

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

***Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht.: propagação por  
sementes e efeito da qualidade de luz na produção do alcalóide  
N-B-D-Glicopiranosilvicosamida**

Variluska Fragoso

Orientador: Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Juçara T. Paranhos

Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas Ênfase Molecular.

Porto Alegre, dezembro de 2004.

BIO  
BIO  
286

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família que muito me apoiou desde o início de meu curso, fazendo com que o fim desta etapa não seja mérito exclusivo meu.

Agradeço muito ao Gustavo Rohenkohl e toda sua família, cuja compreensão e carinho foram muito presentes, principalmente ao longo deste último semestre de faculdade.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Arthur Germano Fett-Neto. Quanto maior nosso convívio, mais posso perceber sua inteligência e competência. Neste sentido, apesar de achar que nunca conviverei o suficiente com ele, já o tenho como um amigo.

Agradeço à Juçara T. Paranhos pelo exemplo e ensinamentos. Ela estava certa ao dizer que aprendemos muito juntas. Obrigado Jú!!!

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Amélia T. Henriques e ao Prof<sup>o</sup> Jorge Guimarães, ambos desta Universidade, pelo empréstimo do HPLC-RP e *SpectraMax*, respectivamente. Estes equipamentos foram essenciais para realização deste trabalho. Também agradeço ao Antônio Pinto, aluno do PPGBCM-UFRGS, por sua disponibilidade, ajuda e descontração durante o uso do *SpectraMax*.

Agradeço a todos os colegas do Lab. Fisiologia Vegetal desta Universidade, principalmente à Naíla, Paloma, Joséli, Daniel, Guilherme e Diogo. Mais que colegas, os considero BIOamigos.

Por fim, agradeço à UFRGS que oportunizou minha graduação. Apesar de todos problemas de falta de estrutura e verba, faz-se ainda como um centro de referência nacional.

## RESUMO

*Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht. é nativa do Brasil, Argentina e Paraguai e tem ampla distribuição no Rio Grande do Sul. Esta espécie produz um alcalóide indólico monoterpênico majoritário em folhas denominado N,  $\beta$ -D-glicopiranosilvincosamida (GPV). O extrato alcaloídico do *P. leiocarpa* apresenta atividade analgésica inespecífica.

As plantas produzem uma ampla variedade de compostos orgânicos que não participam diretamente do seu crescimento e desenvolvimento, os chamados metabólitos secundários. Os metabólitos secundários desempenham um importante papel ecológico, auxiliando na adaptação da planta ao seu ambiente. Os alcalóides compõem uma classe de metabólitos secundários que desempenham funções variadas na planta, incluindo proteção contra patógenos, proteção contra radiação UV, reserva de nitrogênio e ação alelopática.

O presente trabalho buscou otimizar protocolos de propagação via germinação de sementes de *P. leiocarpa*, visando a obtenção de material vegetal cataliticamente ativo para posteriores estudos de regulação de GPV. Além disso, também visou elucidar os efeitos de diferentes qualidades de luz no acúmulo de GPV, no intuito de identificar o provável sistema fotorreceptor envolvido na regulação de acúmulo deste composto.

Os resultados indicaram que a germinação da espécie é relativamente lenta e irregular, sendo a semeadura logo após a coleta ou após 24 horas de armazenamento sob baixas temperaturas ( $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ) bons protocolos de propagação por sementes, atingindo percentagens totais de germinação de cerca de 80% em três meses. O uso de filtros para enriquecimento de radiação visível na faixa do azul, vermelho e vermelho-extremo incidente sobre as plântulas aumentaram significativamente os teores deste alcalóide em relação à incidência de luz branca de mesma intensidade, sem afetar o crescimento das plântulas em peso seco ou o teor de hexoses e proteínas nas folhas. É

sugerido um papel regulatório para luz na biossíntese de GPV, possivelmente envolvendo mais de uma classe de fotorreceptores atuando em conjunto.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 6  |
| 1.1. Gênero <i>Psychotria</i> .....   | 6  |
| 1.1.1. <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schlecht. ....                   | 7  |
| 1.2. Alcalóides .....   | 9  |
| 1.2.1. Alcalóides indólicos monoterpênicos .....                            | 11 |
| 1.3. Efeitos da luz e da ontogênese sobre o metabolismo<br>secundário ..... | 14 |
| 2. OBJETIVOS .....  | 20 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 21 |
| 3.1. Germinação de <i>P. leiocarpa</i> .....                                | 21 |
| 3.2. Efeito da qualidade de luz no acúmulo de GPV .....                     | 22 |
| 3.2.1. Extração e análise de GPV .....                                      | 23 |
| 3.2.2. Extração e análise de proteínas e hexoses solúveis<br>totais .....   | 23 |
| 3.3. Análises estatísticas .....  | 24 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 25 |
| 4.1. Germinação de <i>P. leiocarpa</i> .....                                | 25 |
| 4.2. Efeito da qualidade de luz no acúmulo de GPV .....                     | 27 |
| 5. CONCLUSÕES .....   | 31 |
| 6. PERSPECTIVAS .....   | 32 |
| REFERÊNCIAS .....   | 33 |
| ANEXO .....   | 40 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Gênero *Psychotria*

A denominação *Psychotria* L. é resultado de uma transformação arbitrária do nome *Psychotrophum*, cuja etimologia se encontra em duas palavras gregas: *psyche* (alma) e *trophos* (alimento) (Dillenburg & Porto, 1985). *Psychotria* é o maior gênero de Rubiaceae, pertencendo à subfamília Rubioideae e tribo Psychotrieae. Vários gêneros de Rubiáceas são de uso medicinal, entre os quais têm sido relatados *Nauclea* (Benoit-Vical et al., 1998), *Cephaelis* (Yoshimatsu & Shimomura, 1991) e *Psychotria* (Adjibadé, 1989). Muitas espécies destes gêneros têm sido amplamente empregadas na medicina popular.

*Psychotria* engloba cerca de 1.650 espécies no mundo todo, a maioria de hábito arbustivo, embora árvores, ervas, lianas e epífitas sejam também conhecidas (Nepokroeff et al., 1999). Este gênero é taxonomicamente complexo devido não somente ao grande número de espécies no gênero e na tribo, mas também pela relativa falta de caracteres morfológicos disponíveis para definir os grupos.

Dillenburg e Porto (1985) estudaram a tribo Psychotrieae no Estado do Rio Grande do Sul e constataram a presença de dez espécies do gênero *Psychotria*: *P. carthagenensis* Jacq., *P. birotula* Smith & Downs mut. Char., *P. myriantha* Mull. Arg., *P. nitidula* Cham. & Schlecht., *P. brachyceras* Mull. Arg., *P. tenerior* (Cham.) Mull. Arg., *P. kleinni* Smith & Downs, *P. suterella* Mull. Arg., *P. brachypoda* (Mull. Arg.) Britton (*P. umbellata*) e *P. leiocarpa* Cham. & Schlecht.

Algumas espécies de *Psychotria* são importantes na medicina tradicional, sendo que os usos internos mais freqüentes referem-se a afecções do aparelho reprodutor feminino, auxiliar no pré e pós-parto, nas doenças brônquicas e nos distúrbios gastrointestinais. Quanto ao uso externo tem sido relatada aplicação em afecções cutâneas, tumores, úlceras, distúrbios oculares, como

cataplasmas e banhos no tratamento de febre, dores de cabeça e de ouvido (Perry, 1980; Adjibadé, 1989; Lajis *et al.*, 1993).

O gênero *Psychotria* é conhecido pela presença de alcalóides indólicos monoterpênicos cuja origem biossintética é mista. Eles derivam do triptofano e precursores terpenóides e a natureza indólica monoterpênica implica, via de regra, no envolvimento, ao menos, nas etapas iniciais da biossíntese, das enzimas triptofano descarboxilase (TDC) e estrictosidina sintase (STR) (Kutchan, 1995; Roberts & Strack, 1999). *P. colorata* produz um alcalóide denominado quimonantina, que apresentou atividade analgésica do tipo opióide (Elisabetsky *et al.*, 1997).

#### 1.1.1. *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht.

*P. leiocarpa* (Figura 1) é nativa da Argentina, Paraguai e Brasil (Smith & Downs, 1956). No Brasil é encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, onde tem ampla distribuição, ocorrendo no Litoral, Depressão Central, Missões, Serra do Sudeste, Encosta do Sudeste e Alto Uruguai (Dillenburg & Porto, 1985).

Esta espécie cresce como arbusto de até 2m de altura. As folhas possuem lâmina elíptica de base cuneada e ápice acuminado, com 4-11cm de comprimento e 1,5-3cm de largura (Figura 1). Possui estípulas interpeciolares reduzidas a duas cerdas aciculares.

As inflorescências terminais são panículas corimbiformes com brácteas triangular-filiformes na base das ramificações. As flores são hermafroditas, com cálice cilíndrico e corola branca sub-rotada, tubo subcilíndrico, 4(3-5) lobos reflexos na flor completamente aberta, estames 4(3-5) inseridos na metade superior do tubo alternados com os lobos da corola, anteras elipsoidais, estilete inteiro. O fruto é drupáceo e tem coloração azul-violácea quando maduro, com cálice persistente (Figura 1). Possui duas sementes por fruto, com endosperma abundante e aderente ao endocarpo pétreo. É uma espécie sem grandes variações morfológicas. A floração ocorre entre os meses de novembro a

janeiro e a frutificação ocorre no período de abril a junho (Dillenburg & Porto, 1985).

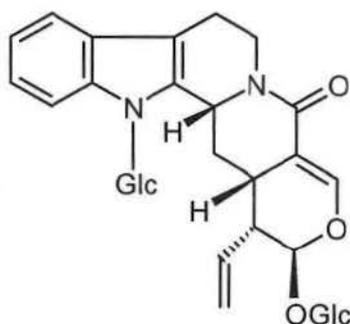


**Figura 1.** Detalhe de ramos apicais e infrutescências de *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht. Diâmetro aproximado do fruto em primeiro plano: 0,7cm.

