, os teores de braquicerina em plantas de *P. brachyceras* em seu ambiente natural foram maiores em períodos de estiagem (seca) (até 0,7 % PS) quando comparados aos teores encontrados em períodos sem escassez de chuva (cerca de 0,02 % PS). Essas observações foram tomadas como indícios de que o acúmulo de braquicerina responderia ao estresse osmótico/hídrico. Com base nesses resultados, foram aplicados diferentes tratamentos de estresse osmótico/hídrico em discos foliares de *P. brachyceras* a fim de observar sua influência sobre o acúmulo de braquicerina.

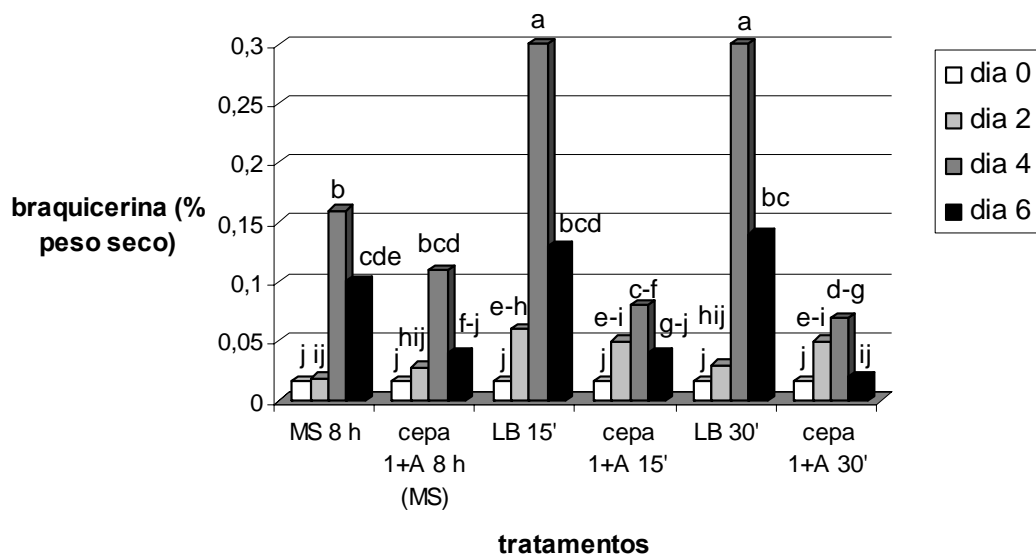


Figura 3. Teores de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* nos dias 0 e nos dias 2, 4 e 6 do decorrer do experimento após exposição por diferentes períodos (8 h, 15 min, ou 30 min) à cepa R1000 (cepa 1) de *A. rhizogenes* com 100  $\mu$ M de Acetoseríngona (A) (fenólico envolvido na sinalização quimiotática da bactéria) ou aos respectivos controles (MS- solução de sais, ou LB- meio de crescimento bacteriano). Barras com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente.

### 3.2 O Fitormônio Ácido Abscísico

O ácido abscísico (ABA- do inglês, *Abscisic Acid*), fitormônio conhecido por disparar a resposta de senescência (Zhao *et al.*, 2005), desenvolve papéis importantes na adaptação de tecidos vegetativos a estresses abióticos ambientais tais como seca e alta salinidade, bem como na maturação de sementes e dormência (Uno *et al.*, 2000). Especialmente sob algumas condições de estresse, como estresses hiper e hipo-osmótico, salino, de frio e de seca, o ABA atua como uma importante molécula sinal, participando da



regulação da expressão de conjuntos de genes de defesa, podendo participar também da regulação da biossíntese de metabólitos secundários em algumas culturas de células vegetais. Um exemplo disto é o aumento da produção de alcalóides indólicos em culturas de células de *Catharanthus roseus* estimulado por ABA (Zhao *et al.*, 2000). O ABA também pode ser um sinalizador para o acúmulo de metabólitos secundários induzido por estresse osmótico porque a produção de muitos metabólitos secundários de plantas pode ser estimulada por estresses osmóticos tais como sorbitol, manitol, sacarose, e estresse salino em meio de cultura, enquanto esses estresses geralmente estimulam a biossíntese de ABA. Por exemplo, tanto estresse osmótico quanto ABA podem estimular a produção de alcalóides indólicos em cultura de células de *C. roseus* (Zhao *et al.*, 2000). ABA também estimula a produção de taxol em cultura de células de *Taxus spp* (Luo *et al.*, 2001), da mesma forma que altas concentrações de sacarose e manitol estimulam o acúmulo deste diterpeno antitumoral. Foi mostrado que o estresse osmótico induziu o acúmulo de amidas do ácido hidroxi-cinâmico e de triptofano em cevada (*Hordeum vulgare*) (Ogura *et al.*, 2001). Ácido jasmônico (JA) e ABA também induziram a produção desses compostos, sugerindo que ABA e JA podem mediar o metabolismo secundário induzido por estresse osmótico. No entanto, os perfis de compostos induzidos pela aplicação de JA e ABA mostram que JA exibe atividade mais forte do que ABA sobre o acúmulo de amidas do ácido hidroxi-cinâmico, enquanto ABA é mais ativo no acúmulo de triptofano, precursor da porção indólica dos alcalóides monoterpênicos indólicos (Zhao *et al.*, 2005).

Durante o estresse de seca, a concentração de ABA nas folhas aumenta drasticamente. Essa concentração aumentada de ABA serve para o fechamento estomático, mas outros papéis desse grande aumento no nível de ABA são pouco conhecidos. Durante os estresses de seca e de salinidade, mudanças na expressão gênica têm sido documentadas.

Indução e repressão de genes durante o estresse de seca podem ser uma resposta direta às condições ambientais e/ou uma resposta às mudanças na concentração de hormônio. Alterações na concentração de ABA durante o estresse de seca podem servir para coordenar as respostas à seca e a adaptação da planta ao ambiente (Bray, 1988). Sabe-se que muitos genes induzidos por ABA contêm um elemento cis ABA-responsivo conservado chamado ABRE (do inglês, *ABA-responsive element*) em suas regiões promotoras (Uno *et al.*, 2000). Às regiões promotoras responsivas ao ABA ligam-se fatores de transcrição conhecidos como AREB (do inglês, *ABA-responsive element binding protein*) que, uma vez ligados, ativam a transcrição de genes importantes para situações de estresse. Dados recentes mostraram o envolvimento de uma proteína ligadora de RNA, FCA, como receptor de ABA na resposta de inibição da floração por este fitormônio (Razem *et al.*, 2006).

#### 4. Considerações Importantes Sobre as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS- *Reactive Oxygen Species*)

##### 4.1 Geração de ROS nos sistemas biológicos

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido formando agentes quimicamente reativos conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS) (Jamieson, 1998). ROS como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) são produzidas como sub-produtos normais do metabolismo celular aeróbico ou através da exposição a agentes ambientais, tais como radiação, fagócitos ativados do hospedeiro, ou agentes do ciclo redox. ROS podem causar danos a macromoléculas biológicas, e o dano celular causado por ROS tem sido implicado

no desenvolvimento e na progressão de várias doenças (Cyrne *et al.*, 2003). Aumentos nos níveis de ROS, tais como aqueles que podem ocorrer em períodos de estresse oxidativo, são detectados por moléculas regulatórias redox-sensíveis na célula e disparam uma resposta homeostática para prevenir o dano celular, chamada resposta ao estresse oxidativo (Camhi *et al.*, 1995).

A fonte mais comum de radicais livres nos organismos aeróbicos ocorre durante as transferências de elétrons na mitocôndria pela cadeia respiratória, que utiliza o oxigênio molecular para obtenção de energia química em forma de adenosina trifosfato (ATP) (Boveris, 1998). Em plantas, cloroplastos são também uma importante fonte de ROS, pois possuem centros de geração destas espécies químicas, tais como clorofila tripleto e a cadeia de transferência de elétrons nos fotossistemas (Edreva, 2005). ROS também podem ser geradas por processos metabólicos como autooxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas reduzidas) produzindo  $O_2^{\bullet-}$ . Além disso, fatores ambientais, como irradiação, poluição ambiental e produtos tóxicos são potenciais geradores de ROS (Henriques *et al.*, 2001).

## 4.2 Tipos de ROS

### 4.2.1 Ânion Superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

O radical superóxido ou ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é gerado normalmente durante o metabolismo aeróbico e resulta da redução monovalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ). Esse radical também pode ser gerado através da auto-oxidação, via interação com agentes redutores celulares (NADH, glutatona e outros) e via ação de diferentes compostos

químicos como o paraquat e óxido de 4-nitroquinoleína (4NQO) (Boveris, 1998; Henriques *et al.*, 2001). Outro processo que pode gerar  $O_2^{\bullet-}$  é a fagocitose, na qual os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) produzem  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  através da ação de uma oxidase que transfere elétrons do NADPH para o  $O_2$  para defesa bactericida (Forman & Thomas, 1986).

#### 4.2.2 Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um intermediário reativo do oxigênio que se torna perigoso pelo seu poder de alcance. Ele não é considerado um radical livre, pois não possui elétron desemparelhado na última camada, mas é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa da reação que produz o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ). Uma vez que o  $H_2O_2$  não reage imediatamente, ele pode migrar pela célula e atingir alvos distantes da sua formação, sendo capaz de atravessar camadas lipídicas, e podendo reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas a  $Fe^{+2}$  e  $Fe^{+3}$  (Izawa *et al.*, 1995).

#### 4.2.3 Radical hidroxila ( $OH\bullet$ )

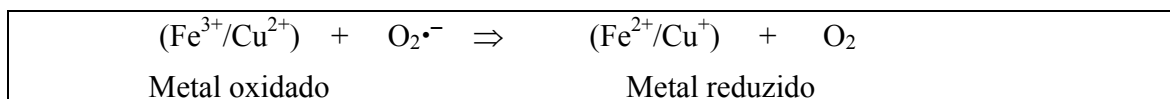
Os efeitos mais nocivos provocados pela produção tanto do  $O_2^{\bullet-}$  quanto do  $H_2O_2$  são desencadeados pela rápida subsequente formação do radical hidroxila ( $OH\bullet$ ). O  $OH\bullet$  é facilmente gerado a partir de  $H_2O_2$  através da reação de Fenton na presença de íons metálicos como  $Fe^{+2}$  ou  $Cu^{+1}$  (Fridovich, 1998).

O radical  $OH\bullet$  é considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida desse radical com metais e outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Os metais de transição, tais como

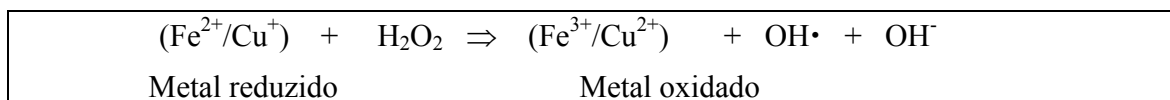
ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e cobre ( $\text{Cu}^+$ ) aumentam a velocidade da produção de  $\text{OH}\cdot$  (Freitas & Meneghini, 2001). A reação envolvendo metais ocorre em etapas: em um primeiro passo, o metal na sua valência mais alta ( $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ ) reage com o radical  $\text{O}_2\cdot^-$ , produzindo íon metálico, ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) e  $\text{O}_2$  (Reação de Haber-Weiss) (Figura 4), deixando o metal em uma valência menor. Estes íons reagem rapidamente com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando  $\text{OH}\cdot$ , íon hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) e  $\text{Fe}^{3+}$  (Reação de Fenton) (Figura 4).

O radical  $\text{OH}\cdot$  tem uma meia vida extremamente curta e sua difusão é limitada pela sua velocidade de reação. Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é evitar que o mesmo seja gerado. Por esta razão as células mantêm um rígido controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e os íons de metais são mantidos em sua valência mais alta ou estão de alguma forma complexados a enzimas e proteínas onde são armazenados ou fazem parte funcional das mesmas (revisado por Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 2000).

#### Reação de Haber-Weiss



#### Reação de Fenton



#### A soma das reações acima resulta na Reação de Haber-Weiss/Fenton

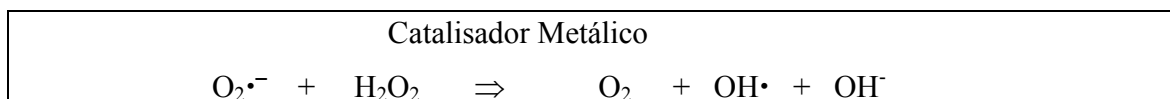


Figura 4. Representação da formação do radical  $\text{OH}\cdot$  pelas reações Haber-Weiss/Fenton. (Adaptado de Halliwell & Gutteridge, 2000).

### 4.3 Algumas Enzimas Envolvidas na Detoxificação de ROS

Incluída na resposta ao estresse oxidativo celular está a regulação da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, levando ao aumento das atividades dessas enzimas antioxidantes e, portanto, à remoção mais rápida dos oxidantes pela célula, protegendo a mesma contra o estresse oxidativo (Cyrne *et al.*, 2003).

#### 4.3.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi descoberta por McCord e Fridovich em 1969: ela dismuta  $2 \text{O}_2^{\cdot-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ . Posteriormente, esses pesquisadores mostraram que essa enzima é necessária para manter a vida em condições aeróbicas. As SODs são metalo-enzimas que pertencem a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Há várias isoenzimas do tipo SOD, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos, podendo conter cobre, zinco, ferro ou manganês em seus sítios ativos (Freitas *et al.*, 2000; Henriques *et al.*, 2001). Três SODs distintas têm sido descritas com as mesmas propriedades cinéticas: uma contém ferro no seu sítio ativo e é encontrada em procariotos; outra contém manganês e é encontrada em procariotos e nas mitocôndrias de eucariotos (MnSOD); e a terceira (Cu/ZnSOD) contém cobre e zinco e está presente principalmente no citoplasma de células eucarióticas, mas também pode ser encontrada nos lisossomos, núcleos, bem como no espaço entre as membranas mitocondriais interna e externa. Essa enzima parece ser a primeira linha de defesa contra radicais livres derivados de oxigênio e pode ser rapidamente induzida em algumas condições quando as células ou organismos são expostos a estresse oxidativo (Michiels *et al.*, 1994).

#### 4.3.2 Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima encontrada em todos os organismos conhecidos. Em células eucarióticas, ela está presente no citosol e nos peroxissomos. Essa enzima contém um grupamento heme no seu sítio ativo, sendo considerada uma hemoproteína, responsável pela sua atividade catalítica que consiste na transformação de  $2\text{H}_2\text{O}_2$  em  $2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . A ação dessa enzima envolve a oxidação divalente do ferro heme (IV), acompanhada da redução divalente do peróxido de hidrogênio. Elas contêm NADPH fortemente ligado, o qual pode prevenir a acumulação da forma ferro (IV) da enzima, a qual é inativa (Henriques *et al.*, 2001). Assim como as SODs, essa enzima pode ser induzida em algumas condições pela exposição de células ou organismos ao estresse oxidativo (Michiels *et al.*, 1994).

