



Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ALCALÓIDES DE *Psychotria*: FOTORREGULAÇÃO E PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES E ANTIMUTAGÊNICAS**

Variluska Fragoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof^o Arthur Germano Fett-Neto

Co-Orientadora: Prof^a Jenifer Saffi

Porto Alegre

2007

Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biociências e Centro de Biotecnologia e do Laboratório 210 do Departamento de Biofísica, ambos desta Universidade. Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

- Eu estive lendo a respeito do começo do universo... Eles chamam isso de “a grande explosão”... Não é estranho como os cientistas podem imaginar toda a matéria do universo explodindo de um ponto menor que a cabeça de um alfinete, mas eles não conseguem chegar a um nome mais evocativo para isso que “a grande explosão”. Esse é todo o problema com a Ciência. Você tem um monte de empíricos tentando descrever coisas de maravilhas não imagináveis.
- E como **VOCÊ** chamaria a criação do universo?
- **“O HORRENDO KABLÓIDE ESPACIAL”!!!!!!**
- Hmm... assim é melhor.

Calvin e Haroldo, Bill Watterson

AGRADECIMENTOS

À minha família amada, um pouco polaca, um pouco dos pampas. À minha mãe querida, misturinha boa de Marie Curie, obstinada, com Dn. Ofélia (... faz um bolo de milho e um profiteroles como ninguém!!). Ao meu papito que, aos 61 anos de idade, continua trabalhando no dias úteis (disputa ferrenha pelo computador!) e esquiando nos inúteis. Ao meu mano Léo e à Mare (minha quase-mãe), e também ao meu sobrinho(a) que está por vir. Estamos ansiosos por este novo coraçõzinho e eu, engajada no pleito “Dinda 2007!” (este parágrafo vai contar pontos!). E à minha mana e ao Sandro pelo jeitinho “easy-going” tranqüilo de encarar a vida, que torna tudo mais alegre. Todos vocês me inspiram muito e torço para que eu consiga seguir seus passos.

Ao Arthur, que, mais que orientador, tem sido um pai acadêmico. Com sua personalidade forte consegue encher de coração a Fisiologia Vegetal que nos ensina com tanta excelência. Seus conselhos e orientações sempre nos impulsionam para novas conquistas. Nunca deixou de me incentivar e por isso me sinto capaz o suficiente para alçar novos vôos. MUITÍSSIMO obrigado por tudo!!!!

Ao Gustavo por cada segundo desses últimos 5 anos. Tudo pelo que passamos e estamos por passar se deve única e exclusivamente ao fato de estarmos juntos, um do lado do outro, não interessa onde nem como (ainda mais se tiver um chops!). JJP+1.

Às minhas camelas monossilábicas do coração Ná e Pá que amo de paixão. Presente do céu que ganhei durante o mestrado e que quero ter perto pro resto da vida!!! Aos 70 anos, tomando chá de hortelã com cuca na varanda e né? Okeei.

À Karo amiga querida pela diversão entre uma ANOVA e outra. Bem da verdade, o Charles é que devia me agradecer por ter sugerido comemorar aquele niver da Kelly na Caverna, tá fazendo fortuna com essa menina!!!!

A todos os amigos do Lab. de Fisiologia Vegetal, especialmente à velha guarda, Diogo, Kelly e Joseli, e também à Márcia, Juli, Felipe, Guilherme, Raul, Dani, Tati, Denílson, Denise... ufa, é grande esse povo!

À Prof^a Janette P. Fett e ao Prof^o Giancarlo Pasquali, cuja ajuda foi além de uma mera C.A., principalmente nesse último ano. Obrigado por todo apoio e incentivo!

À Prof^a Jenifer por nos ter recebido com tanto carinho e pelas valiosas orientações no mundo de *Saccharomyces*.

À Dinara e à Ana Cata que tornaram o barulho do vórtex beeeem mais agradável!

À Juçara que tanto me ajudou nos primeiros passos de IC. Sim, aprendemos muito juntas e sinto saudades!

Ao Prof^o Luís Baptista pelas coletas de *P. umbellata* e saídas de campo em alto estilo de Land-Rover e ao prof^o Zé Cláudio pela disponibilidade e pronta ajuda na consultoria de agentes antioxidantes.

Ao Lab. de Farmacognosia da Fac. de Farmácia, especialmente à Carol, Marina, Miriam e Maria, pela ajuda nas infindáveis cromatografias durante a purificação de GPV. À Prof^a Amélia T. Henriques pelo empréstimo do HPLC.

Ao Prof^o Jorge Guimarães pelo empréstimo do *SpectraMax*, e também ao Antônio, por sua disponibilidade e ajuda.

Aos queridos funcionários Sílvia e Luciano do PPGBCM pela constante e eficiente ajuda.

Às minhas amigas Ziza e Jô, por tudo que passamos desde os tempos de graduação. Sempre que olho pruma super figueira, linda, simples e forte, lembro da nossa amizade! O Taim certamente ficará pra sempre em nossa lembrança!!! Amo vocês!!!

E finalmente, porém não menos importante, aos meus amigos do coração Sandra, Careca, Tiago, Angelina e Telmo, Jule, Diogo, Josi, Cabelinho, Guizo, Barz, Raquel, Mare, Ale, Cris, Rafa, Fenris e Luna, Pati e Marcelo, Cacá (prima amada)...!! Adoro todos vocês!!!!