*P. leiocarpa* é conhecida popularmente como erva-de-rato e contém excelente percentagem do alcalóide emetina nas raízes (Lopes, 1998). No Brasil, muitas psicótrias eméticas têm esta mesma denominação popular, sendo a espécie *Palicourea marcgravii* St. Hil., a erva-de-rato verdadeira. Esta denominação deriva do fato de que antigamente os frutos de *Palicourea marcgravii* St. Hil. eram misturados a alimentos para matar ratos (Hoehne, 1978).

Leal (1994) avaliou a presença de alcalóides, a toxicidade e a atividade analgésica de extratos etanólicos de *Psychotria leiocarpa* em camundongos. O trabalho demonstrou que os alcalóides parecem ser os principais responsáveis pela bioatividade dos extratos. Segundo a autora, a administração do extrato etanólico sugere uma ação de origem central e que pode envolver mecanismos opióides e outros relacionados à sedação de origem central, à diminuição motora e ptose palpebral. Por outro lado, a atividade analgésica estudada (ensaio *tail flick*) demonstrou que o efeito não foi específico e não verdadeiramente indicativo de atividade do tipo opióide. Essa atividade analgésica inespecífica do extrato etanólico de folhas de *P. leiocarpa* foi mais tarde confirmada por Elisabetsky *et al.* (1997).

Um alcalóide indol *N*-glicosilado, *N*,  $\beta$ -D-glicopiranosilvincosamida (Figura 2) foi identificado como o componente majoritário do extrato etanólico de folhas de *P. leiocarpa* (Lopes, 1998) e apresentou estrutura inédita.



**Figura 2.** Estrutura de *N*,  $\beta$ -D-glicopiranosilvincosamida. Glc = glicose (Lopes, 1998).

## 1.2. Alcalóides

O termo alcalóide é derivado da palavra árabe “*al-qali*”, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida. Alcalóides podem ser definidos como compostos orgânicos nitrogenados, de baixo peso molecular, geralmente com estrutura heterocíclica (Memelink *et al.*, 2001), os quais constituem os “princípios básicos” farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente nas Angiospermas (Kutchan, 1995). Na sua grande maioria, possuem caráter alcalino, com exceções tais como colchicina, piperina, oximas e alguns sais quaternários como o cloridrato de laurifolina (Henriques *et al.*, 2001).

Dentre as Angiospermas, segundo Robbers *et al.* (1996) os táxons Apocynaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Berberidaceae são conhecidos pela presença de grande número de espécies produtoras de alcalóides. Segundo Kutchan (1995) grande parte dos alcalóides tem uso terapêutico, como quinina e quinidina isoladas de *Cinchona* sp. (Rubiaceae), vincristina e vimblastina de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), atropina e escopolamina de *Atropa belladonna* (Solanaceae), morfina e codeína de *Papaver somniferum* (Papaveraceae).

Desde a identificação do primeiro alcalóide, morfina, a partir do ópio da papoula, *Papaver somniferum*, por Sertürner em 1806, aproximadamente 16.000 alcalóides foram isolados e suas estruturas elucidadas (Facchini, 2001; Memelink *et al.*, 2001). Estes compostos apresentam uma grande complexidade estrutural, tornando a sua elucidação em nível metabólico e enzimático difícil (Hughes e Shanks, 2002). Hipóteses detalhadas da biossíntese dos alcalóides têm sido desenvolvidas, mas existe ainda um longo caminho para o entendimento de como muitos alcalóides são sintetizados na planta e de como suas biossínteses são reguladas (Roberts e Strack, 1999).

Alcalóides ocorrem em muitas plantas medicinais e possuem uma longa e importante história na medicina tradicional (Roberts e Strack, 1999). O uso de extratos de plantas contendo alcalóides como poções, remédios e venenos, acontece desde o início da civilização. Cerca de 13.000 plantas são conhecidas por terem sido usadas como droga e aproximadamente 25% dos remédios contemporâneos são derivados das plantas e usados como compostos puros tais como o analgésico narcótico morfina, o analgésico e antitussivo codeína e os agentes quimioterapêuticos vincristina e vimblastina (Kutchan, 1995). No Brasil, estima-se que 25% do faturamento da indústria farmacêutica nacional, em 1996, seja originado de medicamentos derivados de plantas. Das espécies vegetais da flora brasileira, apenas 8% foi estudada buscando compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Garcia *et al.*, 1996). Destas, 590 plantas são registradas no Ministério da Saúde para comercialização (Ortega *et al.*, *apud* Guerra & Nodari, 2001).

Embora conhecidos como metabólitos secundários, os alcalóides apresentam papel relevante para a existência dos vegetais. Várias são as funções dos alcalóides nas plantas, principalmente na proteção contra estresses ambientais. Alguns alcalóides protegem a planta contra a radiação UV, devido ao fato de, em sua maior parte, serem compostos com núcleos aromáticos altamente absorventes desta radiação (Jansen, *et al.*, 1998).

Segundo Aniszewski *et al.* (2001), os alcalóides poderiam auxiliar na manutenção do equilíbrio iônico devido ao seu caráter alcalino. Outras

hipóteses têm sido levantadas, tais como, os alcalóides seriam produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário vegetal; poderiam também atuar como agentes alelopáticos, muito provavelmente inibidores da germinação, devido ao seu poder quelante e/ou citotóxico e, embora existam poucas evidências, os alcalóides poderiam funcionar também como uma forma de reserva de nitrogênio (Henriques *et al.*, 2001).

A função mais discutida na literatura refere-se à ação dos alcalóides como compostos de defesa das plantas. Por serem produtos tóxicos e a maioria ter gosto amargo, eles protegem a planta de herbivoria e infecção por patógenos (Wink, 1988; Facchini, 2001; Wittstock e Gershenzon, 2002). Entretanto, estes compostos defensivos representam um custo relativamente alto para as plantas devido aos recursos consumidos em sua biossíntese, sua própria toxicidade ou conseqüências ecológicas de sua acumulação (Gershenzon, 1994).

Os alcalóides são divididos em várias classes como alcalóides tropânicos, esterodais e indólicos. Em torno de 2.000 alcalóides indólicos são conhecidos e esta classe de compostos pode ser subdividida em dois grupos: um grupo maior conhecido como alcalóides indólicos monoterpênicos e um outro grupo, com os demais alcalóides indólicos (Schripsema *et al.*, 2001).

### **1.2.1. Alcalóides indólicos monoterpênicos**

Os alcalóides indólicos monoterpênicos compreendem um grupo com mais de 1.800 membros de rica diversidade estrutural. Este tipo de alcalóide tem sido isolado em três principais famílias de plantas tropicas, Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae, todas pertencentes à Ordem Gentianales (Roberts e Strack, 1999).

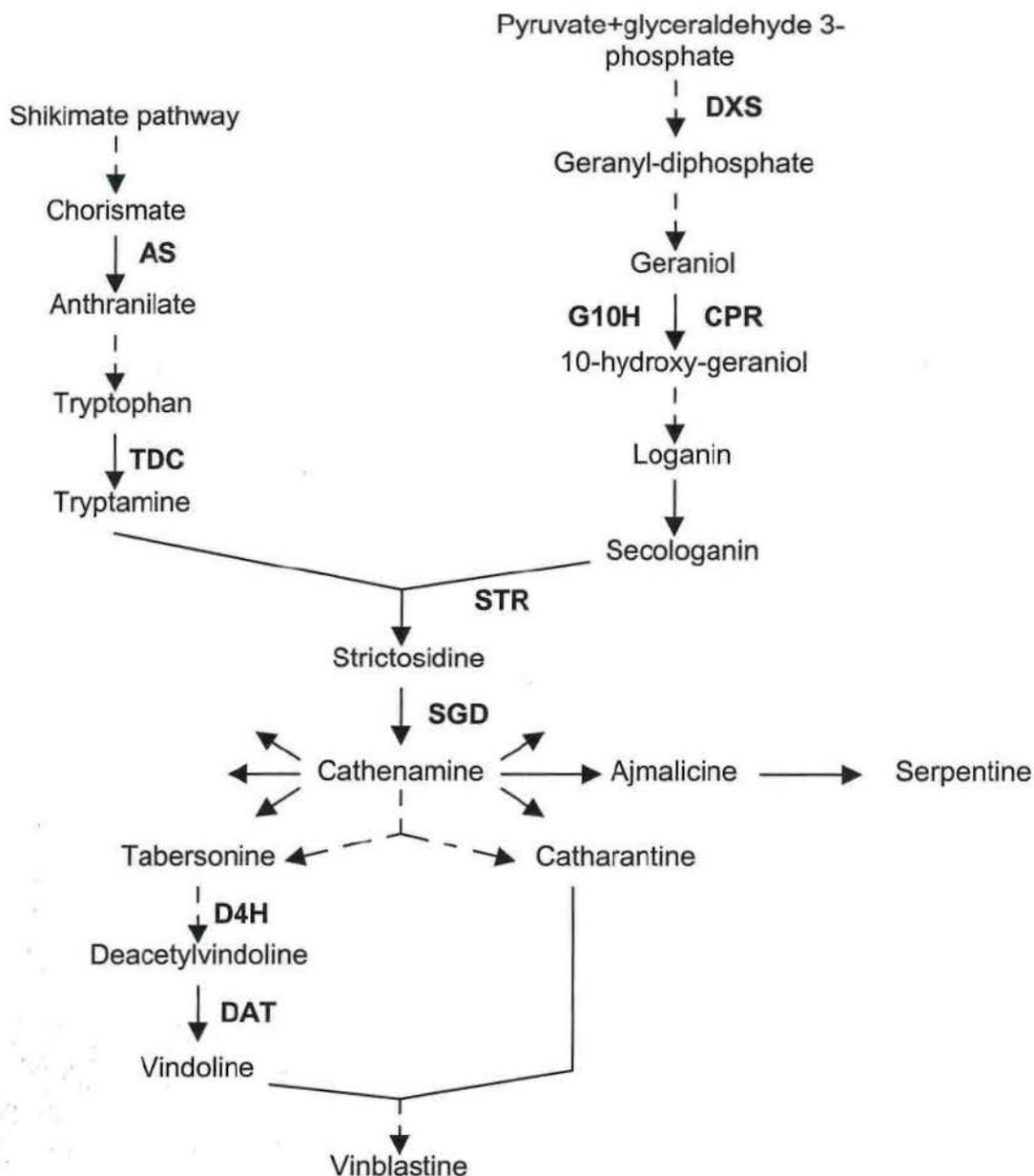
Os alcalóides indólicos monoterpênicos são, na maioria, derivados da triptamina e do monoterpene (secoiridóide) secologanina. Apesar da maioria dos membros deste grupo ser derivada destes dois compostos, diversos rearranjos do esqueleto original resultaram numa enorme variedade estrutural, com grande número de centros assimétricos. Conseqüentemente, a síntese

destes compostos continua sendo um desafio e quase todos os membros desse grupo usados na terapêutica ainda são obtidos a partir de extratos vegetais. O sistema indólico é derivado do aminoácido triptofano, o qual é descarboxilado pela enzima citossólica triptofano descarboxilase (TDS), formando triptamina. O secoiridóide secologanina e a triptamina são condensados pela enzima strictosidina sintase (STR), formando strictosidina, um alcalóide glicosilado (Figura 3). Após sua conversão através da strictosidina  $\beta$ -glicosidase (SGD), o rearranjo da aglicona leva a várias estruturas, sendo a strictosidina o intermediário central de pelo menos 3.000 alcalóides (Hallard, 2000), dentre os quais estão vários tipos de alcalóides monoterpêno indólicos.