#### 5. *Saccharomyces cerevisiae* como Organismo Modelo para Estudos de Respostas Eucarióticas ao Estresse Oxidativo

O eucarioto inferior *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo modelo importante para o estudo de respostas eucarióticas ao estresse oxidativo (Jamieson, 1998). Trata-se de um fungo unicelular leveduriforme com ciclo eucarioto típico e completo, e tem sido amplamente estudado, tornando-se ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (Maris *et al.*, 2001; Boeira *et al.*, 2002; Pungartnik *et al.*, 2002).

Por pertencer ao grupo das leveduras anaeróbicas facultativas, *S. cerevisiae* é capaz de fermentar hexoses como glicose e frutose em condições aeróbicas e anaeróbicas de crescimento, sendo a glicose a fonte preferencial de carbono utilizada. Sabe-se que

concentrações de glicose acima de um valor chamado de concentração típica podem reprimir a expressão de genes que codificam enzimas do ciclo de Krebs, enzimas da cadeia respiratória e estruturas mitocondriais. Nesse caso, a via a ser seguida pelo piruvato é a anaeróbica com formação de etanol, sendo a atividade mitocondrial encontrada reduzida na levedura. Na presença de concentrações de glicose abaixo da concentração crítica (0,2 % no meio) e na presença de O<sub>2</sub>, o piruvato seguirá a via aeróbica, e nesse caso a levedura possuirá alta atividade mitocondrial, pois os genes em questão não estarão reprimidos (Halliwell & Gutteridge, 2000).

*S. cerevisiae* apresenta um perfil de crescimento característico. A fase “lag” corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura no qual foram introduzidas. Nessa fase, o metabolismo das células está ativo, sintetizando enzimas e coenzimas, criando condições para que elas possam se dividir, embora as células ainda não estejam se dividindo. Na fase exponencial, o número de células aumenta exponencialmente com o tempo, usando energia proveniente da fermentação. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), com uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, a divisão celular é retomada em ritmo mais lento, utilizando etanol como fonte de carbono, produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária, na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Pringle & Hartwell, 1982; Fuge & Werner-Washburne, 1997). Muitos estudos de resposta ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae* têm sido realizados com células na fase logarítmica (ou exponencial) e não na fase estacionária onde as células leveduriformes se assemelham a células de organismos multicelulares em aspectos importantes: (i) maior parte da energia



vem da respiração mitocondrial; (ii) as células estão na fase G<sub>0</sub>, e (iii) o dano gerado é acumulado durante todo o tempo (Longo *et al.*, 1996).

*S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesas antioxidantes, incluindo sistemas de defesas enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas estão presentes as enzimas SODs citoplasmática (Cu/ZnSOD, codificada pelo gene *SOD1*) e mitocondrial (MnSOD, codificada pelo gene *SOD2*), ambas responsáveis pela detoxificação do ânion superóxido (Gralla & Kosman, 1992; Longo *et al.*, 1999), e a enzima catalase representada por duas formas, uma citosólica, codificada pelo gene *CTT1*, e outra perioxossomal codificada pelo gene *CTA1*. Leveduras deficientes para os dois genes que codificam as isoformas de catalase são hipersensíveis a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na fase estacionária, e tanto os mutantes simples quanto os duplos para catalase são incapazes de montar uma resposta adaptativa ao estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Izawa *et al.*, 1996).

Existem trabalhos que utilizam linhagens isogênicas de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem no estado redox da célula (Brennan & Schiestl, 1998; Lee *et al.*, 2001). Um método, utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes oxidantes, consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em enzimas antioxidantes com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de defesa antioxidante. Pode-se também combinar um oxidante conhecido, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou paraquat, com uma substância com potencial antioxidante, e avaliar o efeito do tratamento na modulação do estresse. O aumento da viabilidade celular frente ao tratamento testado vai sugerir uma atividade protetora (antioxidante) do tratamento em questão, enquanto a diminuição da viabilidade celular, um efeito deletério (Henriques *et al.*, 2001; Picada *et al.*, 2003).

## 6. *Saccharomyces cerevisiae* e Testes de mutação *forward*

Além de serem de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos, os ensaios com levedura servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (Henriques *et al.*, 1987; Poli *et al.*, 1999; Terziyska *et al.*, 2000). A detecção das mutações se dá através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA; por esse motivo, as mutações podem ser divididas em mutações gênicas, que correspondem a alterações ocorridas na sequência nucleotídica do DNA, e cromossômicas, que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (Waters *et al.*, 1999; MacGregor *et al.*, 2000; Dearfield *et al.*, 2002).

Um dos métodos para quantificar alterações gênicas resultantes de um tratamento mutagênico é a utilização de um marcador fenotípico como, por exemplo, a sensibilidade à canavanina. A canavanina é um análogo estrutural tóxico da arginina. Muitas linhagens selvagens de *S. cerevisiae* expressam um transportador de arginina chamado Can1p. Esse transportador é responsável pela internalização da arginina na célula, sendo também capaz de importar a canavanina presente no meio causando a morte das células. Assim, alterações no gene *CAN1*, induzidas por drogas mutagênicas, podem aumentar a sobrevivência das células na presença de canavanina quando comparada a tratamentos não mutagênicos (Brendel & Henriques, 2001; Huang *et al.*, 2003).

A linhagem N123 de *S. cerevisiae* permite a detecção deste tipo de mutação, chamada mutação *forward* (Revers *et al.*, 2002), e as células revertentes podem ser

detectadas pelo cultivo das mesmas em placas de Petri contendo meio seletivo acrescido de canavanina.

## II. Objetivos

### 1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de tratamentos de estresse osmótico/oxidativo aplicados em discos foliares de *Psychotria brachyceras* sobre o acúmulo de braquicerina, bem como testar as atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica do extrato foliar bruto e do alcalóide purificado em ensaios com *Saccharomyces cerevisiae*, para melhor compreender o metabolismo e o papel do alcalóide *in planta*. Além disso, sugerir os tratamentos mais indutores de braquicerina para uma possível adaptação para produção do alcalóide com fins de testes farmacológicos e/ou pré-clínicos.

### 2. Objetivos Específicos

- Expor discos foliares de *P. brachyceras* a diferentes moléculas supostamente envolvidas em respostas de estresse osmótico ou hídrico que culminam no acúmulo de metabólitos secundários (NaCl, sorbitol, polietilenoglicol, e ácido abscísico) para avaliar seus efeitos sobre a biossíntese de braquicerina.
- Propor um mecanismo de regulação da biossíntese do alcalóide braquicerina a partir dos resultados obtidos com a aplicação dos tratamentos de estresse.
- Avaliar o efeito antioxidante do extrato foliar bruto e do alcalóide braquicerina de *P. brachyceras* sobre linhagens mutantes para genes que codificam enzimas

envolvidas na rota de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) de *S. cerevisiae*, através do ensaio *Central Disc*.

- Avaliar os potenciais mutagênico e antimutagênico do extrato foliar bruto e do alcalóide braquicerina de *P. brachyceras* através de ensaio com a linhagem N123 de *S. cerevisiae*.
- Analisar o efeito antioxidante do extrato foliar bruto e do alcalóide braquicerina de *P. brachyceras* sobre  $\text{OH}\cdot$  *in vitro*.

### III. Material e Métodos

#### 1. Material Vegetal e Confecção dos Discos Foliare

Estacas de *Psychotria brachyceras* foram coletadas de arvoretas adultas crescidas no Morro Santana, pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. As folhas sadias e bem expandidas, das quais foram obtidos os discos foliares, foram misturadas (a fim de distribuir a variabilidade das replicatas biológicas pelos tratamentos) e submetidas à assepsia superficial, em câmara de fluxo laminar vertical, na qual as mesmas foram mergulhadas em etanol 70 % por 1 minuto, em seguida passadas para solução de hipoclorito de sódio 1,5 % por 15 minutos e por fim lavadas de três a quatro vezes com água destilada autoclavada. Após a assepsia, foram confeccionados discos foliares contendo 1,0 cm de diâmetro com o auxílio de furador metálico autoclavado. A montagem dos experimentos utilizando discos foliares consistiu na incubação dos mesmos em soluções com os diferentes adjuvantes testados, sendo cada tratamento composto por um conjunto de quatro placas de Petri (quadruplicata), cada uma contendo 20 discos foliares, os quais representaram uma repetição. Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes.

#### 2. Tratamentos de Estresse Osmótico/Hídrico

Todos os experimentos tiveram como tratamento controle a exposição dos discos foliares de *P. brachyceras* à solução de sais MS 0,1 x a concentração original (Murashige

& Skoog, 1962), protocolo padrão utilizado rotineiramente para esta espécie no laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS, onde foi desenvolvido o presente trabalho.

Foram escolhidos três agentes de estresse osmótico, cloreto de sódio (NaCl), PEG 6000 e sorbitol, para serem testados quanto à sua influência sobre a biossíntese de braquicerina. Foram testadas diferentes concentrações de cada um dos agentes estressores e a montagem dos experimentos ocorreu como descrito anteriormente.

### 3. Ensaio de Atividade Enzimática

Foram determinadas as atividades das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em discos foliares de *P. brachyceras* tratados com PEG na concentração de 0,05 M e na condição controle (MS). As atividades enzimáticas foram expressas por área dos discos foliares dos quais foram feitos os extratos protéicos utilizados para realização dos ensaios de atividade enzimática.

#### 3.1 Preparação dos Extratos Enzimáticos

Para ambos ensaios de atividade enzimática, foi utilizada uma proporção de 200 mg de tecido vegetal (discos foliares): 1 mL de tampão de extração (50 mM de HEPES (pH 7,2), 2 % de PVP- polivinilpirrolidona, 2 mM de EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético, e 1 mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluorido) e Benzamidina, adicionados sobre o tecido vegetal logo antes da extração).

### 3.2 Atividade de APX

A atividade de APX foi medida em espectrofotômetro pelo decaimento da absorbância a 290 nm, pela reação de consumo de peróxidos e ácido ascórbico e produção de dehidroascorbato (Asada, 1984). Foi utilizado 1,0 mL de tampão de reação (50 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM de ácido ascórbico e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para 50 µL de extrato. Foram feitas amostras em triplicata (três extrações independentes) de cada um dos tratamentos (dia 0, discos não expostos a nenhum tratamento; Controle, discos em sais MS por 6 ou 12 horas; e PEG, discos expostos a 0,05 M de PEG por 6 ou 12 horas) e cada uma foi lida no espectrofotômetro duas vezes. Foram feitas 15 leituras, de 20 em 20 segundos, de cada amostra, totalizando um tempo de observação da atividade de APX de 4 minutos e 40 segundos para cada amostra. Para o cálculo de atividade enzimática foram utilizados cinco valores, os da primeira leitura (início da reação) e os valores correspondentes ao término de cada minuto. Como foram feitas duas leituras de cada amostra, os valores utilizados no final foram as médias das atividades obtidas de cada leitura.

### 3.3 Atividade de SOD

A atividade de SOD foi medida como descrito por Beyer & Fridovich (1987). As leituras de absorbância no espectrofotômetro foram feitas a 560 nm após 10 minutos de exposição da mistura (tampão de reação + extrato) à luz. O tampão de reação continha 50 mM de tampão fosfato (pH 7,7), 46,5 µg/mL de nitroblue tetrazolium (NBT), 1,5 mg/mL de L-metionina, 0,025 % de Triton X-100 e 55 µg/mL de Riboflavina. Nesse ensaio, uma



unidade de SOD é definida como a quantidade requerida para inibir a fotorredução do NBT em 50 %. As amostras foram feitas em triplicata (como descrito para a atividade de APX) e cada uma foi lida duas vezes. Para o cálculo da atividade de SOD foram usadas as médias das leituras.

#### 4. Extração e Quantificação do Alcalóide Braquicerina

Para análise dos teores de braquicerina foi preparado o extrato metanólico dos discos foliares de *P. brachyceras* conforme o procedimento descrito a seguir:

- Foram coletadas de três a quatro repetições, cada uma contendo 20 discos foliares, de cada tratamento nos dias 0 (teor de braquicerina nas plantas em seu ambiente natural) e nos dias 2, 4 e 6 de exposição aos tratamentos.
- Os discos foliares foram pulverizados em nitrogênio líquido e foram adicionados 2.0 mL de metanol (grau HPLC) a cada amostra.
- Os extratos metanólicos foram ultrassonicados por 30 minutos e em seguida submetidos à centrifugação a 5.000 g por 10 minutos.
- Os sobrenadantes das amostras foram recuperados e transferidos para tubos de microcentrífuga e posteriormente analisados pelo equipamento de HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) Perkin Elmer S200. A coluna utilizada foi uma C<sub>8</sub> (tamanho da partícula 0,5 µm) de fase reversa (275 x 8.0 mm) da Merck Hibar, equipada com uma pré-coluna C<sub>8</sub>. Foi utilizado um sistema de gradiente linear composto de metanol-água-ácido trifluoroacético variando de 19:81:0.05 (T<sub>0</sub>) até 100:0:0.05 (T<sub>20</sub>) em 20 min, fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Os picos eluídos foram monitorados a 280 nm.

Para obter a quantificação de braquicerina foi feita uma curva padrão baseada em concentrações conhecidas de braquicerina autêntica pura. A identidade e a pureza da braquicerina foram baseadas no tempo de retenção e co-cromatografia com braquicerina autêntica.

Para o cálculo da quantidade de braquicerina (em gramas) presente nas amostras, foram tomadas as áreas dos picos dos cromatogramas, correspondentes ao tempo de eluição do alcalóide, e os pesos secos do material vegetal do qual foram feitos os extratos. Os tecidos vegetais foram secos em estufa a 60 °C por sete dias e então pesados em balança analítica.

O teor de braquicerina foi calculado em porcentagem de braquicerina por peso seco de biomassa vegetal extraída.

## 5. Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA, seguida por teste de Duncan, quando adequado, com  $p \leq 0,05$  (Sokal & Rohlf, 1969). Foi utilizado o programa estatístico SPSS for Windows version 10.0. A homogeneidade de variância foi verificada antes da aplicação dos testes.

## 6. Ensaio com *Saccharomyces cerevisiae*

### 6.1 Substâncias Químicas

Foram utilizados o alcalóide braquicerina e o extrato foliar bruto de *P. brachyceras*. Braquicerina autêntica foi isolada de folhas de *P. brachyceras* de acordo com Kerber *et al.* (2001). Extratos foliares brutos foram preparados com 1,0 mg de folhas secas de *P. brachyceras*. As folhas foram pulverizadas com nitrogênio líquido e a extração foi feita com 5,0 mL de metanol (grau HPLC), seguida de ultrassonicação por 30 minutos e centrifugação a 5.000 g por 10 minutos. Após, os sobrenadantes foram recuperados em tubos de microcentrífuga e secos por cinco horas em SpeedVac. Os extratos secos foram utilizados nos ensaios.