A síntese de strictosidina, o precursor dos alcalóides indólicos, requer três compartimentos organelares. O triptofano e o terpenóide precursor geraniol são sintetizados nos plastídeos; o triptofano é então descarboxilado no citosol, e as duas moléculas são condensadas no vacúolo (De Luca e St-Pierre, 2000).

A partir da síntese de strictosidina, relativamente pouco se sabe sobre os detalhes das rotas biossintéticas que levam à formação dos vários alcalóides e somente alguns compostos de grande importância farmacológica, como a vincristina e a vinblastina, tiveram as últimas etapas da sua biossíntese investigadas em detalhe.

A purificação de STR a partir de culturas de células de *C. roseus* foi primeiramente descrita por Mizukami et al. (1979). Após, um clone parcial de cDNA foi isolado em *C. roseus* por McKnight et al. (1990); a seqüência completa de *Str* de *C. roseus* foi publicada por Pasquali et al. (1992). A enzima citossólica de TDC foi purificada por Noe et al. (1984) e seu gene foi clonado por De Luca et al. (1989) e Goddijn et al. (1994). Secologanina é um iridóide formado em várias etapas a partir do geraniol, o qual é primeiramente hidroxilado pela enzima geraniol 10-hidroxilase (G10H). Em 1999, esta enzima foi purificada e seu gene clonado a partir de culturas de células de *C. roseus* por Collu (Collu *apud* Hallard, 2000).



**Figura 3.** Biossíntese dos alcalóides indólicos em *Catharanthus roseus* (Van der Fits & Memelink, 2000). AS, antranilato sintase; DXS, D-1-deoxi-xilulose 5-fosfato sintase; G10H, geraniol 10-hidroxilase; CPR, citocromo P450 redutase; TDC, triptofano descarboxilase; STR, strictosidina sintase; SGD, strictosidina  $\beta$ -D-glicosilase; D4H, desacetoxi-vindolina 4-hidroxilase; DAT, acetil-CoA 4-O-deacetylvindolina 4-O- acetiltransferase.

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, ataques de insetos

(herbivoria), íons de metais pesados, radiação UV e choque osmótico (Facchini, 2001, Memelink et al., 2001).

### **1.3. Efeitos da luz e da ontogênese sobre o metabolismo secundário**

O desenvolvimento de cultura de células e tecidos vegetais como sistemas laboratoriais tem facilitado a elucidação de rotas em níveis enzimático e metabólico (Hughes e Shanks, 2002). Estudos em *Atropa belladonna* e *C. roseus* têm demonstrado que o estágio de desenvolvimento, influência ambiental, compartimentalização celular e diferenciação dos tecidos exercem um efeito significativo na acumulação de alcalóides (De Luca e St-Pierre, 2000). Segundo os autores, alguns passos na biossíntese de alcalóides requerem estímulos ambientais, por exemplo, a luz.

A luz desempenha papel fundamental na vida das plantas não só como fonte de energia para a assimilação do carbono inorgânico - fotossíntese, mas também tem efeito significativo no desenvolvimento e na expressão de diversos genes - fotomorfogênese (Kendrick e Kronenberg, 1994; Parks 2003). Dessa maneira, a luminosidade acaba por afetar inclusive o metabolismo de vários produtos secundários (Siebert e Kadkade, 1980; Fett-Neto et al., 1995; De Luca et al., 1989; Henriques et al., 2004).

Estudos da biossíntese de alcalóides indólicos monoterpênicos em plântulas em desenvolvimento de *Catharanthus roseus*, demonstraram que a luz é essencial para o acúmulo de vindolina, embora não seja necessária para a biossíntese de catarantina (De Luca et al., 1989). A análise das enzimas envolvidas na biossíntese destes alcalóides em presença ou ausência de luz indicou que, no caso dos alcalóides de *C. roseus*, uma acetiltransferase teve sua atividade aumentada em cerca de dez vezes após a exposição de plântulas estioladas à luz (De Luca et al., 1989). Essa atividade foi correlacionada com o acúmulo de vindolina após exposição à luz.

Henriques et al. (2004), analisando os teores de GPV acumulados em diferentes órgãos de plantas adultas de mata e de plântulas de *P. leiocarpa*,

constataram a baixa concentração ou ausência deste alcalóide nos diferentes órgãos desenvolvidos no escuro, ao contrário dos altos conteúdos encontrados nos órgãos expostos à luz. Dessa forma, os autores sugerem o envolvimento da luz no controle do acúmulo de GPV. A luz pode ser necessária para ativação de enzimas ou transcrição de genes biossintéticos da rota dos alcalóides. Alternativamente, o metabolismo do carbono fotossintético pode estar relacionado à maior acumulação de GPV em plântulas crescendo na luz pelo suprimento de intermediários biossintéticos específicos, tais como as moléculas terpênicas.

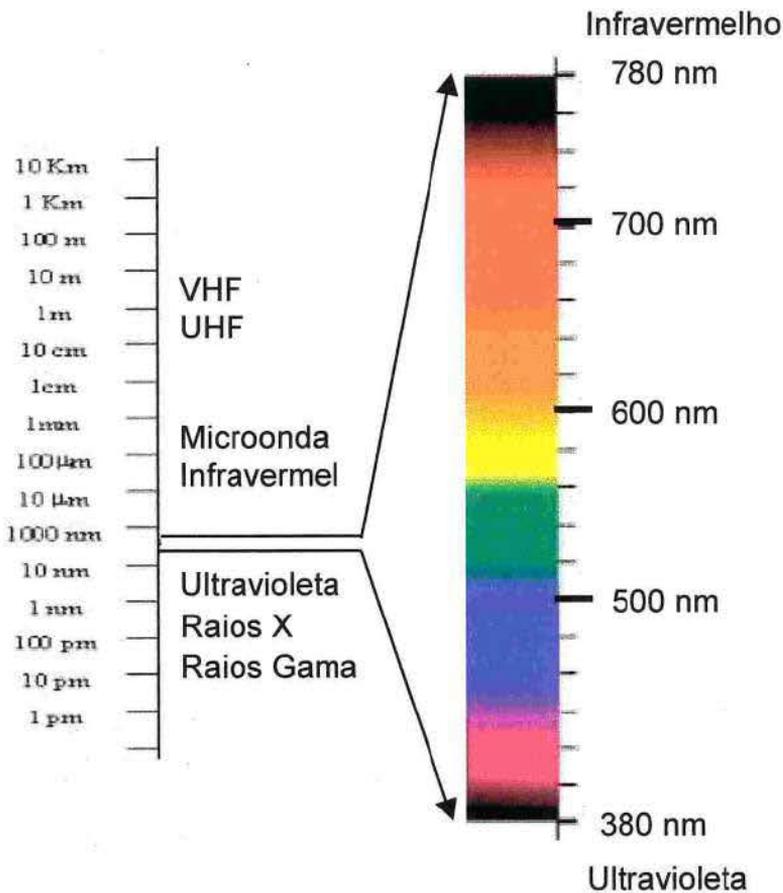
Além disto, Henriques *et al.* (2004) analisaram os teores de GPV em plântulas assépticas cultivadas no escuro e luz com ou sem fornecimento de sacarose exógena no meio. Constataram os menores conteúdos de GPV em plântulas sob escuro contínuo, tanto na presença quanto ausência de sacarose, comparados aos de plântulas crescidas na luz, sugerindo que a biossíntese do alcalóide no escuro não é limitado primariamente pelo suprimento de carbono.

Como organismos fotoautotróficos e sésseis, as plantas dependem da eficiência na captura da luz para competirem e reproduzirem-se com sucesso em suas áreas de ocorrência. Para isso, estes organismos desenvolveram dispositivos sensoriais muito sofisticados, para monitorar o status de vários fatores da iluminação: intensidade, duração, qualidade e direção luminosas (Parks, 2003). Segundo uma bem humorada analogia de Parks (2003), como crianças escolhendo pastilhas de chocolate M&Ms de diferentes grupos de cores antes de comê-los, as plantas utilizam vários fotorreceptores para “escolher” as cores da luz incidente. Contudo, diferentemente das crianças que normalmente comem todos M&Ms, independentemente da cor, as plantas apresentam preferências por cores particulares da luz, fazendo das últimas mais seletivas quanto ao que consomem.

Considerando apenas as regiões do espectro da luz visível e próximas ao infravermelho (400-850 nm) (Figura 4), as plantas desenvolveram as três maiores classes de fotorreceptores: os criptocromos (cry), as fototropinas (phot) e os fitocromos (phy) – capazes de absorver a luz na faixa do azul (400-

500 nm), do vermelho (600-700 nm) e do vermelho-extremo ou distante (700-800 nm) (Héraut-Bron, 2001; Quail, 2002; Liscum, 2003).