Os reagentes oxidantes peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e paraquat (gerador de ânion superóxido) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). As concentrações apropriadas foram obtidas pela diluição da solução estoque em água destilada esterilizada.

DMSO (dimetil sulfoxido) foi utilizado como solvente nos ensaios de Mutagênese e Antimutagênese.

### 6.2 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e meios de cultivo

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no ensaio de *Central Disc* são defectivas em genes que codificam as enzimas superóxido dismutase (*sod1Δ*- mutante para o gene que codifica a SODCuZn, abundante no citosol; *sod2Δ*- mutante para o gene que codifica a

SODMn, abundante na mitocôndria; *sod1Δsod2Δ*- mutante para ambas as SODs) e catalase (*ctt1Δ*- mutante para o gene que codifica a catalase, presente nos peroxissomas; *sod1Δctt1Δ*- mutante para SODCuZn e catalase) envolvidas na detoxificação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente. A linhagem haplóide N123 foi usada no ensaio de Mutagênese e Antimutagênese. Como meio de crescimento de rotina foi usado o meio líquido completo YPD. Também foram utilizados o Meio Mínimo (MM) e o Meio Completo Sintético (SC), o qual consiste do MM suplementado com os aminoácidos apropriados. Para o ensaio de Mutagênese, o meio SC foi suplementado com 60 µg/mL de canavanina. Uma solução de 0.9 % de NaCl foi usada para a diluição das células em suspensão. Tampão fosfato salino (PBS) foi usado para incubação das células.

### 6.3 *Central Disc* (Ensaio de Inibição do Crescimento)

Culturas em fase estacionária de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* foram obtidas pela inoculação de uma colônia isolada em meio líquido YPD. As células de levedura foram diluídas em PBS para uma densidade apropriada de  $1-2 \times 10^7$  células/mL para o ensaio de inibição de crescimento. As células foram estriadas com uma alça de inoculação do centro da placa de Petri até a borda (cada linhagem foi estriada duas vezes por placa, consistindo em uma duplicata) em uma estria contínua; concentrações crescentes de extrato foliar bruto de *P. brachyceras* e de braquicerina (100, 250 e 500 µg/ml) foram aplicadas em um disco de papel filtro posicionado no centro da placa de Petri, em seguida as placas foram pré-incubadas por 4 horas a 30 °C. Após esse período, 5,0 µl de PBS, como controle, e 5,0 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 % ou 8,0 µL de paraquat (500 mM) foram pipetados no mesmo disco

de papel filtro e as placas foram incubadas por dois dias a 30 °C. A inibição do crescimento foi medida em mm desde a borda do disco de papel filtro até o ponto de início de crescimento das colônias.

#### 6.4 Ensaio de Mutagênese e Antimutagênese

Células de levedura (N123) numa densidade de  $1-2 \times 10^8$  células/mL foram expostas ao extrato foliar bruto de *P. brachyceras* e à braquicerina, em concentrações variando de 10 a 250 µg/mL, e incubadas por uma hora a 30 °C em termo-mixer. Para o ensaio de Antimutagênese foi feito o mesmo procedimento, porém as células mais extrato ou braquicerina foram também expostas ao agente mutagênico oxidativo e então incubadas. Alíquotas adequadas foram plaqueadas em triplicata em meio SC sólido com ou sem canavanina. As placas foram incubadas no escuro a 30 °C por 72 horas antes da contagem das colônias sobreviventes e revertentes. A mutação *forward* foi quantificada com o ensaio de resistência à canavanina (CAN1-can1) após indução com diferentes tratamentos. Os ensaios foram repetidos no mínimo três vezes e o plaqueamento para cada dose foi em triplicata.

#### 6.5 Ensaio *in vitro* (Hipoxantina/xantina oxidase)

O ensaio para determinar o potencial antioxidante da braquicerina purificada e do extrato foliar bruto de *P. brachyceras* sobre o radical hidroxila (OH•) foi baseado no método descrito por Owen *et al.* (1996). O extrato e o alcalóide foram diluídos no tampão

de ensaio (hipoxantina, Fe(III), EDTA e ácido salicílico) a uma concentração de 2.0 mg/mL e diluídos apropriadamente no tampão de ensaio para um volume final de 1,0 mL dando uma variação de 0,05 a 2,0 mg/mL. Uma alíquota de 5,0  $\mu$ L de xantina oxidase (18 mU), dissolvida em 3,2 M de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , foi adicionada para iniciar a reação. Os tubos de amostra foram incubados por três horas a 37 °C, tempo suficiente para uma reação completa. Uma alíquota de 30  $\mu$ L da mistura de reação foi analisada por HPLC usando condições cromatográficas descritas por Owen *et al.* (1996). A análise cromatográfica foi feita usando um gradiente baseado em metanol/água/ácido acético com uma coluna C18 de fase reversa  $\mu$ BondaPak (Waters) e detecção a 325 nm. O equipamento de HPLC tem um módulo de separação 2695 (Waters) e um detector de UV 2487 (Waters). A quantidade de dihidroxifenóis (2,5-ácido dihidroxibenzóico e 2,3-ácido dihidroxibenzóico) produzida pelo ataque do radical hidroxila sobre a molécula de ácido salicílico foi determinada a partir de curvas padrão dos respectivos dihidroxifenóis purificados.

## 6.6 Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada usando Anova *One-Way* seguida de Dunnett (Teste de Comparação Múltipla). Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados significantes. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média.

#### **IV. CAPÍTULO I**

**“Efeitos de Diferentes Tratamentos de Estresse Osmótico Sobre o Acúmulo de Braquicerina em Discos Foliares de *Psychotria brachyceras*”**

## 1. Estresse osmótico/hídrico/oxidativo em discos foliares de *Psychotria brachyceras*

No primeiro experimento com agentes osmóticos, foram testados cloreto de sódio (NaCl) e polietilenoglicol (PEG) em diferentes concentrações. Optou-se por estes agentes, pois NaCl é normalmente internalizado pelas células, enquanto PEG permanece do lado externo, dificultando a captação de água pelos discos foliares, atuando como uma molécula simuladora da situação de estresse hídrico (seca) (De Marañon *et al.*, 2001). Foi observado um aumento no acúmulo de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* no quarto dia de exposição ao tratamento com 0,07 M de PEG em relação ao controle (MS) (Figura 1).

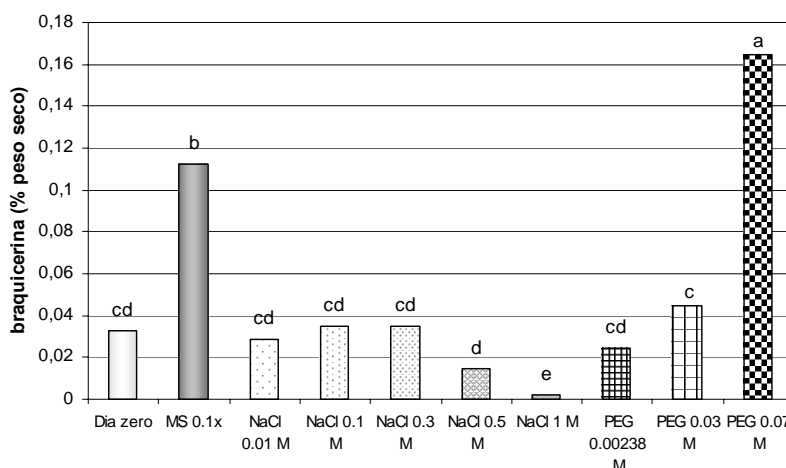


Figura 1. Teores de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* no dia zero e no quarto dia de exposição ao controle (MS) e a tratamentos com NaCl (cloreto de sódio) e PEG (polietilenoglicol 6000) em diferentes concentrações isomólicas ou não. (concentrações isomólicas: 0,01 M de NaCl e 0,00238 M de PEG; 0,3 M de NaCl e 0,07 M de PEG). Barras com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente.

Uma vez que as concentrações de NaCl utilizadas anteriormente provocaram uma diminuição nos teores do alcalóide, possivelmente por serem concentrações muito elevadas



e portanto tóxicas para a planta (Figura 1), novas concentrações de NaCl, menores que as anteriores, foram testadas em experimento subsequente. Também foram testadas outras concentrações de PEG e ainda foi incluído nos tratamentos o agente osmótico sorbitol, o qual é capaz de entrar na célula interferindo no potencial osmótico da mesma, porém não sendo metabolizado (Kim *et al.*, 2001).

Os maiores teores de braquicerina foram observados nos discos foliares de *P. brachyceras* tratados com 5,0 mM de NaCl, 0,1 M de sorbitol e 0,05 M de PEG, sendo todos eles significativamente superiores ao teor observado no controle (Figura 2).

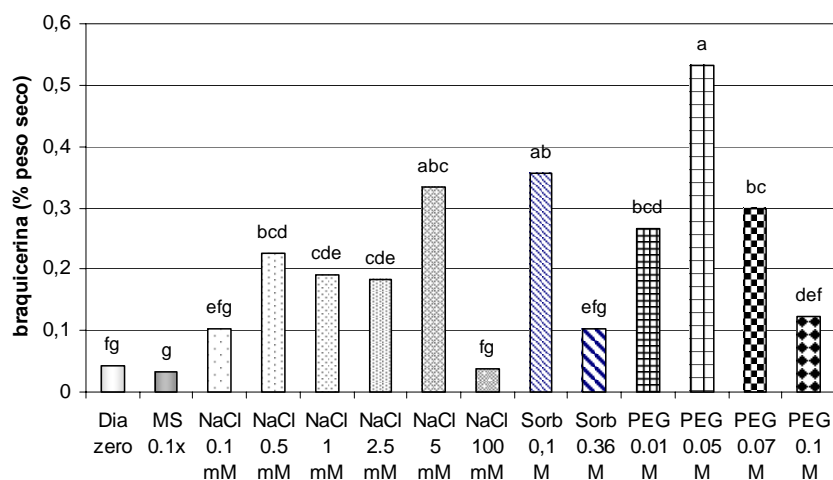


Figura 2. Teores de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* no dia zero e no quarto dia de exposição ao controle (MS) e aos tratamentos com NaCl, sorbitol e PEG (polietilenoglicol 6000) em diferentes concentrações. Barras com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente.

A partir dos resultados observados no experimento anterior (Figura 2), os tratamentos que proporcionaram um maior incremento no acúmulo do alcalóide foram selecionados para a realização de experimentos sobre a cinética de indução da biossíntese de braquicerina ao longo de quatro dias.

O tratamento com 0,05 M de PEG foi capaz de induzir o acúmulo de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* desde o primeiro dia de exposição a esse agente (Figura 3). Os maiores teores de braquicerina nos tratamentos com NaCl na concentração de 5,0 mM e sorbitol na concentração de 0,1 M foram atingidos no quarto dia de exposição a esses agentes (Figura 3) corroborando os resultados anteriores (Figura 2). A utilização do tratamento com 100 mM de NaCl teve a finalidade de observar a consistência dos resultados anteriores, o que de fato verificou-se.

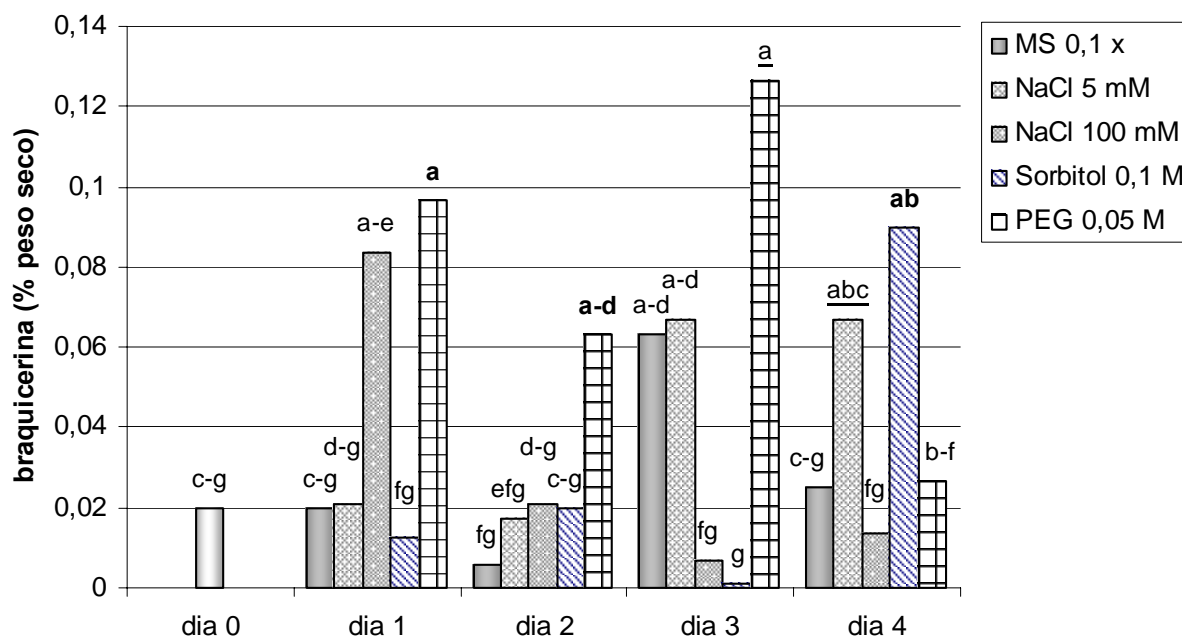


Figura 3. Teores de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* no dia zero e nos dias 1, 2, 3 e 4 de exposição ao controle (MS) e aos tratamentos com NaCl (5,0 e 100 mM), sorbitol (0,1 M) e PEG- polietilenoglicol 6000 (0,05 M). Letras em negrito representam diferenças significativas em relação ao controle (MS 0,1 x), enquanto letras sublinhadas representam a ocorrência de tendência. Barras com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente.

O fitormônio ácido abscísico (ABA) exerce reconhecido papel como sinalizador nas respostas da planta a diferentes estresses como salinidade e seca (Bray, 1997). Em função disso, discos foliares de *P. brachyceras* foram expostos a duas concentrações distintas de ABA para verificar um possível envolvimento desse fitormônio na resposta de acúmulo de braquicerina.

ABA na concentração de 10 mg/L induziu o acúmulo de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* no terceiro dia de tratamento em relação ao controle (Figura 4). A concentração de 1,0 mg/L de ABA também aumentou o acúmulo de braquicerina em comparação ao controle nos dias 3 e 4 de exposição a esse tratamento (Figura 5).