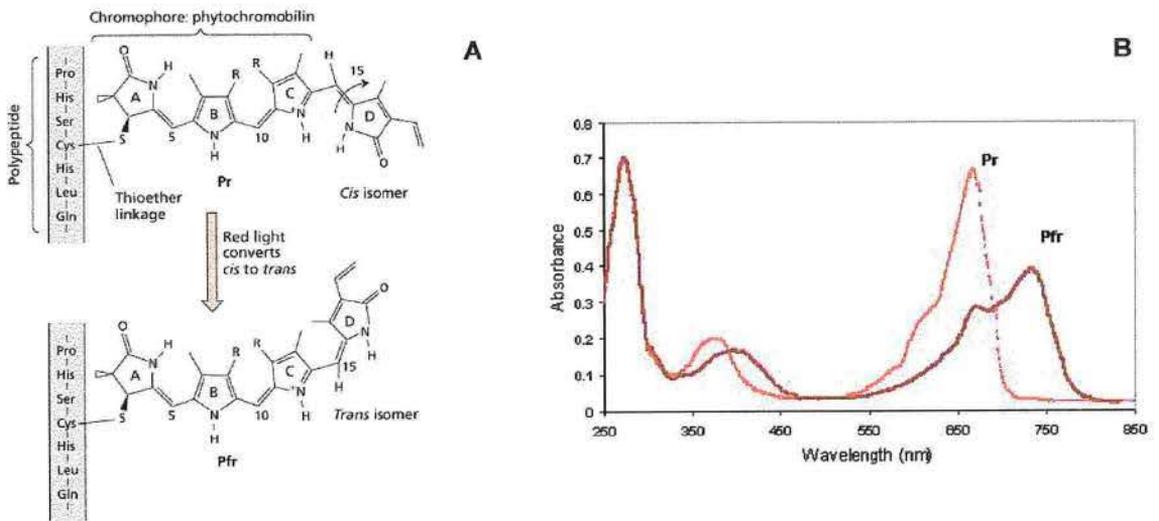
Aparentemente, as plantas têm uma capacidade restrita na percepção das informações da luz ambiente. Entretanto, adaptativamente faz sentido ajustar os processos morfo e ontogenéticos para as mesmas qualidades de luz que os utilizados pelo aparato fotossintético. De fato, a maior parte da fotomorfogênese das plantas é induzida por sinais na faixa do azul, vermelho e vermelho-extremo (Liscum, 2003).



**Figura 4.** Espectro eletromagnético da luz: suas diferentes regiões com respectivos comprimentos de onda.

Historicamente, o progresso na elucidação e entendimento sobre os processos celulares e moleculares da fotomorfogênese tem se concentrado na sinalização por luz vermelha. O descobrimento do fitocromo se deu cerca de 60 anos atrás, quando se constatou que a regulação por luz da germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) operava através de um processo

fotorreversível vermelho/vermelho-extremo (Flint, 1936; Borthwick *et al.*, 1952; Butler *et al.*, 1959). O fitocromo nativo é uma cromoproteína dimérica solúvel de aproximadamente 250 kDa. Cada dímero é composto por duas subunidades equivalentes, cada uma consistindo de dois componentes: o cromóforo – molécula de pigmento que absorve luz – e a apoproteína – cadeia polipeptídica (Figura 5A). Nas plantas superiores, o cromóforo do fitocromo é um tetrapirrol linear, a fitocromobilina. Há somente um cromóforo por monômero de apoproteína e este está ligado à proteína através de uma ligação tioéter a um resíduo de cisteína (Parks, 2003; Taiz e Zeiger, 2004).



**Figura 5A.** Estrutura das formas Pr e Pfr do cromóforo (fitocromobilina) e a região do peptídeo ligada ao cromóforo através de uma ligação tioéter. O cromóforo é submetido a uma isomerização *cis-trans* no carbono 15, em resposta à luz vermelha e vermelho-extremo. **B.** Espectros de absorção de fitocromos purificados, nas formas Pr (fitocromo vermelho) e Pfr (fitocromo vermelho-extremo). (Taiz e Zeiger, 2004).

O fotoreceptor pode existir em duas conformações fotointerconvertíveis – a forma biologicamente inativa Pr ou Fv (fitocromo vermelho,  $\lambda_{\text{máx}} \sim 670\text{nm}$ ) e a forma biologicamente ativa Pfr ou Fve (fitocromo vermelho-extremo,  $\lambda_{\text{máx}} \sim 730\text{nm}$ ) (Figura 5B). Os espectros de absorção das duas formas, além de apresentarem sobreposição, também apresentam pico de absorção na faixa do azul; dessa forma os efeitos na conversão entre Pr a Pfr e vice-versa também podem ser induzidos por esta qualidade de luz (Taiz e Zeiger, 2004; Parks, 2003).

Os eventos fotomorfogênicos nas plantas mediados pelos fitocromos incluem a produção de metabólitos secundários como monoterpenos (Yamaura e Tabata, 1991; Tanaka et al., 1989; Yamaura et al., 1989). Este grupo de pesquisadores do Japão mostrou que a promoção de acúmulo de terpenos em plântulas estioladas de tomilho (*Thymus vulgaris*) é mediado pelo fitocromo. Com ensaios de fotoconversão, nos quais as plântulas eram expostas a pulsos subseqüentes de vermelho/vermelho-extremo, os autores confirmaram que o fitocromo estaria envolvido na indução do acúmulo não só de monoterpenos, mas também de vários outros terpenóides superiores como  $\beta$ -cariofileno, fitosteróis e carotenóides (Yamaura et al., 1991).

Além disso, tais estudos também demonstraram que a irradiação com luz vermelha causou significativa redução das reservas de carboidratos nos cotilédones com o decréscimo dos níveis de açúcares, onde simultaneamente vários terpenóides foram formados. Com isso, os autores sugeriram que o fitocromo pode estar envolvido na ativação de um dreno de carbono dos açúcares para as moléculas terpênicas (Yamaura et al., 1991).

Mesmo com grandes esforços de pesquisadores, até o início da década de 1990 não houve avanços significativos no sentido da identificação dos fotorreceptores da luz azul. A partir de então, já havia técnicas moleculares disponíveis para a identificação de mutantes para respostas-chave a esta qualidade de luz e o subseqüente isolamento de genes relevantes (Taiz e Zeiger, 2004).

Inicialmente, graças à significativa homologia entre as seqüências nucleotídicas, o gene que codifica para o criptocromo (*cry1*) foi chamado de fotoliase – enzima microbial ativada pela luz azul que repara danos no DNA causados por UV (Ahmad e Cashmore, 1993). Atualmente, os criptocromos fazem parte da grande família de cromoproteínas que absorvem luz na faixa do azul que inclui as fotoliasas, porém os criptocromos, tanto de animais quanto vegetais, são incapazes de atividade de reparo de DNA (Lin e Shalitin, 2003; Sancar, 2003).

Criptocromo é uma cromoproteína de 75 kDa, e como as fotoliasas, apresenta um domínio PHR (*photolyase-related*) amino-terminal responsável

pela ligação ao cromóforo e, conseqüentemente, pela capacidade de absorção de luz. O cromóforo seria constituído por uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD), porção catalítica, e por uma pterina, molécula orgânica derivada da pteridina que funciona como pigmento, absorvendo luz (Liscum, 2003; Taiz e Zeiger, 2004).

Ahmad *et al.* (1998) demonstraram através da superexpressão da proteína CRY1 em plantas transgênicas de *Arabidopsis* que este fotorreceptor está envolvido na inibição do alongamento do caule e na indução de biossíntese de antocianinas. Plantas superexpressando CRY, apresentaram hipocótilos cerca de 10 vezes menores que os hipocótilos de mutantes *cry1*, porém acumularam antocianinas em níveis seis vezes maiores. Segundo os autores, as plantas transgênicas mostraram-se supersensíveis à luz azul.

Recentemente, foi isolado *phot1* (anteriormente chamado de *nph1*) e *phot2*, genes que codificam para fototropinas (Briggs e Christie, 2002). A metade C-terminal da fototropina é uma quinase serina/treonina e a metade N-terminal, que mostra uma reação de autofosforilação dependente de luz azul, contém dois domínios repetidos, cada um com aproximadamente 100 aminoácidos. À cada domínio da região N-terminal encontra-se ligado uma flavina mononucleotídeo (FMN), idêntica à porção flavina do FAD (Taiz e Zeiger, 2004). O maior envolvimento de fototropinas é com o crescimento fototrópico.

Outro pigmento que também está relacionado à fotopercepção da luz azul é a zeaxantina, um carotenóide de cloroplasto. Contudo, tal pigmento está mais especificamente relacionado aos movimentos estomáticos das células-guarda (Taiz e Zeiger, 2004).

Além dos fatores relacionados à luz afetarem o acúmulo de metabólitos secundários, a biossíntese destes compostos é freqüentemente, um processo dependente da presença de tecidos diferenciados ou de células especializadas, isto é, com algum grau de diferenciação (Henriques *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 1989; Yamaura, 1989; Zárata *et al.*, 2001; Verpoorte & Maraschin, 2001). Como regra geral, em vegetais há uma nítida correlação positiva entre diferenciação celular (organização celular) e a produção de metabólitos secundários.

Este aspecto pode ser compreendido mais facilmente quando se considera que determinadas vias biossintéticas ocorrem em organelas celulares específicas. Sabe-se que algumas etapas da biossíntese de monoterpenóides ocorrem em plastídeos (De Luca e St-Pierre, 2000), de modo que a presença e funcionalidade de tais estruturas é um pré-requisito para a produção desta classe de alcalóides (De Luca e Laflamme, 2001).

Yamaura *et al.* (1989), combinaram os efeitos de fatores de luminosidade aos ontogenéticos sobre o metabolismo secundário em plântulas de tomilho. Estes autores constataram que o número de tricomas glandulares foi aumentado quando as plântulas eram expostas à luz e isto gerava maiores acúmulos de monoterpenóides. Dessa forma, a desenvolvimento de tricomas glandulares estabeleceu-se como um sítio de síntese e/ou acúmulo de monoterpeno para esta espécie.