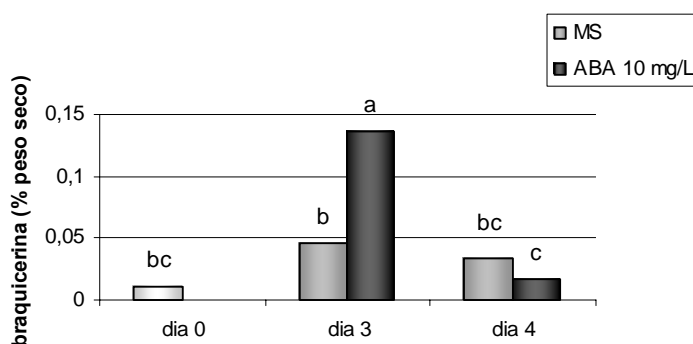


Figura 4. Teores de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* no dia zero e nos dias 3 e 4 de exposição ao controle (MS) e ao tratamento com o fitormônio ABA- ácido abscísico na concentração de 10 mg/L. Barras com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente.

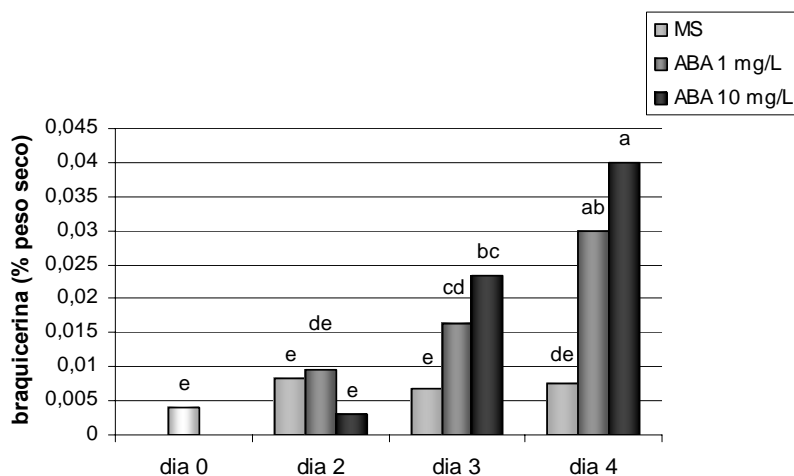


Figura 5. Teores de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* no dia zero e nos dias 2, 3 e 4 de exposição ao controle (MS) e aos tratamentos com o fitormônio ABA- ácido abscísico (1 e 10 mg/L). Barras com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente.

## 2. Atividades de Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD) em discos foliares de *P. brachyceras* tratados com PEG

As atividades de ascorbato peroxidase (APX), enzima detoxificadora de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e superóxido dismutase (SOD), enzima detoxificadora de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), foram medidas em discos foliares de *P. brachyceras* expostos a 0,05 M de PEG a fim de evidenciar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio (ROS), características do estresse oxidativo, neste tratamento indutor de acúmulo de braquicerina.

Inicialmente as atividades enzimáticas foram medidas após a exposição dos discos foliares de *P. brachyceras* a 0,05 M de PEG por dois dias. Não foram detectadas diferenças entre as atividades de APX e SOD observadas no controle e no tratamento com PEG (dados não mostrados). Supondo que o aumento das atividades enzimáticas, induzido pela geração de ROS possivelmente aumentada na presença do tratamento de estresse, ocorresse em um estágio mais inicial logo após a aplicação do estresse, inclusive antes do aumento de

braquicerina observado já no primeiro dia de tratamento dos discos com PEG a 0,05 M como mostrado anteriormente (Figura 3), decidiu-se analisar as atividades de APX e SOD após 6 ou 12 horas de incubação dos discos com o agente PEG.

A atividade de APX observada para os discos foliares tratados com 0,05 M de PEG foi significativamente maior que a observada para os discos do controle, tanto em 6 horas quanto em 12 horas de tratamento (Figura 6).

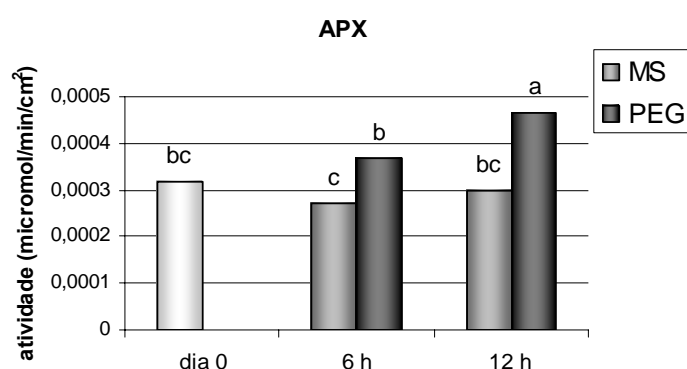


Figura 6. Atividade de ascorbato peroxidase (APX) em discos foliares de *P. brachyceras* no controle (MS) ou tratados por 6 h ou 12 h com 0,05 M de polietilenoglicol (PEG). Barras do tratamento PEG com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente do respectivo controle MS.

Não foi detectada diferença entre a atividade de SOD observada para os discos submetidos ao estresse e aquela observada para os discos do controle, embora uma tendência de aumento tenha sido aparente após 12 h em discos foliares expostos a PEG (Figura 7).

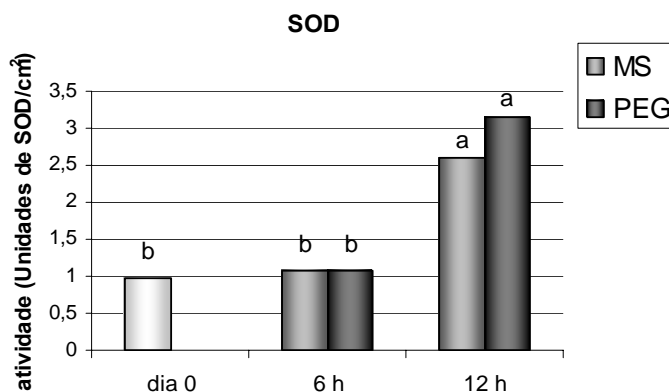


Figura 7. Atividade de superóxido dismutase (SOD) em discos foliares de *P. brachyceras* no controle (MS) ou tratados por 6 h ou 12 h com 0,05 M de polietilenoglicol (PEG). Barras com ao menos uma letra em comum não diferem estatisticamente.

### 3. Discussão

O déficit hídrico celular pode resultar de estresses tais como seca, salinidade e baixa temperatura (Bray, 1993). Nesse trabalho foram aplicados os estresses de seca e salinidade sobre discos foliares de *P. brachyceras* para avaliar o efeito desses estresses sobre o acúmulo do alcalóide braquicerina e possivelmente inferir uma função de defesa para esse alcalóide na planta. Buitink *et al.* (2006) mostraram que alguns genes relacionados ao metabolismo secundário foram precocemente induzidos transientemente em radículas de sementes de *Medicago trunculata* sensíveis à dessecação durante a incubação das mesmas com polietilenoglicol (PEG), sugerindo a participação dos produtos desses genes no processo de tolerância à seca/dessecação. Dentre esses genes induzidos estão aqueles cujos produtos são envolvidos na biossíntese do metabólito secundário medicarpina, uma fitoalexina de *M. trunculata*. Nos estágios posteriores, quando a tolerância à dessecação é estabelecida, genes dessa rota têm sua expressão diminuída. Nesse mesmo trabalho também

foi mostrado que genes expressos precocemente durante a incubação das radículas de *M. trunculata* com PEG pertencem de fato a classes envolvidas em respostas iniciais ao estresse e de adaptação.

Fatores de transcrição induzidos por estresse de seca tiveram sua expressão aumentada em radículas de *M. trunculata* durante o re-estabelecimento da tolerância à dessecação. Um fator de transcrição relacionado aos fatores de transcrição AREB (do inglês, *ABA-responsive element binding protein*) foi fortemente induzido durante a incubação das radículas de *M. trunculata* com PEG (Buitink *et al.*, 2006). Em *Arabidopsis*, a transcrição de duas proteínas ligadoras de seqüências ABRE (do inglês, *ABA-responsive element*) é induzida por seca, bem como por NaCl e ABA (Uno *et al.*, 2000). Além disso, três genes foram expressos em radículas de sementes de *M. trunculata* durante o tratamento osmótico, os quais mostraram homologia com genes que codificam proteínas DREB (do inglês, *Dehydration-responsive element binding factor*) envolvidas em uma rota independente de ABA. Dois desses genes mostraram um aumento brusco e precoce na sua expressão, enquanto o terceiro teve um aumento nos estágios posteriores da incubação com PEG. Em *Arabidopsis*, DREB1/CBFs atuam na expressão de genes responsivos ao frio, enquanto DREB2 está envolvido na expressão de genes responsivos à seca (Liu *et al.*, 1998).

No presente trabalho, foi verificado um aumento significativo no conteúdo de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* tratados com PEG (0,01 M; 0,05 M; 0,07 M e 0,1 M), NaCl (0,5 mM; 1,0 mM; 2,5 mM e 5,0 mM) e sorbitol (0,1 M) (Figuras 1, 2 e 3). Tal aumento pode ser explicado pela possível indução da expressão de genes cujos produtos estariam envolvidos na resposta da planta aos estresses de seca e salinidade, simulados pelos tratamentos testados, levando subseqüentemente à ativação da expressão

dos próprios genes codificadores das enzimas envolvidas na biossíntese de braquicerina, ou até mesmo pela indução direta desses últimos genes mencionados, como foi visto para medicarpina de *M. trunculata* (Buitink *et al.*, 2006). Além disso, a resposta que resulta no aumento de braquicerina pode ser mediada pela ativação de fatores de transcrição do tipo AREB, induzidos em radículas de plântulas de *M. trunculata* durante o tratamento com PEG e em *Arabidopsis* por seca, NaCl e ABA, ou pela ativação de fatores do tipo DREB os quais atuam em uma rota independente de ABA, expressos em radículas de *M. trunculata* durante o tratamento osmótico e em *Arabidopsis* em resposta ao frio e à seca. Independente da resposta que culmina no aumento de braquicerina ser direta ou indireta, o seu conteúdo aumentado em discos foliares de *P. brachyceras* submetidos a uma situação “interpretada” pela planta como falta de água no ambiente sugere que esse alcalóide desempenha um papel protetor na defesa da planta contra seca e salinidade.

Os mecanismos pelos quais as plantas respondem à disponibilidade reduzida de água (baixo potencial hídrico) incluem tanto processos dependentes de ABA quanto independentes de ABA (Verslues & Bray, 2006). Durante o estresse de seca, as plantas experimentam diversas mudanças fisiológicas e metabólicas, incluindo a expressão alterada de vários genes, e o concomitante aumento na concentração de ABA (Kahn *et al.*, 1993). Por exemplo, o ABA que é acumulado durante o estresse de seca é requerido para várias das mudanças na expressão gênica que ocorrem durante o estresse de seca em folhas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Bray, 1988). Foi verificado um aumento significativo no conteúdo de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras*, tanto na presença de 1,0 mg/L quanto na presença de 10 mg/L de ABA (Figuras 4 e 5). Esses resultados sugerem que a indução de braquicerina verificada nos discos foliares submetidos aos tratamentos de estresse (PEG, NaCl e sorbitol) tem a participação de ABA como sinalizador, talvez



envolvendo um aumento na concentração endógena de ABA e a possível subsequente ativação de fatores de transcrição do tipo AREB.

A redução nos teores de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras* tratados com concentrações altas de NaCl (0,01-1,0 M) (Figura 1) pode ser explicada por uma possível toxidez desse sal quando em altas concentrações, pois até mesmo plantas transgênicas de tomate superexpressando o antiporte vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, responsável por internalizar o sódio para o vacúolo, toleraram uma concentração máxima de 200 mM de NaCl (Zhang & Blumwald, 2001). Além disso, o NaCl entra na célula, ao contrário do PEG, e interfere diretamente na atividade metabólica de enzimas e membranas, podendo causar danos. Já o sorbitol, causa estresse osmótico e entra na célula, mas é metabolicamente inerte.

A ausência de aumento significativo no teor de braquicerina no quarto dia de exposição a 0,05 M de PEG nos ensaios representados na Figura 3 pode ser devida à variabilidade inerente às replicatas biológicas; por exemplo, diferenças no “status” fisiológico inicial do lote de folhas usado para confeccionar os discos que possam ter alterado a resposta prolongada ao agente estressor simulador de falta de água. Sabe-se que o teor de braquicerina varia entre os indivíduos da população, além de apresentar alterações frente a fatores ambientais a campo (Gregianini *et al.*, 2004).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a qual caracteriza o estresse oxidativo, é uma resposta comum das células vegetais ao ataque por patógenos e tratamento com elicitores. Em algumas culturas de células vegetais, ROS são suficientes para indução do acúmulo de metabólitos secundários. Em algumas plantas, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) medeia o acúmulo de metabólitos secundários induzido por elicitores, tais como o acúmulo de alcalóides indólicos em *Catharanthus roseus* e de saponina em ginseng (Zhao

et al., 2005). Em outras plantas, o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) atua como mediador do acúmulo de metabólitos secundários induzido por elicitor, tais como o acúmulo de fitoalexinas em culturas de células de *Petroselinum crispum* (salsa) e de medicarpina em alfafa (Zhao *et al.*, 2005). O mecanismo pelo qual as ROS medeiam a produção de metabólitos secundários induzida por elicitor não está esclarecido, mas sabe-se que elas induzem a expressão de muitos genes de defesa, inclusive de alguns genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários. Além disso, o estresse oxidativo causado pelas ROS pode regular a estabilidade de alguns transcritos de genes de defesa em células vegetais (Mehdy, 1994). A peroxidação lipídica mediada por  $H_2O_2$  pode iniciar a rota de octadecanóides levando à biossíntese de jasmonato e compostos relacionados, os quais foram mostrados atuando na indução da produção de metabólitos secundários vegetais (Thoma *et al.*, 2003). O envolvimento de jasmonato na via de sinalização que resulta na produção de braquicerina também foi mostrado (Gregianini *et al.*, 2004). Sabendo da relação existente entre a ocorrência de estresse oxidativo e a indução do metabolismo secundário, foram analisadas as atividades enzimáticas de ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em discos foliares de *P. brachyceras* tratados com PEG a 0,05 M. Foi verificada atividade de APX significativamente maior para os discos foliares tratados, comparada àquela observada para os discos do controle, tanto em 6 horas quanto em 12 horas de tratamento (Figura 6), sendo que tal diferença não foi detectada para a atividade de SOD (Figura 7). Sabe-se que a atividade de SOD sobre o  $O_2^{\bullet-}$  gera  $H_2O_2$ , portanto pode-se pensar que a maior concentração de  $H_2O_2$  no meio, gerada tanto pela indução do estresse oxidativo ocasionado pelo tratamento com PEG quanto pela atividade de SOD, tenha resultado numa maior atividade de APX com o intuito de diminuir a quantidade desse intermediário de oxigênio, uma vez que o mesmo é capaz de gerar o

radical hidroxila, reconhecidamente nocivo para a célula, através da reação de Fenton na presença de íons metálicos (Fridovich, 1998).