Em 1995, Rchid e Baccou observaram em cultura de células de *Trigonella foenum-graecum* que altos conteúdos de sapogeninas esteroidais foram encontrados em células com cloroplastos funcionais (Rchid e Baccou, *apud* Verpoorte e Maraschin, 2001). Por outro lado, uma correlação negativa entre o conteúdo de clorofila e a produção de sapogeninas foi observada quando as células foram mantidas em meio de cultura com alta concentração de sacarose (127 mM). Estes aspectos sugerem que a ausência de estruturas celulares especializadas em algumas culturas seria responsável pela não produção, ou pela produção em baixas quantidades, de metabólitos secundários.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho buscou otimizar protocolos de propagação via germinação de sementes de *P. leiocarpa*, visando a obtenção de material vegetal cataliticamente ativo para posteriores estudos de regulação de GPV. Além disso, também visou elucidar os efeitos de diferentes qualidades de luz no acúmulo de GPV, no intuito de identificar o provável sistema fotorreceptor envolvido na regulação de acúmulo deste composto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Germinação *P. leiocarpa*

Frutos de *P. leiocarpa* foram coletados em plantas crescendo espontaneamente no Morro Santana em Porto Alegre-RS, em junho de 2003. Após a retirada manual das polpas dos frutos, as sementes foram armazenadas em refrigerador  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  por 17 dias. As sementes foram submetidas a uma assepsia superficial com etanol 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (2,5%), acrescido de duas gotas de detergente neutro por 100 mL de solução, e a seguir foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação, as sementes foram submetidas a 12 horas de embebição em água bidestilada e autoclavada. As sementes foram semeadas em copos plásticos de 30 mL contendo uma mistura de solo e vermiculita (1:1) previamente autoclavada por 45 minutos a  $120^\circ\text{C}$  e 1,5 atm. Utilizaram-se oito sementes por repetição e 13 repetições, totalizando 104 sementes.

Um segundo lote de frutos de *P. leiocarpa* foi coletado em junho de 2004. Após a retirada manual das polpas dos frutos, as sementes foram divididas em 7 grupos. O primeiro grupo foi semeado imediatamente após a retirada das polpas e desinfestação conforme metodologia descrita acima. Outros dois grupos foram similares ao primeiro, sendo que, após a desinfestação, foram submetidos a um período de 5 horas de embebição em água bidestilada e autoclavada ou em solução contendo 5 mg/L de ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ). O quarto e quinto grupos de sementes foram armazenados durante um dia em refrigerador  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  ou em estufa  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  e a seguir foram desinfestados como descrito anteriormente. Os últimos dois grupos foram armazenados por sete dias em refrigerador  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ , desinfestados conforme descrito anteriormente e submetidos a 5 horas de embebição em água bidestilada e autoclavada ou em solução contendo 5 mg/L de  $\text{GA}_3$ . Foram utilizadas oito sementes por repetição e 11 repetições por tratamento.

Todas as sementes foram semeadas em copos plásticos de 50 mL contendo uma mistura de solo e vermiculita (1:1) previamente autoclavada por 45 minutos a 120°C e 1,5 atm. Os copos foram mantidos em pequenas estufas de 60 x 100 cm cobertas com plástico transparente em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/dia (R.F.A. de  $\sim 60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , lâmpadas fluorescentes brancas) e temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Mensalmente, avaliou-se o tempo médio e a percentagem total de germinação.

### 3.2. Efeito da qualidade de luz no acúmulo de GPV

Para identificar o sistema fotorreceptor envolvido na regulação da biossíntese de GPV, realizou-se um experimento utilizando-se filtros enriquecidos para diferentes comprimentos de onda. Plântulas com seis a dez folhas oriundas da germinação em solo/vermiculita descrita anteriormente foram regadas com 0,1x MS (Murashige & Skoog, 1962) e, após sete dias, foram submetidas a filtros de celofane enriquecidos em três diferentes faixas de luz: azul, vermelho e verde; este último enriquece a faixa do vermelho-extremo, uma vez que as plantas não absorvem luz verde. Um filtro transparente foi utilizado como controle. Os filtros foram estabelecidos de acordo com Lin & Yang (1999) e Héraut-Bron *et al.* (2001) e seus espectros de absorbância encontram-se ao fim deste trabalho (ver ANEXO). A R.F.A. incidente nas plântulas (pós-filtro) foi normalizada entre todos os tratamentos ( $\sim 33 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

Plântulas foram coletadas aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de exposição tanto para quantificação dos teores de GPV quanto para análises do conteúdo protéico e de carboidratos, detalhadas a seguir. As amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a  $-5^\circ\text{C}$  até a realização das quantificações, sendo que as plântulas coletadas para análise de GPV foram previamente liofilizadas e tiveram seu peso seco final medido.

### 3.2.1. Extração e análise de GPV

Para quantificação de GPV, amostras de partes aéreas de plântulas foram normalizadas para peso e volume de extração, ou seja, a razão massa de tecido para volume de metanol foi mantida em cerca de 0,5. As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e a extração foi feita em metanol absoluto (grau HPLC) por sonicação por 30 minutos e centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos; o sobrenadante foi recuperado para as análises.

As análises químicas dos extratos metanólicos de *P. leiocarpa* foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando o modelo *Waters Alliance 2690*, com sistema de fotodiodos em série (detector UV a 280nm). As análises foram desenvolvidas usando uma coluna de fase reversa C18 (*Hewlett-Packard ODS Hypersil*, 5  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 2,1 mm). A fase móvel constituiu-se de solvente A (MeOH-H<sub>2</sub>O, 40:60) e solvente B (MeOH, 100%), num gradiente de 5 minutos em 100% de A, 10 minutos em gradiente linear de 100% de A para 100% de B e 5 minutos em 100%B, com fluxo de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>.

Para a quantificação de GPV, 10 ou 20  $\mu\text{L}$  das amostras de cada extrato metanólico foram injetados e uma curva padrão externa foi gerada com padrão de GPV autêntico purificado e isolado de folhas. A identificação do alcalóide foi feita por meio de análise de tempo de retenção (TR), espectro UV e co-cromatografia com alcalóide padrão. Os teores de GPV nas amostras de parte aérea de plântulas de *P. leiocarpa* foram expressos em percentagem do peso seco extraído.

### 3.2.2. Extração e análise de proteínas e hexoses solúveis totais

Para extração e análise protéica utilizou-se o método de Bradford (1976), no qual o corante utilizado (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) reage e detecta resíduos de aminoácidos, especialmente os básicos. Para extração de proteínas solúveis totais, pulverizou-se cerca de 20 mg de massa fresca foliar em nitrogênio líquido e adicionou-se 1 mL de tampão Tris-HCl a 50 mM. As amostras foram vigorosamente agitadas por 1 minuto; incubadas em gelo por

10 minutos; novamente agitadas por 1 minuto e centrifugadas a 18.000 x g por 12 minutos a 4°C; o sobrenadante foi recuperado para as análises.

Para a quantificação de proteínas solúveis totais, 5 µL de amostra de cada extrato foi incubado por pelo menos 10 minutos com o reagente de Bradford e as leituras foram obtidas a 595 nm, usando o modelo *SpectraMax 250* da *Molecular Devices* (Laboratório do Prof. Jorge Guimarães, CenBiot-UFRGS). Uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina) foi gerada e os teores protéicos foram expressos em mg de proteína por mg de massa fresca extraída.

Para extração e análises de hexoses solúveis totais, utilizou-se o método de Dubois *et al.* (1956) com algumas adaptações propostas por Ghosh e Majumdar (2003), no qual soluções contendo açúcares quando incubadas com ácido sulfúrico, por hidrólise ácida, geram uma coloração laranja-amarelada graças à reação com fenol. Para extração de açúcares solúveis totais, incubou-se cerca de 10 mg de massa fresca foliar em 1 mL de etanol 80% P.A. por 15 minutos em banho de 75°C; o sobrenadante foi recuperado. Repetiu-se o processo, porém adicionando 500 µL de etanol 80%. A combinação dos sobrenadantes foi utilizada para a quantificação.

Para a quantificação de hexoses solúveis totais, aliquotou-se 500 µL de amostra de cada extrato, diluiu-se no mesmo volume de etanol 80% e incubou-se por 20 minutos com 1 mL de fenol 5% (p/v) e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Uma curva padrão de D-Glicose foi gerada e as leituras procedidas a 490 nm, usando o modelo *SpectraMax 250* da *Molecular Devices*. Os teores de hexoses totais foram expressos em mg de hexoses por de massa fresca extraída

### **3.3. Análises estatísticas**

Os dados foram analisados para homogeneidade de variâncias e por ANOVA, seguida por teste de Duncan, quando apropriado,  $p \leq 0,05$  ou 0,15 (Rohlf e Sokal, 1969). Foi utilizado o programa estatístico SPSS for Windows versão 12.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

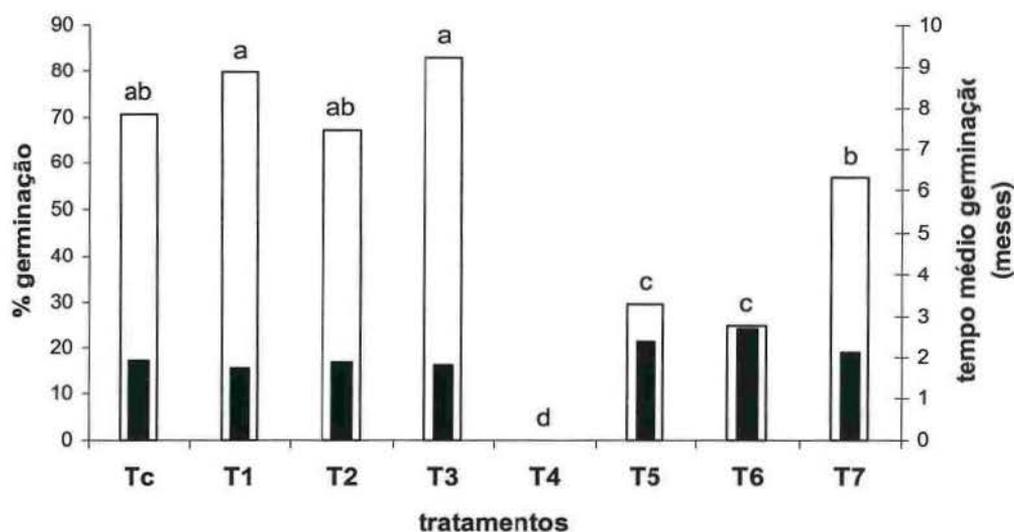
### 4.1. Germinação de *P. leiocarpa*

Verificou-se em experimento de germinação não asséptica que, três meses após a sementeira, a exposição das sementes de *P. leiocarpa* a alguns tratamentos geraram efeitos positivos na germinação. Via de regra, os tratamentos Tc, T1, T2 e T3, nos quais as sementes foram semeadas dentro de um curto intervalo de tempo após a coleta (e subsequente retirada das polpas) geraram resultados significativamente melhores na percentagem total de germinação (70,4; 79,5; 67 e 82,9 respectivamente) (Figura 6) - exceção ao tratamento T4, no qual as sementes passaram por 24 horas em estufa ( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ), que resultou na inibição completa da germinação. De fato, percebe-se que os tratamentos sob temperaturas baixas resultaram em percentagens mais altas de germinação.

Contudo, quando o período de exposição das sementes a baixas temperaturas foi prolongado de um para sete dias (tratamento T3 comparado aos T5 e T6 – 29,5 e 25, respectivamente), ocorreu uma significativa redução da percentagem total de germinação. Alternativamente, isto pode sugerir um efeito negativo das embebições dos tratamentos T5 e T6 quando aliadas à maiores períodos sob baixas temperaturas.

O tratamento T7 apresentou eficiência de germinação intermediária (56,7%), o que pode sugerir que os efeitos inibitórios dos tempos de exposição a baixas temperaturas utilizados nos tratamentos T5 e T6 podem ser recuperados com exposições mais longas (cerca de duas ou mais semanas). Apesar de a mesma população de plantas ter sido utilizada para coleta de frutos, a comparação só pode ser feita com cautela, pois o tratamento T7 foi conduzido com sementes de 2003. O efeito de exposição à  $\text{GA}_3$  durante a embebição foi pouco expressivo, possivelmente em função do pouco tempo de tratamento ou pela lenta absorção de solução circundante pelas sementes. Alternativamente, a presença endógena de GAs nas sementes pode não ser

limitante à mobilização de reservas e alongamento do embrião (Taiz e Zeiger, 2004).



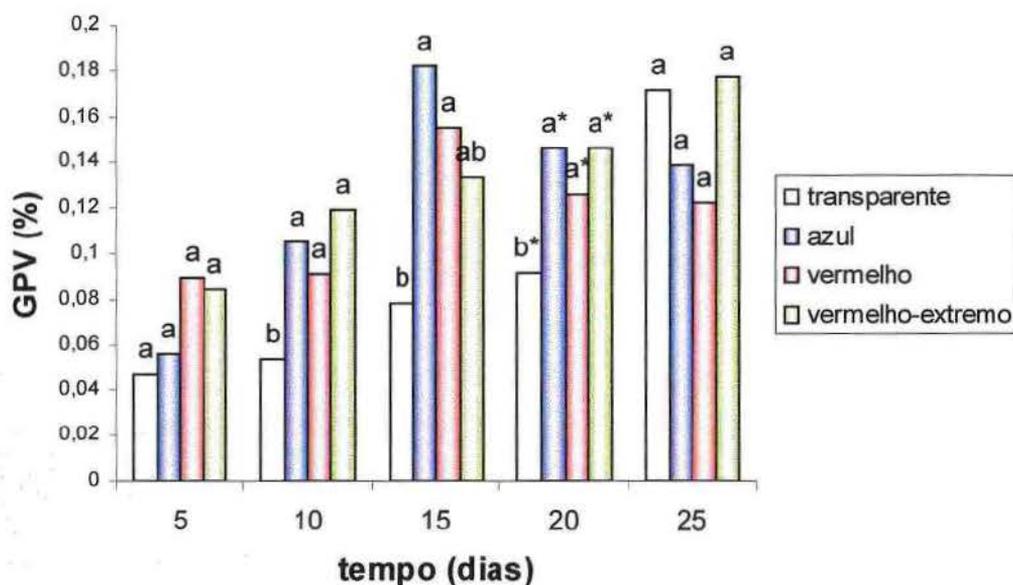
**Figura 6.** Experimento de germinação de sementes de *P. leiocarpa*, três meses após semeadura. Barras brancas referem-se à percentagem total de germinação; barras pretas ao tempo médio de germinação em meses. Tc = semeadura imediatamente após coleta; T1 = semeadura após coleta + 7 horas de embebição em água bidestilada e autoclavada; T2 = semeadura após coleta + 7 horas de embebição em solução de GA (5 mg/L); T3 = semeadura após um dia sob  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ; T4 = semeadura após um dia sob  $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ; T5 = semeadura após sete dias sob  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  + 7 horas de embebição em água bidestilada e autoclavada; T6 = semeadura após sete dias sob  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  + 7 horas de embebição em solução de GA (5 mg/L); T7 = semeadura após 17 dias sob  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  + 12 horas de embebição em água bidestilada e autoclavada. Foram utilizadas sementes de frutos coletados no ano de 2004, exceção para o tratamento T7 que utilizou material coletado em 2003. Barras compartilhando letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

O tratamento T7 apresentou eficiência de germinação intermediária (56,7%), o que pode sugerir que os efeitos inibitórios dos tempos de exposição a baixas temperaturas utilizados nos tratamentos T5 e T6 podem ser recuperados com exposições mais longas (cerca de duas ou mais semanas). Apesar de a mesma população de plantas ter sido utilizada para coleta de frutos, a comparação só pode ser feita com cautela, pois o tratamento T7 foi conduzido com sementes de 2003. O efeito de exposição à GA<sub>3</sub> durante a embebição foi pouco expressivo, possivelmente em função do pouco tempo de tratamento ou pela lenta absorção de solução circundante pelas sementes. Alternativamente, a presença endógena de GAs nas sementes pode não ser

limitante à mobilização de reservas e alongamento do embrião (Taiz e Zeiger, 2004).

Por fim, com exceção do tratamento T4, no qual nenhuma semente germinou, os tratamentos T5, T6 e T7 apresentaram germinação mais lenta (2,38; 2,68; 2,14 meses) que os demais (cerca de 1,8 meses). Isto reforça o fato de que os tratamentos Tc, T2 e principalmente os T1 e T3 perfazem os melhores protocolos de germinação não asséptica para esta espécie.

#### 4.2. Efeito da qualidade de luz no acúmulo de GPV



**Figura 7.** Efeito da qualidade de luz no acúmulo de GPV (% do peso seco) em plântulas de *P. leiocarpa*. Barras compartilhando letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,15$ ). Letras com asterisco indicam diferenças significativas para  $p \leq 0,05$ .

Em experimento realizado com filtros enriquecidos para diferentes faixas de luz, observa-se que há um incremento nos teores de GPV (% do peso seco) acumulados por plântulas de *P. leiocarpa* ao longo do tempo (Figura 7).

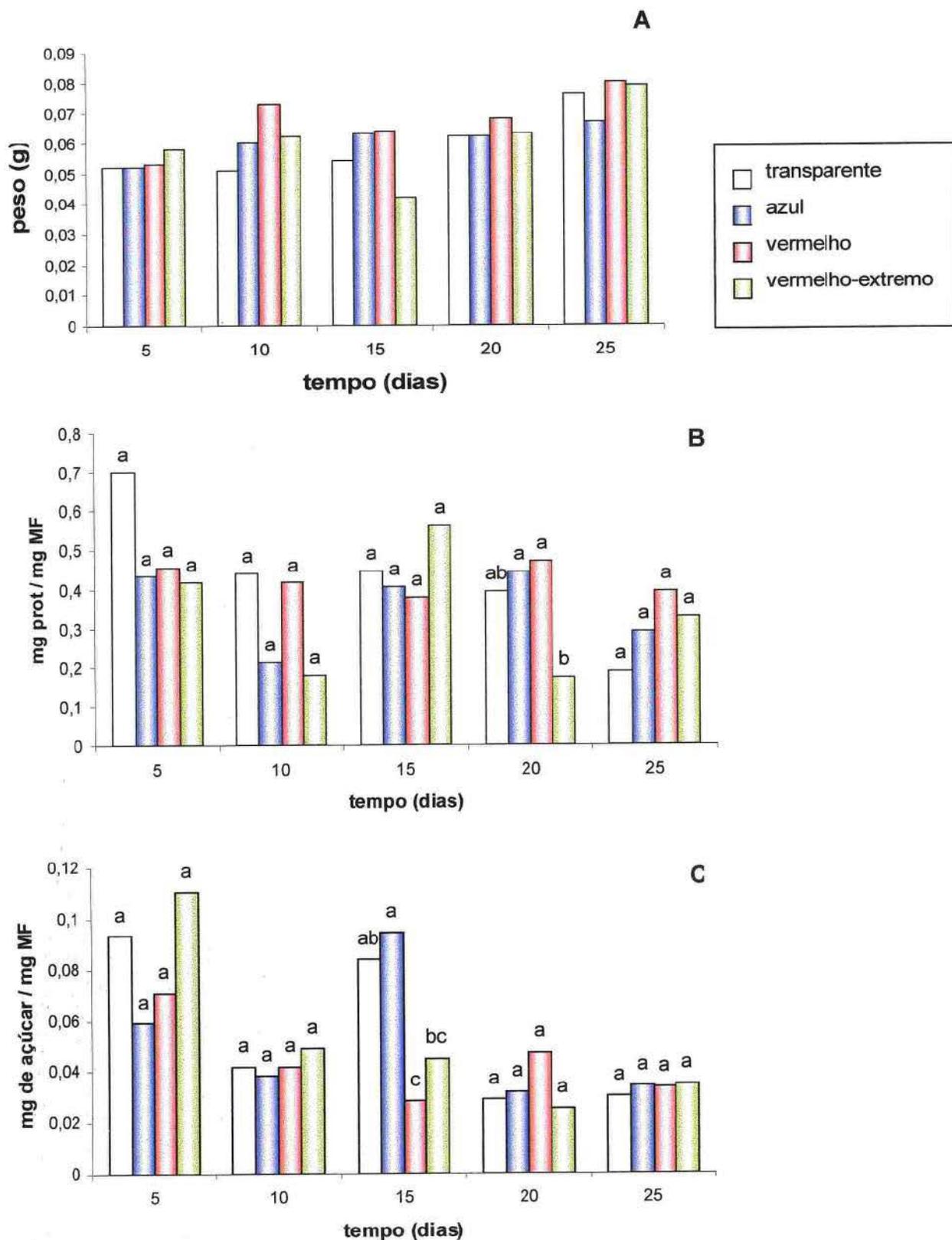
Independentemente da qualidade de luz, plântulas aos 15, 20 e 25 dias apresentaram conteúdos de GPV maiores que os de plântulas amostradas aos 5 e 10 dias. Isso concorda com dados da literatura para esta espécie que sugerem que o acúmulo de GPV é regulado pela ontogenia (Henriques et al., 2004).