Os resultados de atividade enzimática obtidos nesse trabalho indicam que o acúmulo de braquicerina induzido em discos foliares de *P. brachyceras*, na presença de tratamentos que simulam estresses de seca e salinidade, pode ser mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assim como ocorre para o acúmulo de alcalóides indólicos em *C. roseus* (Zhao *et al.*, 2001). O aumento no teor de braquicerina na presença de estresse osmótico (ou hídrico) pode ser explicado pela geração de ROS e indução da biossíntese de isopentenil pirofosfato, precursor primário de terpenos em plantas, essencial para a biossíntese da porção terpênica de alcalóides monoterpênicos indólicos, que ocorrem nesse tipo de estresse (Nacif de Abreu & Mazzafera, 2005). A ausência de diferença significativa na atividade de SOD entre os discos tratados e não tratados pode ter ocorrido em função dos tempos escolhidos para a análise, sendo possível que haja uma maior atividade de SOD na presença do tratamento de estresse em outros períodos.

Vários estudos indicam que a aquisição de tolerância à salinidade pode ser conseqüência de uma resistência aumentada ao estresse oxidativo. Muitos desses estudos mostram uma correlação positiva entre a resistência ao estresse salino e um sistema antioxidante mais eficiente (Elkahoui *et al.*, 2005). No presente trabalho, pode-se apontar uma segunda alternativa de defesa da planta estudada frente ao estresse salino, além daquela baseada no aumento da atividade de enzimas antioxidantes, e até mesmo frente ao estresse oxidativo, baseada na indução do acúmulo do alcalóide braquicerina. A atuação da braquicerina na defesa da planta contra os estresses estudados pode ser explicada pela atividade antioxidante da mesma como molécula capturadora de oxigênio singlete *in vitro* (Gregianini *et al.*, 2003) e como protetora de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*,

defectivas em genes que codificam enzimas antioxidantes, expostas a  $H_2O_2$  ou paraquat (gerador de  $O_2\cdot^-$ ) (resultados mostrados no capítulo II da presente dissertação).

Em suma, os resultados apresentados no Capítulo I mostram que os agentes de estresse osmótico/hídrico testados (NaCl, sorbitol e PEG) podem, em determinadas concentrações, induzir a biossíntese de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras*, indicando um possível papel desse alcalóide na proteção contra o estresse osmótico/ hídrico (de salinidade e de seca). Essa resposta de acúmulo de braquicerina frente aos estresses estudados parece ser mediada pelo fitormônio ABA e pela geração de  $H_2O_2$ .

#### 4. Referências Bibliográficas

BRAY, E.A. 1988. Drought- and ABA-Induced Changes in Polypeptide and mRNA Accumulation in Tomato Leaves. *Plant Physiology*, 88(4): 1210-1214.

BRAY, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103: 1035-1040.

BRAY, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54.

BUITINK, J.; LEGER, J.J.; GUISE, I.; VU, B.L.; WUILLÈME, S.; LAMIRAULT, G.; LE BARS, A.; LE MEUR, N.; BECKER, A.; KÜSTER, H and LEPRINCE, O. 2006. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago trunculata* seeds. *The Plant Journal*, 47(5): 735-750.

DE MARAÑÓN, I.M.; TOURDOT-MARECHAL, R. and GERVAIS, P. 2001. Involvement of osmotic shrinkage on the proton extrusion rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 241-246.

ELKAHOUI, S.; HERNÁNDEZ, J.A.; ABDELLY, C.; GHRIR, R. and LIMAM, F., 2005. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science*, 168: 607-613.

FRIDOVICH, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1203-1209.

GREGIANINI, T.S., SILVEIRA, V.C., PORTO, D.D., KERBER, V.A., HENRIQUES, A.T. and FETT-NETO, A.G. 2003. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochemistry and Photobiology*, 78(5): 470-474.

GREGIANINI, T.S.; PORTO, D.D.; NASCIMENTO, N.C. do; FETT, J.P.; HENRIQUES, A.T. and FETT-NETO, A.G. 2004. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Journal of Chemical Ecology*, 30(10): 2023-2036.

KAHN, T.L.; FENDER, S.E.; BRAY, E.A. and O'CONNELL, M.A. 1993. Characterization of Expression of Drought- and Abscisic Acid-Regulated Tomato Genes in the Drought-Resistant Species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Physiology*, 103(2): 597-605.

KIM, S.I.; CHOI, H-K.; KIM, J-H.; LEE, H-S. and HONG, S-S. 2001. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 202-209.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SCHINOZAKI, K. and SHINOZAKI, K. 1998. Two transcription factors, DREB1 e DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, 10(8): 1391-1406.

MEHDY, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105:467-472.

NACIF DE ABREU, I. and MAZZAFERA, P. 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(3): 241-248.

THOMA, I.; LOEFFLER, C.; SINHA, A.K.; GUPTA, M.; KRISCHKE, M.; STEFFAN, B.; ROITSCH, T. and MUELLER, M.J. 2003. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal*, 34(3): 363-75.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K. and YAMAGUCHI-SCHINOZAKI, K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21): 11632-11637.

VERSLUES, P.E. and BRAY, E.A. 2006. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot.*, 57(1): 201-212.

ZHANG, H.X. and BLUMWALD, E. 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat Biotechnol*, 19(8): 765-8.

ZHAO, J.; HU, Q.; GUO, Y.Q. and ZHU, W.H. 2001. Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca<sup>2+</sup>-influx and the oxidative burst. *Plant Science*, 161: 423-31.

ZHAO, J.; DAVIS, L.C. and VERPOORTE, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4): 283-333.

**V. CAPÍTULO II**

**“Antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract and the alkaloid  
brachycerine of *Psychotria brachyceras*”**

(Publicado na *Environmental and Molecular Mutagenesis*)



## Research Article

## Antioxidant and Antimutagenic Effects of the Crude Foliar Extract and the Alkaloid Brachycerine of *Psychotria brachyceras*

Naíla Cannes do Nascimento,<sup>1</sup> Variluska Fragoso,<sup>1</sup> Dinara Jaqueline Moura,<sup>2</sup> Ana Catarina Romano e Silva,<sup>2</sup> Arthur Germano Fett-Neto,<sup>1</sup> and Jenifer Saffi<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

The monoterpene indole alkaloid brachycerine from *Psychotria brachyceras* has been shown to be induced by UV and to have in vitro antioxidant activity, indicating a possible protective role against the secondary effects of this radiation. In this work, we have studied the antioxidant properties of brachycerine and a crude foliar extract from *P. brachyceras* by using *Saccharomyces cerevisiae* strains proficient and deficient in antioxidant defenses. The mutagenic and antimutagenic potential of these substances were assayed in

*S. cerevisiae* N123 strain in the presence and absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In addition, we tested the antioxidant capacity of brachycerine and a crude foliar extract from *P. brachyceras* on hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>) using the hypoxanthine/xanthine oxidase assay. The results show that brachycerine and the crude foliar extract of *P. brachyceras* have antioxidant and antimutagenic effects in yeast and probably this action is mainly due to the scavenging of OH<sup>•</sup> radicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 48:728–734, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** brachycerine; monoterpene indole alkaloid; antimutagenicity; *Psychotria brachyceras*; Rubiaceae; *Saccharomyces cerevisiae*

### INTRODUCTION

Alkaloids, which are low-molecular weight nitrogen-containing organic compounds that usually have heterocyclic structures, occur in approximately 20% of all plant species and the number of identified structures exceeds 16,000 [Memelink et al., 2001]. These molecules have shown significant therapeutical properties. Monoterpene indole alkaloids (MIAs), a large and diverse class of plant alkaloids, are produced by members of Loganiaceae, Apocynaceae, and Rubiaceae families [Roberts and Strack, 1999]. Species of *Psychotria* (Rubiaceae), from southern Brazil, have been shown to contain novel bioactive MIAs, some of which exhibit opioid analgesic properties, cytotoxic effects and antibiotic or anti-inflammatory activities [Both et al., 2002; Elisabetsky et al., 2002; Pasquali et al., 2006].

*Psychotria brachyceras* Muell. Arg. is a shrub, reaching up to 3 m in height, found in the understory of tropical

and subtropical forests of Brazil, ranging from the state of Rio de Janeiro to Rio Grande do Sul [Dillenburg and Porto, 1985]. This species accumulates the major MIA brachycerine (Fig. 1). Brachycerine has been shown to have anti-inflammatory properties in a chemotaxis assay (A.T. Henriques, UFRGS, personal communication, 2006)

Grant sponsors: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

The first two authors contributed equally to this work.

\*Correspondence to: Jenifer Saffi, Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha 8001, Prédio 01/sala 122; Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas-RS, Brasil. E-mail: jenifer.saffi@ulbra.br

Received 29 May 2007; provisionally accepted 9 August 2007; and in final form 18 September 2007

DOI 10.1002/em.20349

Published online 31 October 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

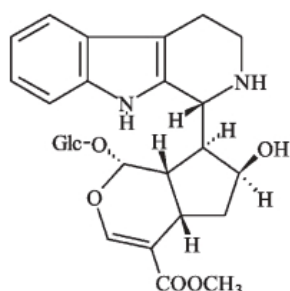


fig. 1. Chemical structure of the monoterpene indole alkaloid brachycerine.

and to exhibit *in vitro* antioxidant activity towards singlet oxygen. In addition, accumulation of this alkaloid has been shown to increase upon leaf exposure to UV radiation [Gregianini et al., 2003].

Brachycerine has peculiar chemical features, showing a primitive structure compared with the complex bisindolic alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, the model plant system used for the investigation of MIA production by *in vitro* culture techniques [Pasquali et al., 2006]. Moreover, brachycerine, together with other alkaloids like psychollatine from *P. umbellata*, represents a novel class of MIAs. The structure of brachycerine suggests the direct condensation of tryptamine with a form of *epi*-loganin, a nonsecologanin terpenoid moiety. An additional distinctive characteristic of brachycerine is that it retains a glucose residue that could improve its solubility in biological systems [Pasquali et al., 2006].

Brachycerine biosynthesis is regulated during plant development and in response to environmental stimuli. The highest accumulation of this compound is in inflorescences (0.3% dw) and leaves (0.1%–0.2%), indicating a protective role of this alkaloid in *P. brachyceras*. This role is supported by the presumed involvement of the octadecanoid pathway in the signalling of brachycerine induction, as shown by the increased content of this alkaloid in leaves exposed to wounding and jasmonate treatments. The alkaloid was not detected in roots [Gregianini et al., 2004]. Brachycerine content may vary between individuals and also seasonally. Its accumulation in leaves is reduced in the summer, when the upper-canopy is closed with foliage and light penetration in the understorey is reduced. However, in areas of higher, and better distributed rain volumes, leaf contents of the alkaloid remain stable and low throughout the year, suggesting an induction of accumulation by drought stress [Gregianini et al., 2004]. A 10-fold and a twofold increase in brachycerine content was observed in *P. brachyceras* cuttings upon irradiation with UV-C and UV-B light (16 hr a day), respectively. Moreover, antioxidant assays showed that brachycerine was also capable of quenching singlet oxygen, indicating a possible protective

role against the secondary effects of UV irradiation on the cytosol [Gregianini et al., 2003].

Reactive oxygen species (ROS) that are formed during normal metabolism and under conditions of oxidative stress are able to oxidize DNA, proteins or convert lipid and carbohydrate derivatives to compounds that react with functional groups on proteins. Therefore, the oxidative stress generated by ROS can initiate premature aging, neurodegenerative diseases, and cancer [Wiseman and Halliwell, 1996; Stadtman and Berlett, 1997]. Thus, the search for new and effective antioxidants is important. It has been observed that several plant extracts, or secondary metabolites, show strong antioxidant activity and have the capacity to protect against oxidant-induced damage [Borek, 2001; Zhang et al., 2006].

There are only few reports published about antioxidant activities of crude extracts or compounds isolated from species of *Psychotria* [Saha et al., 2004]. With this in mind, and on the basis of the observed *in vitro* antioxidant activity of brachycerine, we investigated the antioxidant and antimutagenic effects of the crude foliar extract from *P. brachyceras* and of its purified major alkaloid. To that end, we tested different concentrations of brachycerine and foliar extract from *P. brachyceras* using *in vitro* and cellular assays with mutant strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* deficient in antioxidant defense capacity.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Authentic brachycerine was isolated from leaves of *Psychotria brachyceras* [Kerber et al., 2001]. Crude leaf extracts were prepared with 1.0 mg of dry leaves extracted in 5.0 ml methanol (HPLC grade), mixed and sonicated for 30 min. The extracts were centrifuged at 5,000g for 10 min and the supernatant was recovered and then dried for 5 hr in SpeedVac at a temperature lower than 35°C. The oxidant reagents hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and paraquat (methyl viologen), amino acids, nitrogenated bases, hypoxanthine, xanthine oxidase, and salicylic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Yeast extract, bacto-peptone, bacto-agar, and yeast nitrogen base were obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI). All other reagents were of analytical grade.

For cell treatments, stock solutions of the crude extract and alkaloid were prepared immediately prior to use. In the mutagenicity and antimutagenicity assays, dimethylsulfoxide was used as solvent. The appropriate concentrations were obtained by dilution of stock solution in sterile distilled water and the final concentration of dimethylsulfoxide in the incubation mixture never exceeded 0.2% (v/v).

### *Saccharomyces cerevisiae* Strains, Media and Growth Conditions

Strains of *Saccharomyces cerevisiae* employed in this study are shown in Table I. The effects of cellular antioxidant systems on crude foliar extract and alkaloid-induced growth inhibition were studied using isogenic strains of *S. cerevisiae* deficient in superoxide dismutase and catalase. The haploid strain N123 was used for the mutagenic and antimutagenic assays. This strain is very responsive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mutagenesis, since it has low glutathione content [Brendel et al., 1998]. Complete liquid



TABLE I. *Saccharomyces cerevisiae* Strains Used in This Study

Strain	Genotype	Enzymatic defence lacking	Provider of strain
EG103 (SOD-WT)	<i>MATx leu2Δ0 his3-Δ1 trp1-289 ura3-52</i>	none	E. Gralla
EG118 ( <i>sod1Δ</i> )	like EG103, except <i>sod1::URA3</i>	Cu-Zn superoxide dismutase (cytosolic)	E. Gralla
EG110 ( <i>sod2Δ</i> )	like EG103, except <i>sod2::TRP1</i>	Mn superoxide dismutase (mitochondrial)	E. Gralla
EG133 ( <i>sod1Δ sod2Δ</i> )	like EG103, except <i>sod1::URA3 e sod2::TRP1</i>	all superoxide dismutase	E. Gralla
EG223 ( <i>ctt1Δ</i> )	like EG103, except <i>ctt1::TRP1</i>	cytosolic catalase	E. Gralla
EG213 ( <i>sod1Δctt1Δ</i> )	like EG103, except <i>sod1::URA3e ctt1::TRP1</i>	Cu-Zn superoxide dismutase and cytosolic catalase	E. Gralla
N123	<i>MATa his1-7</i>	none, but exhibits low glutathione content	J. Henriques

medium (YPD) containing 1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose was used for routine growth. For plates, the medium was solidified with 2% bacto-agar. Minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% dextrose, 0.5% ammonium sulfate. Solid media contained 2% bacto agar. Synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with appropriate amino acids and nitrogenous bases (adenine, lysine, histidine, leucine, uracil, methionine, and tryptophan) at a concentration of 2.0 mg per 100 ml MM. For the mutagenicity assay, SC-medium was supplemented with 60 µg/ml canavanine. A 0.9% NaCl solution or phosphate-buffered saline (PBS; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM; pH 5.8) was employed for dilution of cell suspensions.

Stationary phase cultures were obtained by inoculation of an isolated colony in liquid YPD medium. After 72 hr incubation at 30°C with aeration by shaking, the cultures contained 1–2 × 10<sup>8</sup> cells/ml. Cells in stationary phase of growth were used in this study because they resemble cells of multicellular organisms in important aspects: (1) most energy comes from mitochondrial respiration, (2) cells are in the G<sub>0</sub> phase, and (3) damage accumulates over time [Longo et al., 1996; Cyrne et al., 2003]. The herbicide paraquat, a redox-cycling compound, was used to increase the intracellular flux of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). The appropriate concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and paraquat were determined by survival assays, according to the differential sensitivity of each strain. Sublethal concentrations of the oxidants were used for all subsequent experiments.

### Growth Inhibition Assay

Relative sensitivities of the strains were tested by a growth inhibition assay. Stationary phase cultures of *S. cerevisiae* strains were diluted in PBS to a density of 1–2 × 10<sup>7</sup> cells/ml. An inoculation loop of cells from a cell suspension was streaked from the center to the border of a Petri dish in one continuous streak; increasing concentrations of the crude foliar extract of *P. brachyceras* and brachycerine (100, 250, or 500 µg/ml) were placed on a filter-paper disk in the center of the plate and preincubated for 4 hr at 30°C. Afterwards 5.0 µl PBS as a control, 5.0 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.0 M) or 8.0 µl of paraquat (500 mM) were placed on the same filter-paper disk and incubated for 2 days at 30°C. Impaired growth was measured as millimeter of growth inhibition from the border of the filter-disk to the beginning of cell growth. Values could be within the range from 0 mm (complete growth to the filter-disk) to 30 mm (absence of growth to the rim of the Petri dish). All tests were repeated at least three times for each treatment.

### Mutagenicity and Antimutagenicity Assay

For the mutagenicity assay, cells (strain N123) grown to a density of 1–2 × 10<sup>8</sup> cells/ml were exposed to brachycerine and crude foliar extracts of *P. brachyceras* varying in concentration from 10 to 250 µg/ml, and were then incubated for 1 hr at 30°C in a term-mixer. For the antimutagenicity assay, the same procedure was adopted, i.e., cells were submitted to pretreatment with different concentrations of alkaloid or crude foliar extract, and incubated for 1 hr with shaking at 30°C. Cells

were then washed and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. The mixture was further incubated at 30°C for 1 hr. Suitable aliquots were plated in triplicate and plates were incubated in the dark at 30°C. Survival was determined on SC (2–5 days, 30°C), and mutation induction (CAN revertants) on appropriate supplementation media (4–7 days, 30°C). Surviving and revertant colonies were counted. Forward mutation was measured with the canavanine resistance assay (CAN1-can1) [Whelan et al., 1979] after induction with different treatments. Assays were repeated at least three times, and plating for each dose was in triplicate.

### Hypoxanthine/Xanthine Oxidase In Vitro Assay

The assay employed to determine antioxidant potential of purified brachycerine and crude foliar extract of *P. brachyceras* on the hydroxyl radical scavenging was based on the method described by Owen et al., [1996]. Briefly, the crude extract and alkaloid were dissolved in the assay buffer (hypoxanthine, Fe(III), EDTA and salicylic acid) at a concentration of 2.0 mg/ml and diluted appropriately in assay buffer to a final volume of 1.0 ml giving a range of 0.05–2.0 mg/ml. A 5.0 µl aliquot of xanthine oxidase (18 mU) dissolved in 3.2 M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> was added to initiate the reaction. The sample tubes were incubated for 3 hr at 37°C, at which time the reaction was complete. A 30 µl aliquot of the reaction mixture was analyzed by HPLC, using chromatographic conditions as described by Owen et al., [1996]. Chromatographic analysis was done using a gradient based on methanol/water/acetic acid with a µBondapak C18 reverse phase column (Waters) and detection at 325 nm. The HPLC equipment had a 2695 separation module (Waters) and UV detector 2487 (Waters). The amounts of dihydroxyphenols (2,5-dihydroxybenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid) produced by hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) attack on salicylic acid were determined from standard curves prepared with the respective pure dihydroxyphenols.

### Statistics

Statistical analyses of the data were performed using Anova One-Way and Dunnett's multiple comparison test. *P*-values lower than 0.05 were considered to be significant. Data were expressed as mean ± SD.

## RESULTS

### Protective Effects of Brachycerine and Crude Foliar Extract From *P. brachyceras* in Yeast Strains Deficient in Superoxide Dismutase and/or Catalase Activity

The results of a growth inhibition assay showed that both brachycerine and the crude foliar extract of *P. brachyceras* were more effective in the protection of strains of *S. cerevisiae* against paraquat than against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figs. 2 and 3). However, the protection did not occur in a

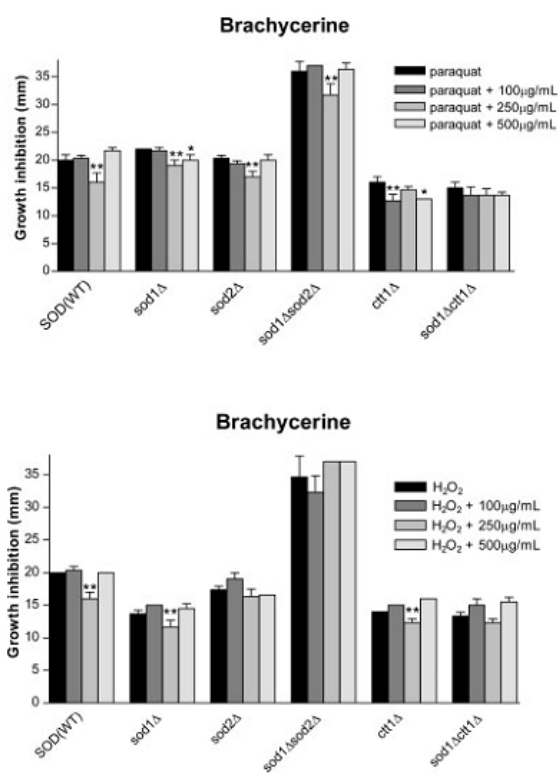


Fig. 2. Central Disc Assay. Growth inhibition (millimeter) of different *S. cerevisiae* strains exposed to paraquat and hydrogen peroxide, following pretreatment for 4 hr at 30°C with different brachycerine concentrations. Asterisks indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison with control.

dose-dependent manner and it was similar for all concentrations used; 250 µg/ml seemed to be the most efficient protective concentration tested. Moreover, the crude foliar extract was more protective than the purified alkaloid, allowing increased growth of the yeast strains in the presence of both paraquat and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The PBS controls yielded 100% growth of the various strains.

#### Mutagenic and Antimutagenic Effects of Brachycerine and Crude Foliar Extract From *P. brachyceras* in *S. cerevisiae* N123 Strain

The purified alkaloid brachycerine and the crude foliar extract from *P. brachyceras* did not induce forward mutations and were not toxic in the stationary phase of growth in *S. cerevisiae* N123 strain under the experimental conditions (Table II). To verify an intracellular protective effect of brachycerine and crude foliar extract from *P. brachyceras*, i.e., a possible role in cell oxidative stress, we treated cells with a noncytotoxic concentration (25–250 µg/ml) of

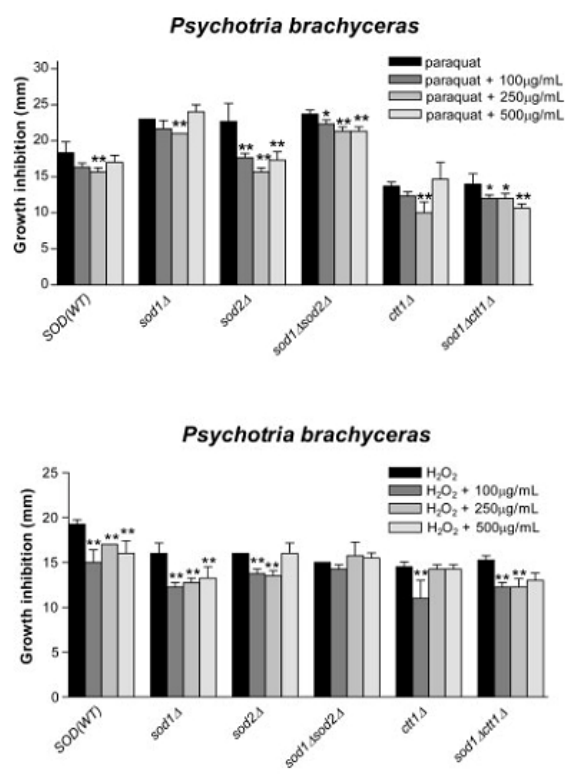


Fig. 3. Central Disc Assay. Growth inhibition (millimeter) of different *S. cerevisiae* strains exposed to paraquat and hydrogen peroxide, following pretreatment for 4 hr at 30°C with different concentrations of *P. brachyceras* crude foliar extract. Asterisks indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison with control.

the alkaloid or the extract prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of the N123 yeast strain. Both brachycerine and *P. brachyceras* extract inhibited the mutagenic action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table III). The values of percent survival of N123 strain in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were higher with the crude foliar extract than those observed with brachycerine alone (Table III).

#### In Vitro Antioxidant Capacity of Brachycerine and Crude Foliar Extract From *Psychotria brachyceras*

The antioxidant capacities of brachycerine and the crude foliar extract from *Psychotria brachyceras* on hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) were determined by monitoring the production of hydroxyl benzoic acids (DHBA) arising from attack of ROS on salicylic acid in the hypoxanthine/xanthine oxidase assay. The purified brachycerine alkaloid and the crude extract clearly showed antioxidant activity in a dose-dependent manner (Fig. 4). Brachycerine and



**TABLE II. Induction of Forward Mutation in a Stationary Phase, Haploid N123 Strain of *Saccharomyces cerevisiae* After Treatment With Brachycerine or *Psychotria brachyceras* Crude Foliar Extract**

Agent	Treatment	Survival (%)	CanR ( $10^7$ ) survival <sup>a</sup>
Solvent <sup>b</sup>		100	2.24 ± 0.63 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>d</sup>	4 mM	52.28*	13.90 ± 2.55*
Brachycerine	25 µg/ml	69.64	3.06 ± 1.09
	50 µg/ml	88.56	3.26 ± 0.62
	100 µg/ml	84.77	3.63 ± 1.19
	250 µg/ml	81.65	4.01 ± 0.44
<i>P. brachyceras</i> extract	25 µg/ml	94.64	2.53 ± 0.72
	50 µg/ml	94.10	2.58 ± 0.17
	100 µg/ml	84.45	2.90 ± 0.29
	250 µg/ml	79.49	3.90 ± 0.88

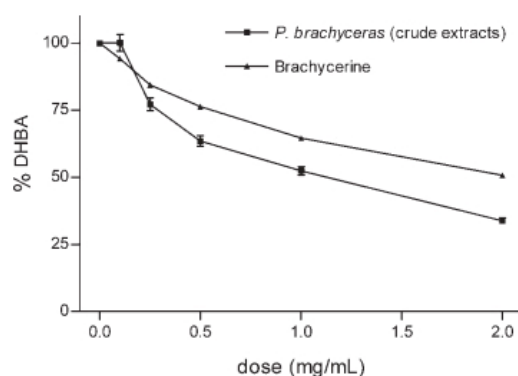
<sup>a</sup>Locus-specific revertants.<sup>b</sup>Negative Control (solvent- DMSO).<sup>c</sup>Mean and standard deviation per three independent experiments.<sup>d</sup>Positive control (hydrogen peroxide).Data significant in relation to negative control (solvent) group at  $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ; \* $P < 0.001$ /One-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test. CanR, canavanine revertants.**TABLE III. Effects of Brachycerine and Crude Foliar Extract From *Psychotria brachyceras* on Forward Mutations Induced by Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in a Stationary Phase, Haploid N123 Strain of *Saccharomyces cerevisiae***

Agent	Treatment	Survival (%)	CanR ( $10^7$ ) survival <sup>a</sup>
Solvent <sup>b</sup>		100	2.24 ± 0.63 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>d</sup>	4 mM	52.28	13.90 ± 2.55
Brachycerine	25 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	73.37	6.96 ± 1.71*
	50 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	77.48	4.85 ± 0.06*
	100 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	73.67	4.80 ± 0.05*
	250 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	52.64	6.86 ± 3.29*
<i>P. brachyceras</i> extract	25 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	84.17	4.41 ± 0.69**
	50 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	88.84	4.22 ± 0.63**
	100 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	82.17	5.35 ± 1.06*
	250 µg/ml + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	71.60	5.75 ± 0.72*

<sup>a</sup>Locus-specific revertant.<sup>b</sup>Negative Control (solvent-DMSO).<sup>c</sup>Mean and standard deviation per three independent experiments.<sup>d</sup>Positive control (hydrogen peroxide).Data significant in relation to positive control group at  $P < 0.05$ ; \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ /One-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test. CanR, canavanine revertants.*P. brachyceras* extract showed a similar scavenging action on OH<sup>•</sup>.

## DISCUSSION

Oxygen is essential for life, but it can also be deleterious. The majority of the oxygen consumed is reduced to H<sub>2</sub>O by the respiratory chain, as ATP is synthesized by oxidative phosphorylation. However, ~2% of the total oxygen

**Fig. 4.** Inhibition of the production of hydroxyl benzoic acids by brachycerine (▲) and *P. brachyceras* crude foliar extract (■) in hypoxanthine/xanthine oxidase system.

uptake undergoes incomplete reduction [Boveris, 1998], yielding superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and hydroxyl radicals ( $OH^{\bullet}$ ). These reactive species attack almost all cell components, including DNA, proteins, and lipid membranes, and sometimes cause lethal damage to the cells [Halliwell and Gutteridge, 2000]. Furthermore, ROS toxicity has been associated with a variety of human disease states and aging, as well as in the multiple-stage events of carcinogenesis [Wiseman and Halliwell, 1996; Halliwell and Gutteridge, 2000].