Algumas evidências também suportam a relevância do fator ontogenético na produção e/ou acúmulo de metabólitos secundários. Exemplos são os estudos que correlacionam a funcionalidade de cloroplastos e números de estruturas diferenciadas (tricomas glandulares) a maiores níveis de compostos como sapogeninas esteroidais e monoterpenóides, respectivamente (Rchid e Baccou, *apud* Verpoorte e Maraschin, 2001; Yamaura *et al.*, 1989).

Estes dados dos teores de GPV ficam especialmente crescentes ao longo do tempo ao analisar-se as medições de peso seco (parâmetro de crescimento adotado), os conteúdos protéicos e de açúcares (hexoses totais) da Figura 8. Primeiramente, observa-se que os diferentes filtros não causaram diferenças significativas entre si no parâmetro peso seco (Figura 8A), sugerindo uma certa homogeneidade e estabilidade das plântulas ao longo do tempo neste quesito.

Além disto, ao analisar-se os gráficos, pode-se inferir que ao passo que os níveis de GPV acumulados são incrementados ao longo do tempo, os níveis de proteína e de açúcares decaem. Isso condiz com dados relatados na literatura, nos quais Yamaura *et al.* (1989) demonstraram que a irradiação com luz vermelha causou uma redução significativa dos teores de carboidratos nos cotilédones de plântulas de tomilho, com simultânea produção de vários terpenóides.

No presente estudo, não foram amostrados os cotilédones, porém mesmo assim os resultados suportam uma condição transiente das plântulas quanto à obtenção de autonomia fotoautotrófica. Ou seja, ao passo que as reservas protéicas e, principalmente, de açúcares (decaimento mais acentuado ao longo do tempo) vão se esgotando, o indivíduo passa a ativar seu metabolismo fotossintético. A maior acumulação de GPV pode estar relacionada a isto, pois há um maior suprimento de intermediários específicos, tais como as moléculas terpênicas. Ao menos em *Catharanthus roseus*, a secologanina, intermediário



**Figura 8.** Parâmetros avaliados em plantas de *P. leiocarpa* expostas a diferentes qualidades de luz. **A.** Medidas de peso seco. **B.** Conteúdos de proteínas solúveis totais foliares expressos em mg de proteína por mg de massa fresca extraída. **C.** Conteúdos de hexoses solúveis totais foliares expressos em mg de açúcar por mg de massa fresca extraída. Barras compartilhando letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,15$ ).

da biossíntese da maior parte dos alcalóides indólicos monoterpênicos, deriva da rota plastídica da DXS (D-1-deoxi-xilulose 5-fosfato sintase) (Memelink *et al.*, 2001), sendo necessária a presença e plena funcionalidade destas estruturas para a produção destes compostos (De Luca & Laflamme, 2001).

Paralelamente, observou-se o efeito indutor das diferentes faixas de luz no acúmulo de GPV quando comparadas ao filtro transparente (Figura 7). Esta tendência é clara nos dias 5 e 25, e gera diferenças relevantes nos demais tempos. Estes resultados sugerem uma atuação conjunta de diferentes sistemas fotorreceptores.

Em uma revisão recente de Parks (2003), é discutida a complexidade experimental quanto ao isolamento das respostas fotomorfogênicas. Em contraste com a sensibilidade da região do vermelho/vermelho-extremo que ocorre exclusivamente através dos fitocromos, as regiões próximas ao UV e azul são acessíveis a todos fotorreceptores conhecidos, inclusive aos fitocromos. Como resultado, um perigo iminente acompanha os delineamentos de ensaios fotobiológicos de sensibilidade à luz vermelha em plantas: eles não relevam a potencial interação entre as diversas famílias de fotorreceptores conhecidos. Na natureza, as plantas quase nunca vivenciam condições de luz ambiente unicamente deficientes em uma região específica do espectro. Isto significa que não existem estâncias práticas durante o crescimento e desenvolvimento de uma planta nas quais somente o fitocromo atue e controle as respostas. O isolamento fotobiológico experimental deve relevar que as funções dos fitocromos normalmente atuam orquestradas com outras classes de fotorreceptores, sendo que eventos de co-ativação são essenciais para respostas fotomorfogênicas.

Analisando-se os níveis protéicos dos tempos 10 e 20, observa-se que plantas tratadas com o filtro vermelho-extremo apresentaram os menores teores (Figura 8B). Contudo, nestes mesmos tempos amostrais, tal tratamento gerou conteúdos elevados de GPV (Figura 7), equiparáveis aos tratamentos azul e vermelho. Uma vez que a forma ativa do fitocromo é o Pfr, esperava-se que os níveis de GPV fossem menores nos tratamentos com vermelho-extremo. Contudo, sabendo-se da baixa irradiância à qual as plântulas estavam

submetidas, tal perfil de resposta poderia se enquadrar nas VLFRs (do inglês, *Very Low Fluence Responses*).

Algumas respostas dos fitocromos podem ser iniciadas por fluências muito baixas de luz e são saturadas. A pouquíssima quantidade de luz vermelha necessária para induzir VLFRs converte menos que 0,02% do fitocromo total à forma Pfr. Uma vez que o vermelho-extremo, que normalmente reverteria o efeito do vermelho, converte 97% do Pfr a Pr (pois ambos absorvem luz vermelha – Figura 5B), aproximadamente 3% do fitocromo permanece como Pfr – significativamente mais do que o necessário para induzir VLFRs. Assim, as respostas nesses níveis de irradiância não são fotorreversíveis (Mandoli e Briggs, 1984 *apud* Taiz e Zeiger, 2004).

## 5. CONCLUSÕES

Dentre os tratamentos estudados no presente trabalho, os que resultaram em maiores porcentagens totais de germinação e menores tempos médios de germinação foram os que não envolveram períodos muito prolongados de armazenamento. A semeadura imediatamente após a coleta ou após armazenamento por 24 horas em refrigerador ( $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ) resultaram em cerca de 80% de germinação em aproximadamente 1,8 meses. A embebição em presença de  $\text{GA}_3$  na concentração e tempos avaliados não apresentou efeitos relevantes na germinação subsequente.

O acúmulo de GPV mostrou ser regulado pelo desenvolvimento e por qualidade de luz. Os filtros utilizados aumentaram os teores de GPV de plântulas quando comparados ao controle transparente, sem no entanto alterar de forma expressiva parâmetros relacionados ao crescimento como peso seco das plântulas, conteúdo protéico ou de hexoses solúveis. As respostas obtidas podem refletir uma atuação em conjunto de diferentes sistemas fotorreceptores, uma vez que os espectros de absorção dos fitocromos e criptocromos apresentam certa sobreposição.

Constatou-se indução de acúmulo de GPV nas plântulas em resposta ao enriquecimento com vermelho-extremo. Tal perfil remete às respostas de fluência muito baixa (VLFRs), uma vez que a irradiância adotada no experimento foi de  $\sim 33 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

## 6. PERSPECTIVAS

Os próximos estudos realizados continuarão nesta mesma linha de pesquisa, porém deverão preencher lacunas deixadas pelo presente estudo. Serão realizados ensaios nos quais a irradiância será incrementada, visando elucidar mais detalhadamente as respostas envolvendo as formas de fitocromo. Estudos mais detalhados em sistemas de resposta rápida (p. ex. folhas isoladas), com diferentes níveis de irradiância enriquecida em vermelho ou vermelho-extremo aplicados de forma breve e sucessiva, poderão esclarecer sobre o tipo de resposta à luz que regula a produção de GPV mediada por fitocromo.

## REFERÊNCIAS

- Adjibadé, Y (1989) *Pharmacognosie du Psychotria forsteriana* A. Gray (*Rubiaceae*) – aspects botanique, chimique et essais pharmacologiques préliminaires (These de Doctorat) Université Louis Pasteur de Strasbourg I, Paris, França.
- Ahmad, M e Cashmore, AR (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue light photoreceptor. *Nat.*, 366:162-166.
- Ahmad, M; Jarillo, JA; Smirnova, O e Cashmore, AR (1998) Cryptochrome blue light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nat.*, 392: 720-723.
- Andel, E; Hasson, KC; Gai, E; Anfinrud, PA e Mathies, RA (1997) Femtosecond time-resolved spectroscopy of the primary photochemistry of phytochrome. *Biospec.*, 3:421-433.
- Aniszewski, T; Ciesiolka, D e Gulewicz K (2001) Equilibrium between basic nitrogen compounds in lupin seeds with differentiated alkaloid content. *Phytochem.*, 57: 43-50.
- Benoit-Vical, F; Valentin, A; Cournac V, *et al.* (1998) In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* SM (*Rubiaceae*). *J. Ethnopharm.*, 61: 173-178.
- Borthwick, HA; Hendricks, SB; Parker, MW; Toole, EH e Toole, VK (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38: 662-666.
- Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Briggs, WR e Christie, JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.*, 7: 204-210.