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been a useful model for studies of the eukaryotic response to oxidant challenge and for investigating the interplay between stress resistance and levels of damaged cell components, such as DNA. Although mutations are often induced in higher frequency in exponential as compared to stationary phase, in this work, we have used cells in stationary phase, as mentioned previously, since these resemble cells of multicellular organisms in various aspects, especially damage accumulation. In stationary phase cells, damage cannot be diluted, since cell division and new synthesis are not occurring [Longo et al., 1996]. Although the mutagenesis associated with DNA replication is best understood, studies carried out in nondividing cells may contribute significantly to understanding processes involved in tumorigenesis in higher eukaryotes (reviewed by [Abdulovic et al., 2006]).

*S. cerevisiae* produces a variety of enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase, and small molecules and peptides (glutathione and thioredoxins) that detoxify ROS. Superoxide dismutases play a protective role against toxicity of ROS by catalyzing the dismutation of superoxide radicals ( $O_2^{\bullet-}$ ) to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). *S. cerevisiae*, like other eukaryotes, contains CuZnSOD (product of the *SOD1* gene) in the cytosol and MnSOD (product of the *SOD2* gene) in the mitochondria [Jamieson, 1998]. Catalase is a ubiquitous

enzyme [Michiels et al., 1994] that converts two molecules of  $H_2O_2$  into two  $H_2O$  and  $O_2$  [Chance et al., 1979]. Two catalases of yeast, Cat1 (encoded by the *CAT1* gene) and Ctt1 (encoded by the *CTT1* gene) have been described [Hartig and Ruis, 1986; Cohen et al., 1988].

The results of growth inhibition assays using wild-type and isogenic strains lacking antioxidant defenses of *S. cerevisiae* showed that, after treatment with *P. brachyceras* extract or brachycerine, there was a decrease of the growth inhibition induced by  $H_2O_2$  and paraquat ( $O_2^{\cdot-}$  generating), showing protective effects especially at 250  $\mu\text{g/ml}$  for most of the SOD (WT) isogenic strains. The extract of *P. brachyceras* had a higher protective effect as compared to brachycerine. The antioxidant effects of both brachycerine and the crude foliar extract appear to be more pronounced against paraquat than against  $H_2O_2$  (Figs. 2 and 3). This result is in agreement with the increased activity of ascorbate peroxidase (APX), but not of superoxide dismutase (SOD), in foliar disks of *P. brachyceras* exposed to water stress; these disks show higher content of brachycerine, suggesting that the alkaloid could play a SOD-like role in the defense against ROS (Nascimento and Fett-Neto, unpublished results, 2007). Thus, it is possible that brachycerine acts as an  $O_2^{\cdot-}$  scavenger, but not like a  $H_2O_2$  scavenger. Moreover, Gregianini et al. [2003] reported that brachycerine has a possible protective role related to ROS quenching capacity in vitro towards singlet oxygen, which can be explained by the presence of a secondary amine, double bonds, OH-group and the glucose residue in the alkaloid structure (Fig. 1).

Superoxide anion has been shown to inactivate certain (4Fe-4S) cluster-containing enzymes by oxidizing one atom of iron, causing its release from the cluster [Liochev and Fridovich, 1994]. This process leads to both enzyme inactivation and further oxidative damage of other cellular components, since free iron can promote, via the Fenton reaction, the formation of hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) [Halliwell and Gutteridge, 2000]. Our results showed the most significant effects in *sod1* $\Delta$ , *sod2* $\Delta$ , *sod1* $\Delta$ *sod2* $\Delta$ , and *sod1* $\Delta$ *cct1* $\Delta$  mutants pre-treated with crude foliar extract from *P. brachyceras* (Fig. 3); these superoxide dismutase deficient mutants can accumulate excess superoxide anion and, consequently, free iron [Freitas et al., 2000]. Therefore, our results suggest a possible role of *P. brachyceras* leaf extract as a scavenger of  $OH^{\cdot}$ . The overall higher protective activity against the oxidant reagents displayed for the crude foliar extract in comparison with brachycerine can be related to the presence of substances in the extract other than the alkaloid. It is known that the flavonoid content in *P. brachyceras* leaves is  $>3$  mg/g (DW) (Correa and Fett-Neto, unpublished results, 2007), and these substances may have antioxidant activities.

The capacity of alkaloid and crude extract to scavenge  $OH^{\cdot}$  radicals was confirmed in the results of the in vitro hypoxanthine/xanthine oxidase assay (Fig. 4), in which

lower amounts of dihydroxybenzoic acids (DHBA) generated by  $OH^{\cdot}$  radical reaction with salicylic acid [Owen et al., 1996] were observed in the presence of these agents.

As previously pointed out, DNA can be a target of ROS activity. Oxidative lesions in DNA include base modifications, sugar damage, strand breaks and abasic site formation. Using the long-term survival model system of *S. cerevisiae* N123 strain maintained in stationary phase, we investigated the interplay between oxidative damage and the protective mechanism of brachycerine and leaf extract of *P. brachyceras* in nongrowing cells against  $H_2O_2$ -induced mutagenesis. Brachycerine, as well as the leaf extract of *P. brachyceras*, showed a pronounced effect at all doses tested (Table III). This antimutagenic action is probably due to the antioxidant activity of these substances, as previously observed for extracts of other medicinal plant species [Weisburger et al., 1996; Miadoková et al., 2002; Saha et al., 2004; Bruni et al., 2006].

In conclusion, the alkaloid brachycerine and the crude foliar extract of *P. brachyceras* have both antioxidant and antimutagenic effects in yeast. These activities appear to be related to their scavenging capacity towards the  $OH^{\cdot}$  radical.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. E. Gralla (Dept. of Chemistry and Biochemistry UCLA) and Dr. J.A.P. Henriques (Centro de Biotecnologia, UFRGS) for the gift of yeast strains. Assistance of Dr. Marc François Richter (Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada - ULBRA) with HPLC analysis is gratefully acknowledged.

#### REFERENCES

- Abdulovic A, Kim N, Jinks-Robertson S. 2006. Mutagen and the three R's in yeast. *DNA Repair* 5:409–421.
- Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 131(3S):1010S–1015S.
- Both FL, Kerber VA, Henriques AT, Elisabetsky E. 2002. Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharm Biol* 40:336–341.
- Boveris A. 1998. Biochemistry of free radicals; from electrons to tissues. *Medicina* 58:350–356.
- Brendel M, Grey M, Maris A, Hietkamp J, Fesus Z, Pich C, Dafré L, Schmidt M, Eckardt-Schupp F, Henriques JAP. 1998. Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Curr Genet* 33:4–9.
- Bruni R, Rossi D, Muzzoli M, Romagnoli C, Paganetto G, Besco E, Choquecillo F, Peralta K, Lora WS, Sacchetti G. 2006. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. *Fitoterapia* 77:538–545.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527–605.
- Cohen G, Rapatz W, Ruis H. 1988. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur J Biochem* 176:159–163.



- Cyme L, Martins L, Fernandes L, Marinho HS. 2003. Regulation of anti-oxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic Biol Med* 34:385–393.
- Dillenburg CR, Porto ML. 1985. RUBIACEAE—Tribo Psychotreae. *Boletim do Instituto de Biociências da UFRGS* 39:1–76.
- Elisabetsky E, Henriques AT, Misturini J, Nicoláo LL, Both FL. 2002. Avaliação da atividade analgésica de extratos alcaloídicos de espécies de *Psychotria*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai* 5:41–45.
- Freitas JM, Liba A, Meneghini R, Valentine JS, Gralla EB. 2000. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. *J Biol Chem* 275:11645–11649.
- Gregianini TS, Da Silveira VC, Porto DD, Kerber VA, Henriques AT, Fett-Neto AG. 2003. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochem Photobiol* 78:470–474.
- Gregianini TS, Porto DD, Nascimento NC, Fett JP, Henriques AT, Fett-Neto AG. 2004. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J Chem Ecol* 30:2023–2036.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- Hartig A, Ruis H. 1986. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur J Biochem* 160:487–490.
- Jamieson DJ. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14:1511–1527.
- Kerber VA, Gregianini TS, Paranhos JT, Schwambach J, Farias F, Fett JP, Fett-Neto AG, Zuanazzi JA, Quirion JC, Elisabetsky E, Henriques AT. 2001. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *J Nat Prod* 64:677–679.
- Liochev SI, Fridovich I. 1994. The role of  $O_2^{\bullet-}$  in the production of  $HO^{\bullet}$ : *In vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 16:29–33.
- Longo VD, Gralla EB, Valentine JS. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:12275–12280.
- Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. 2001. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci* 6:212–219.
- Miadoková E, Masterova I, Vlckova V, Duhova V, Toth J. 2002. Antimutagenic potential of homoisoflavonoids from *Muscari racemosum*. *J Ethnopharmacol* 81:381–386.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17:235–248.
- Owen RW, Wimonwatwatee T, Spiegelhalter B, Bartsch H. 1996. A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *Eur J Cancer Prev* 5:233–240.
- Pasquali G, Porto DD, Fett-Neto AG. 2006. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: Recent progress related to old dilemma. *J Biosci Bioeng* 101:287–296.
- Roberts MF, Strack D. 1999. Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. In: Wink M, editor. *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Annual Plant Reviews, Vol. 2. Boca Raton: CRC Press. pp 17–78.
- Saha K, Lajis NH, Israf DA, Hamzah AS, Khozirah S, Khamis S, Syahida A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 92:263–267.
- Stadtman ER, Berlett BS. 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10:485–494.
- Weisburger JH, Hara Y, Dolan L, Luo FQ, Pittman B, Zang E. 1996. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutat Res* 371:57–63.
- Whelan WL, Gocke E, Manney TR. 1979. The CAN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*: Fine-structure analyses and forward mutation rates. *Genetics* 91:35–51.
- Wiseman H, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313:17–29.
- Zhang W, Guo YW, Gu Y. 2006. Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: Chemistry and biological activity. *Curr Med Chem* 13:2041–2090.

Accepted by—  
P. Schmezer

## VI. Conclusões

A indução do alcalóide braquicerina, verificada em discos foliares de *P. brachyceras* tratados com diferentes agentes (cloreto de sódio- NaCl, polietilenoglicol-PEG e sorbitol) capazes de induzir estresse osmótico/hídrico, e estresse oxidativo secundariamente, sugere o envolvimento desse alcalóide na resposta de defesa da planta contra os danos causados por esses estresses. O acúmulo de braquicerina respondeu à presença de ácido abscísico (ABA), indicando uma possível atuação desse fitormônio como sinalizador no processo que culmina no aumento da concentração do alcalóide. Além disso, a atividade aumentada de ascorbato peroxidase (APX) em discos foliares de *P. brachyceras* expostos a PEG sugere a participação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como mediador do acúmulo de braquicerina (resultados apresentados no Capítulo I).

O ensaio testando a capacidade antioxidante de braquicerina e do extrato foliar de *P. brachyceras in vivo* mostrou que ambas as substâncias foram capazes de proteger a maioria das linhagens de *S. cerevisiae* testadas, principalmente na presença de paraquat (gerador de ânion superóxido-  $O_2^{\bullet-}$ ). O alcalóide e o extrato tiveram efeito antimutagênico em todas as concentrações utilizadas sobre a mutagênese induzida por  $H_2O_2$  na linhagem N123 de *S. cerevisiae*. A atividade antioxidante das substâncias sobre o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) *in vitro* pode ser uma das explicações para a antimutagênese observada (resultados apresentados no Capítulo II).

Reunindo os resultados obtidos nessa dissertação, pode-se inferir que a braquicerina possui papel como molécula protetora contra estresse oxidativo atuando como no modelo ilustrado proposto (Figura 1). Este efeito protetor foi observado tanto nos ensaios de estresse em discos foliares quanto nos ensaios com leveduras. Os dados obtidos sugerem



que esta propriedade deva-se à sua capacidade antioxidante sobre os radicais  $O_2^{\bullet-}$  e  $OH^{\bullet}$ , uma vez que: a) o acúmulo de braquicerina dispensa o aumento da atividade de superóxido dismutase (SOD) na presença de estresse oxidativo, b) o efeito desse alcalóide é maior sobre o  $O_2^{\bullet-}$  em comparação ao  $H_2O_2$  no ensaio de *Central Disc* com leveduras, e c) o ensaio da hipoxantina/xantina oxidase mostrou que a braquicerina atua sobre  $OH^{\bullet}$ .

Considerados os efeitos antioxidantes e antimutagênicos, os resultados abrem novas perspectivas para o potencial uso de braquicerina e *P. brachyceras* em aplicações farmacêuticas, tais como protetores solares e cosméticos.

### Estresse Osmótico/Hídrico/Oxidativo

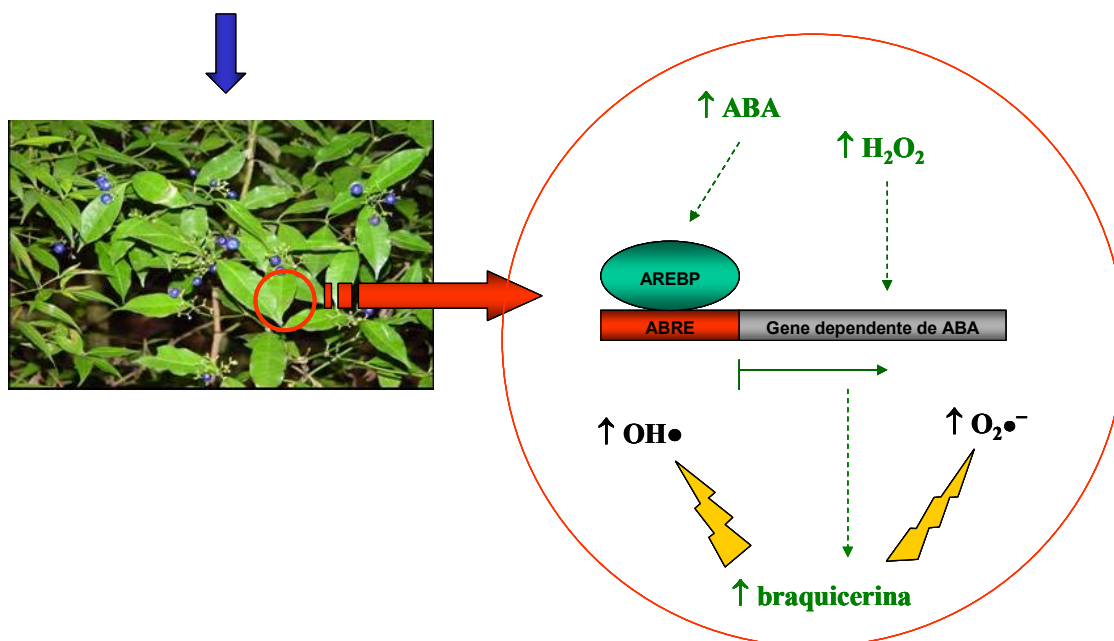


Figura 1. **Modelo proposto para o mecanismo de resposta ao estresse hídrico envolvendo o alcalóide braquicerina.** Na presença de estresse osmótico/hídrico, os níveis do fitormônio ácido abscísico (ABA) e de espécies reativas de oxigênio ( $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio,  $O_2^{\bullet-}$ : ânion superóxido e  $OH^{\bullet}$ : radical hidroxila) aumentariam na célula vegetal. O aumento na concentração de ABA levaria à ativação de fatores de transcrição do tipo AREBP (proteínas que se ligam a

elementos de resposta a ABA, representadas pela elipse verde) que ativariam a transcrição de genes dependentes de ABA (retângulo vermelho e cinza), cujos produtos participariam da ativação de outros genes envolvidos em respostas de defesa ao estresse. O aumento de  $H_2O_2$  também contribuiria para a ativação de genes de defesa. A cascata de ativação de genes de defesa culminaria na produção aumentada de braquicerina, a qual participaria da defesa da planta atuando na detoxificação dos radicais  $O_2^{\bullet-}$  e  $OH^{\bullet}$ .

## VII. Perspectivas

- Testar o efeito de outras moléculas (nitroprussiato de sódio,  $\text{AlCl}_3$ ) envolvidas no estabelecimento de estresse oxidativo sobre o acúmulo de braquicerina em discos foliares de *P. brachyceras*.
- Analisar os teores de braquicerina nos discos foliares tratados por 6 h ou 12 h com 0,05 M de PEG (Capítulo I).
- Analisar a expressão de genes que codificam enzimas chave (TDC e DXS) envolvidas nos principais braços metabólicos da biossíntese de alcalóides monoterpênicos indólicos na presença dos tratamentos que induziram braquicerina, através de RT-PCR.

## VIII. Referências Bibliográficas

ADJIBADE, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J.C.; KUBALLA, B.; CABALION, P. and ANTON, R. 1992. Dimeric alkaloids from *Psychotria fosteriana*. *Phytochemistry*, 31: 317-319.

AHRENS, W.H. 1994. Herbicide handbook. *Weed Science Society of America*, 7<sup>a</sup> ed. 352 p.

ASADA, K. 1984. Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymology*, 105: 422-429.

ASHRAF, M. and HARRIS, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166: 3-16.

BERETZ, A.; ROTH-GEORGER, A.; CORRE, G.; KUBALLA, B.; ANTON, R and CAZENALE, J.P. 1985. Polyindolic alkaloids from *Psychotria fosteriana*. Potent inhibitors of the aggregation of human platelets. *Planta Medica*, 4: 300-303.

BEYER, W.F. Jr and FRIDOVICH, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2): 559-66.

BOEIRA, J.M.; VIANA, A.F.; PICADA, J.N. and HENRIQUES, J.A.P. 2002. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 500: 39-48.

BOVERIS, A. 1998. Biochemistry of free radicals; from electrons to tissues. *Medicina*, 58: 350-356.

BRAY, E.A. 1988. Drought- and ABA-Induced Changes in Polypeptide and mRNA Accumulation in Tomato Leaves. *Plant Physiology*, 88(4): 1210-1214.

BRENDEL, M. and HENRIQUES, J.A.P. 2001. The *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutation Research*, 489: 79–96.

BRENNAN, R.J. and SCHIESTL, R.H. 1998. Free radicals generated in yeast by the Salmonella test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research*, 403: 65-73.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. and JONES, R.L. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland, 1367 p.

BUITINK, J.; LEGER, J.J; GUIBLE, I.; VU, B.L.; WUILLÈME, S.; LAMIRAULT, G.; LE BARS, A.; LE MEUR, N.; BECKER, A.; KÜSTER, H and LEPRINCE, O. 2006. Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago trunculata* seeds. *The Plant Journal*, 47(5): 735-750.

CAMHI, S.L.; LEE, P. and CHOI, A.M. 1995. The oxidative stress response. *New Horizons*, 3(2): 170-182.

CONTIN, A.; VAN DER HEIJDEN, R.; LEFEBER, A. W. and VERPOORTE, R. 1998. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Letters*, 434: 413-419.

CYRNE, L.; MARTINS, L.; FERNANDES, L. and MARINHO, H.S. 2003. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radical Biology & Medicine*, 34(3): 385-393.

DAVIS, A.P.; BRIDSON, D.; JARVIS, C. and GOVAERTS, R. 2001. The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Botanical Journal of Linnean Society*, 135: 35-42.

DE LUCA, V. and LAFLAMME, P. 2001. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 225-233.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I. and VALCOVIC, L.R. 2002. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 521: 121-135.

DILLENBURG, C. R. & PORTO, M.L. 1985. RUBIACEAE - Tribo Psychotrieae. *Boletim Instituto de Biociências da UFRGS*, 39: 1-76.

EDREVA, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 119-133.

ELISABETSKY, E. and CASTILHOS, Z.C. 1990. Ethnopharmacology of medicinal plants used as analgesic by amazonian caboclos (Brazil) as a basis for selecting plants for investigation. *International Journal of Crude Drug Research*, 28: 309-320.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; ALBUQUERQUE, R.R.; NUNES, D.S. and CARVALHO, A.C.T. 1995. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R.&S.) Muell. Arg. alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, 48: 77-83.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; LEAL, M.B.; NUNES, D.S.; CARVALHO, A.C.T. and 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.

ELKAHOUI, S.; HERNÁNDEZ, J.A.; ABDELLY, C.; GHRIR, R. and LIMAM, F., 2005. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science*, 168: 607-613.

FACCHINI, P.J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 29-66.

FORMAN, H.J. and THOMAS, M.J. 1986. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annual Review Physiology*, 48: 669-680.

FREITAS, J.M.; LIBA, A.; MENEGHINI, R.; VALENTINE, J.S. and GRALLA, E.B. 2000. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. *The Journal Biological Chemistry*, 275: 11645-11649.

FREITAS, J.M. and MENEGHINI, R. 2001. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research*, 475: 153-159.

FRIDOVICH, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1203-1209.

FUGE, E.F. and WERNER-WASHBURNE, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Hohmann, S., Mager, W.H. (eds.) *Yeast Stress Responses*, New York: Springer, p. 53-74, 1997.

GRALLA, E.B. and KOSMAN, D.J. 1992. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Advances in Genetics*, 30: 251-319.

GREGIANINI, T.S., SILVEIRA, V.C., PORTO, D.D., KERBER, V.A., HENRIQUES, A.T. and FETT-NETO, A.G. 2003. The alkaloid brachycerine is induced by ultraviolet

radiation and is a singlet oxygen quencher. *Photochemistry and Photobiology*, 78(5): 470-474.

GREGIANINI, T.S.; PORTO, D.D.; NASCIMENTO, N.C. do; FETT, J.P.; HENRIQUES, A.T. and FETT-NETO, A.G. 2004. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Journal of Chemical Ecology*, 30(10): 2023-2036.

HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. Oxford University Press, New York, 2000.

HART, N.K.; JOHNS, S.R.; LAMBERTON, J.A. and SUMMONS, R.E. 1974. Psychoridine, a C<sub>55</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub> alkaloid from *Psychotria beccarioides* (Rubiaceae). *Australian Journal of Chemistry*, 27: 639-646.

HARTLEY, S.E. and JONES, C.G. Plant chemistry and herbivory, or why the world is green. In: *Plant Ecology*. M.J. Crawley (editor), 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell Science, Oxford. P. 284-324. 1997.

HENRIQUES, J.A.P.; VALSA, J.O. e GOMES, R.A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: Pinto, S.O.C. (Ed), *Genética Molecular de Microorganismos*, Manole, São Paulo, 1987.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, L.A.; PICADA, J.N. e MARIS, A.F. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos, In: Serafini, L.A.; Barros, N.; Azevedo, J.L. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Editora Agropecuária, Guaíba, 2001.

HUANG, M.R.; RIO, A.G.; NICOLAS, A. and KOLODNER, R.D. 2003. A genome wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100(20): 11529-11534.



IZAWA, S.; INOUE, Y. and KIMURA, A. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 368(1): 73-76.

IZAWA, S.; INOUE, Y. and KIMURA, A. 1996. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal*, 320: 61-7.

JAMIESON, D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1511-1527.

KERBER, V.A.; GREGIANINI, T.S.; PARANHOS, J.T.; SCHWAMBACH, J.; FARIAS, J.; FETT, J.P.; FETT-NETO, A.G.; ZUANAZZI, J.A.S.; QUIRION, J.; ELISABETSKY, E. and HENRIQUES, A.T. 2001. Brachycerine, a novel monoterpene indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. *Journal of Natural Products*, 64(5): 677-679.

KESSLER, A. and BALDWIN, I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review in Plant Biology*, 53: 299-328.

KUTCHAN, T.M. 1993. Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene. *Phytochemistry*, 32(3): 493-506.

KUTCHAN, T.M. 1995. Alkaloid biosynthesis - the molecular basis for metabolic engineering in plants. *Plant Cell*. 7: 1059-1070.

LEAL, M. B. Estudo Psicofarmacológico de Espécies de *Psychotria* (Rubiaceae) do estado do Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1994.

LEAL, M.B. and ELISABETSKY, E. 1996. Opioid-like activity of *Psychotria brachypoda*. *International Journal of Pharmacognosy*, 34(4): 267-272.

LEE, J.H.; CHOI, I.Y.; KIL, I.S.; KIM, S.Y.; YANG, E.S. and PARK, J.W. 2001. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochemic et Biophysics Acta*, 1526: 191-198.

LIBOT, F.; MIET, C.; KUNESH, N. POISSON, J.E.; PUSSET, J. and SÉVENET, T. 1987. Rubiacées d'océanie: alcaloïdes de *Psychotria oleoides* de Nouvelle-Calédonie et de *Calycodendron milnei* du Vanuatu (Nouvelle-Hébrides). *Journal of Natural Products*, 50: 468-473.

LONGO, V.D.; GRALLA, E.B. and VALENTINE, J.S. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Biological Chemistry*, 271(21): 12275-12280.

LONGO, V.D.; LIOU, L.L.; VALENTINE, J.S. and GRALLA, E.B. 1999. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365: 131-142.

LUO, J.; LIU, L. and WU C.D. 2001. Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 23: 1345-1348.

MACGREGOR, J.T.; CASCIANO, D. and MÜLLER, L. 2000. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, 455: 3-20.

MARASCHIN, M. e VERPOORTE, R. 1999. Engenharia do metabolismo secundário. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 10: 24-28.

MARIS, A.F.; ASSUMPÇÃO, A.L.K.; BONATTO, D.; BRENDEL, M. and HENRIQUES, J.A.P. 2001. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*, 39: 137-149.

MEHDY, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105:467-472.

MEMELINK, J.; VERPOORTE, R. and KIJNE, J. W. 2001. ORCA nization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science*, 6(5): 212-218.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O. and REMACLE, J. 1994. Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 17(3): 235-248.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M. and VAN BREUSEGEM, F. 2004. The reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10): 490-498.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 709-714.

NEPOKROEFF, M.; BREMER, B. and SYTSMA, K. J. 1999. Reorganization of the genus *Psychotriae* and tribe *Psychotrieae* (Rubiaceae) inferred from ITS and *rbcL* sequence data. *System. Bot.* 24(1): 5-27.

OGURA, Y.; ISHIHARA, A. and IWAMURA, H. 2001. Induction of hydroxycinnamic acid amides and tryptophan by jasmonic acid, abscisic acid and osmotic stress in barley leaves. *Z Naturforsch.* 56: 193-202.

OWEN, R.W., WIMONWATWATEE, T., SPIEGELHALDER, B. and BARTSCH, H. 1996. A high performance liquid chromatography method for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. *European Journal of Cancer Prevention*, 5(4): 233-240.

PAYNE, G.; BRINGI, V.; PRINCE, C. and SHULER, M. 1991. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. (Munich, Viena, New York, Barcelona: Hanser Publishers).

PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; CKLESS, K.; SALVADOR, M.; BORISOV, N.N.K. and HENRIQUES, J.A.P. 2003. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutation Research*, 539: 29-41.

POLI, P.; BUSCHINI, A.; CANDI, A. and ROSSI, C. 1999. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, 14: 233-238.

PRINGLE, J.R. and HARTWELL, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach, J.R. eds. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor, NY, p. 97-142, 1982.

PUNGARTNIK, C.; PICADA, J.N.; BRENDEL, M.B. and HENRIQUES, J.A.P. 2002. Further phenotypic characterization of pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress. *Genetics Molecular Research*, 1(1): 79-89.

RAMACHANDRA RAO, S. & RAVISHANKAR, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.

RAZEM, F.A.; EL-KEREAMY, A.; ABRAMS, S.R. and HILL, R.D. 2006. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature*, 349: 290-294.

REVERS, L.F.; CARDONO, J.; BONATTO, D.; GREY, M.; FELDMANN, H.; BRENDEL, M. and HENRIQUES, J.A.P. 2002. Thermoconditional modulation of the

pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele *pso4-1*. *Nucleic Acids Research*, 30(22): 4993-5003.

RHODES, M.J.C. 1994. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, 24: 1-20.

ROBERTS, M.F. and WINK, M. 1998. *Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal applications*. New York and London, Plenum Press.

ROBERTS, M.F. and STRACK, D. 1999. Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. In: WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual Plant Review*, 1: 17-78.

ROTH, A.; KUBALLA, B.; BOUNTHAN, C.; CABALION, P. SÉVENET, T.; BECK, J.P. and ANTON, R. 1986. Cytotoxic activity of polyindole alkaloids of *Psychotria fosteriana* (Rubiaceae). *Planta Medica*, 5: 450-453.

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, L.V.; FETT-NETO, A.G.; KERBER, V.A.; ELISABETSKY, E.; QUIRION, J.C. and HENRIQUES, A.T. 2001. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Biochem. System. Ecol.* 29:1185-1187.

SCHRIPSEMA, J; DAGNINO, D. e GOSMANN, G. 2001. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. *et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. p. 689-716.

SOKAL, R.S. and ROHLF, F.J. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco. 1981.

TERZIYSKA, A.; WALTSCHEWA, L. and VENKOV, P. 2000. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, 109: 43-52.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K. and YAMAGUCHI-SCHINOZAKI, K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21): 11632-11637.

VAN BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F. and INZÉ, D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161: 405-414.

WATERS, M.D.; STACK, H.F. and JACKSON, M.A. 1999. Genetics toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutation Research*, 437: 21-49.

WINK, M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Gen.*, 75: 225-233.

WINK, M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. M. Wink (ed.), Annual Plant Reviews, vol 2, Sheffield Academic Press, p.1-16. 358p. 1999.

WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64: 3-19.

ZHAO, J.; ZHU, W.H.; HU, Q. and HE, X.W. 2000. Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnology Letters*, 22: 1221-1226.

ZHAO, J.; DAVIS, L.C. and VERPOORTE, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4): 283-333.