- Butler, WL; Norris, KH; Siegelman, HW e Hendricks, SB (1959) Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photosensitive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45: 1703-1708.
- De Luca, V; Brisson, N; Balsevich, J e Kurz, WGW (1989) Regulation of vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Molecular cloning of the first and last steps in biosynthesis. In: Kurz, WGW, *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II*. Springer, Berlin 154-161.
- De Luca, V e St-Pierre, B (2000) The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci.*, 5: 168-173.
- De Luca, V e Laflamme, P (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *C. Op. Plant Biol.*, 4: 225-233.
- Dillenburg CR e Porto ML (1985) *Tribo Psychotriaceae*. Boletim Instituto de Biociências da UFRGS. 76p.
- Dubois, M; Gilles, KA; Hamilton, JK; Rebers, PA e Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28(3): 350-356.
- Elisabetsky, E; Amador, TA; Leal, MB *et al.* (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.
- Facchini, PJ (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 29-66.
- Fett-Neto, AG; Pennington, JJ e DiCosmo, F (1995) Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures de *Taxus cuspidate* Sieb and Zucc. *J. Plant Physiol.*, 146: 584-590.
- Flint, LH (1936) The action of radiation of specific wave-lengths in relation to the germination of light-sensitive lettuce seed. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.*, 8:1-1.

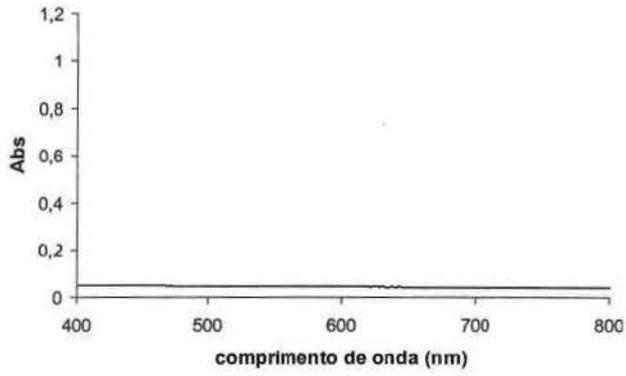
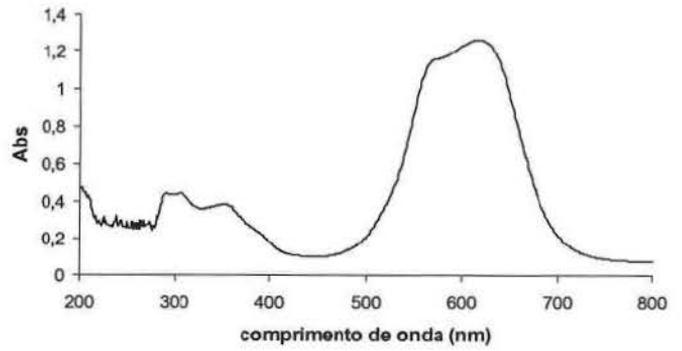
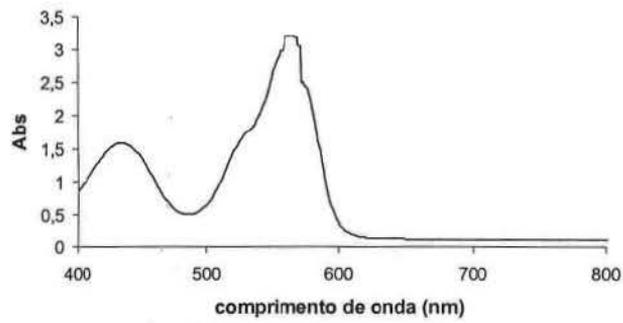
- Garcia, ES; Silva, ACP; Gilbert, B, et al. (1996) *Fitoterápicos*. Campinas: André Tosello. 17p.
- Gershenzon, J (1994) Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *J. Chem. Ecol.*, 20: 1281-1328.
- Ghosh, S (2003) Temporal variation in sugar exudation rate of hydroponically grown Pusa Basmati 1 at seedling stage. *Crop Manag. & Physiol.*, 28:46-47.
- Goddjin, OJM; Lohman, FP; de Kam, RJ et al. (1994) Nucleotide sequence of the tryptophan decarboxylase gene of *Catharanthus roseus* and expression of Tdc-GusA gene fusions in *Nicotiana tabacum*. *Mol. Gen. Genet.*, 242: 217-225.
- Guerra, MP e Nordari, RO (2001) Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, CM; Schenkel, EP; Gosmann, G et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 13-26.
- Hallard, DAC (2000) *Transgenic plant cells for the production of indole alkaloids*. Verkrijging van der Graad van Doctor. Proefschrift Universiteit Leiden. Orléans, Frankrijk. 130p.
- Henriques AT; Kerber, VA; Moreno, PRH (2001) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, CM; Schenkel, EP; Gosmann, G; Mello, JCP; Mentz, LA e Petrovick, PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 651-666p.
- Henriques, AT; Lopes, SO; Paranhos, JT et al. (2004) N,  $\beta$ -D-glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from *Psychotria leiocarpa*. *Phytochem.*, 65: 449-454.
- Héraut-Bron, V; Robin, C; Varlet-Grancher, C e Guckert, A (2001) Phytochrome mediated effects on leaves of White Clover: consequences for light interception by the plant under competition for light. *Annals of Bot.*, 88(Special Issue): 737-743.

- Hoehne, FC (1978). *Plantas e substâncias tóxicas e medicinais*. São Paulo: Novos Horizontes. Reimpressão de 1939.
- Hughes, EH e Shanks, JV (2002) Metabolic engineering of plants for alkaloid production. *Metab. Eng.*, 4: 41-48.
- Jansen, MAK; Gaba, V e Greenberg, BM (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Sci.*, 3: 131-135.
- Kendrick RE, Kronenberg, GHM (1994) *Photomorphogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kutchan, TM (1995) Alkaloid Biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 7: 1059-1070.
- Lajis, NH; Mahmud, Z e Toia, RF (1993) The alkaloids of *Psychotria rostrata*. *Planta Med.*, 59: 383-384.
- Lin, BL e Yang, WJ (1999) Blue light and abscisic acid independently induce heterophyllous switch in *Marsilea quadrifolia*. *Plant Physiol.* 119: 429-434.
- Lin, C e Shalitin (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 469-496.
- Liscum, E; Hodgson, DW e Campbell, TJ (2003) Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiol.*, 133: 1429-1436.
- Leal, MB (1994) *Estudo psicofarmacológico de espécies de Psychotria (Rubiaceae) do Estado do Rio Grande do Sul*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Lopes, SO (1998) *Análise química e cultivo in vitro de Psychotria leiocarpa Cham. et Schlecht. E Psychotria carthagenensis Jacq. (Rubiaceae)*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Mc Knight, TD; Roessner, CA; Devagupta, R et al. (1990) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucleic. Acids Res.*, 18: 39-49.
- Memelink, J, Verpoorte, R e Kijne, JW (2001). ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.*, 6:212-219.
- Mizukami, H; Nordlov, H; Lee, SL et al. (1979) Purification and properties of strictosidine synthase (an enzyme condensing tryptamine and secologanin) from *Catharanthus roseus* culture cells. *Biochem.*, 18: 3760-3763.
- Nepokroeff, M; Bremer, B e Sytsma, KJ (1999) Reorganization of the genus *Psychotria* and tribe Psychotrieae (Rubiaceae) inferred from ITS and *rbcl* sequence data. *Systematic Botany*, 24:5-27.
- Murashige T e Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Parks, BM (2003) The red side of photomorphogenesis. *Plant Physiol.*, 133:1437-1444.
- Pasquali, G; Goddijn, OJM, DeWaal, A et al. (1992) Coordinate regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Mol. Biol.*, 18: 1121-1131.
- Perry, LM (1980) Rubiaceae. In: Medicinal plants of east and southeast Asia, MIT Press. 347-360p.
- Quail, PH (2002) Phytochrome photosensory signaling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 85-93.
- Robbers, JE; Speedie, MK e Tyler, VE (1996) *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Willians & Wilkins, Philadelphia.
- Roberts, MF e Strack, D (1999) Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. In: WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annu. Plant Rev.*, 1:17-78.

- Rohlf, FJ e Sokal, RR (1969) *Statistical Tables*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Sancar, A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.*, 103: 2203-2237.
- Schripsema, J; Dagnino, D e Gosmann, G (2001) Alcalóides indólicos. In: Simões, CM; Schenkel, EP; Gosmann, G et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 689-716p.
- Seibert, M e Kadkade, G (1980) *Environmental factors: A. light*. In: Staba, EJ. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Raton.
- Smith, LB e Downs, RJ (1956) *Resumo preliminar das Rubiáceas de Santa Catarina*. *Sellowia*, 7: 13-86.
- Taiz, L e Zeiger, E (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3ª Edição. Artmed. 719p.
- Tanaka, S; Yamaura, T; Shigemoto, R e Tabata, M (1989) Phytochrome-mediated production of monoterpenes in Thyme seedlings. *Phytochem.*, 28(11): 2955-2957.
- Van der Fits, L e Memelink, J (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Sci.*, 289: 295-297.
- Verpoorte, R e Maraschin, M (2001) Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: Yunes, RA e Calixto, JB, *Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Agros. 500p.
- Wink, M (1988) Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Gen.*, 75:225-233.
- Wittstock, U e Gershenzon, J (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *C. Op. Plant Biol.*, 5: 1-8.
- Yamaura, T; Tanaka, S e Tabata, M (1989) Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in Thyme seedlings. *Phytochem.*, 28(3): 741-744.

- Yamaura, T; Tanaka, S e Tabata, M (1991) Participation of phytochrome in the photoregulation of terpenoid synthesis in Thyme seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 32(5): 603-607
- Yoshimatsu, K e Shimomura, K (1991) Emetic alkaloid formation in root culture of *Cephaelis ipecacuanha*. *Phytochem.*, 30: 505-507.
- Zárate, R; Dirks, C; Van der Heijden, R e Verpoorte, R (2001) Terpenoid indole alkaloid profile changes in *Catharanthus pusillus* during development. *Plant Sci.*, 160: 971-977.

**ANEXO: Espectros de absorvância dos filtros utilizados****Transparente****Azul****Vermelho****Vermelho-extremo**