Muito Obrigado!!!!!!!!!!!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	
Alcalóides.....	01
Alcalóides monoterpênicos indólicos (MIAs).....	04
Gênero <i>Psychotria</i>	06
<i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schlecht.....	08
<i>Psychotria umbellata</i> Vell.....	10
Efeitos da luz e da ontogênese sobre o metabolismo secundário.....	15
Espécies reativas de oxigênio – ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>).....	24
Tipos de ROS.....	25
Algumas enzimas envolvidas na detoxificação de ROS.....	27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	29
Referências.....	33
OBJETIVOS	45
CAPÍTULO 1 – Fotoregulação do alcalóide N, β-D-Glicopiranosilvincosamida em <i>Psychotria leiocarpa</i> Cham. & Schlecht.	
Introdução.....	47
Materiais e Métodos.....	49
Resultados e Discussão.....	54
Conclusões.....	68
Referências.....	70
CAPÍTULO 2 – Antioxidant and antimutagenic properties of the crude foliar extract and of the alkaloid psychollatine of <i>Psychotria umbellata</i> Vell. in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Abstract.....	76
Introduction.....	77

Materials and Methods.....	78
Results.....	82
Discussion.....	84
References.....	87
CONCLUSÕES.....	100
ANEXOS.....	102

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Biossíntese dos alcalóides indólicos em *Catharanthus roseus* (Pasquali *et al.*, 2006). AS - antranilato sintase; DXPS - D-1-desoxixilulose 5-fosfato sintase; G10H - geraniol 10-hidroxilase; CPR - citocromo P450 redutase; TDC - triptofano descarboxilase; STR - strictosidina sintase; SGD - strictosidina β -glicosilase; D4H - desacetoxivindolina 4-hidroxilase; DAT - acetil-CoA 4-O-desacetilvindolina 4-O-acetiltransferase..... 05
- Figura 2.** Detalhe de ramos apicais e infrutescências de *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht. no Morro Santana em Porto Alegre, RS..... 09
- Figura 3.** Estrutura de N, β -D-glicopiranosilvincosamida (GPV). Glc = glicose (Lopes, 1998)..... 10
- Figura 4.** *Psychotria umbellata* Vell. em resquício de Mata Atlântica no Município de Dom Pedro de Alcântara, RS..... 11
- Figura 5.** Estrutura química da psicolatina, anteriormente conhecida por umbelatina. Glc = glicose (Kerber, 1999) 12
- Figura 6. A.** Estrutura das formas Pr (fitocromo vermelho) e Pfr (fitocromo vermelho-extremo) 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 vermelha-extrema. **B.** Espectros de absorção de fitocromos purificados, nas formas Pr e Pfr. (Taiz e Zeiger, 2004) 19
- Figura 7.** Representação da formação do radical OH \cdot pelas reações Haber-Weiss/Fenton. (Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2000)..... 27

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Acúmulo de GPV em % do peso seco de plântulas *in vitro* em meio 0,1 x MS (Murashige e Skoog, 1962) desprovido de sacarose, cultivadas no escuro contínuo e transferidas para a luz (Escuro-Luz) e cultivadas na luz e transferidas para o escuro (Luz-Escuro). Barras de mesmo grupo compartilhando letras iguais, não diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$)..... 54
- Figura 2.** Acúmulo de GPV em % do peso seco de plântulas *in vitro* em meio 0,1 x MS (Murashige e Skoog, 1962), com ou sem sacarose (1,5%) cultivadas no escuro contínuo e transferidas para a luz (Esc-Luz) e cultivadas na luz e transferidas para o escuro (Luz-Esc), 14 dias após transferências. Barras de mesmo grupo compartilhando letras iguais, não diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).. 57
- Figura 3.** Efeito de filtros enriquecidos para diferentes qualidade de luz em plântulas de *P. leiocarpa*. R.F.A. de $\sim 30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. **A.** Teores de GPV (% do peso seco). Barras compartilhando letras iguais (comparações válidas dentro de cada tempo) não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p \leq 0,15$ (letras com asterisco indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$). **B.** e **C.** Teores de hexoses e de proteínas solúveis totais foliares, respectivamente (PF = peso fresco). Barras compartilhando letras iguais (comparações válidas dentro de cada tempo) não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan $p \leq 0,15$ 59
- Figura 4.** Efeito de filtros enriquecidos para diferentes qualidade de luz em plântulas de *P. leiocarpa*. R.F.A. de $\sim 90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras pretas = controle pós-estiolamento. **A.** Teores de GPV (% do peso seco). Barras compartilhando letras iguais não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$ (letras minúsculas referem-se a comparações dentro de cada tempo de coleta e maiúsculas, entre controles dos diferentes tempos de coleta). **B.** e **C.** Teores de hexoses e de proteínas solúveis totais foliares,

respectivamente (PS = peso seco). Barras compartilhando letras iguais (comparações válidas dentro de cada tempo) não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan $p \leq 0,05$ 60

CAPÍTULO 2

Figura 1. Chemical structure of the monoterpene indole alkaloid psychollatine.

Glc – glucose residue..... 96

Figura 2. Central Disc Assay. Growth inhibition (mm) of different *Saccharomyces cerevisiae* strains exposed to paraquat and hydrogen peroxide, previously treated for 4 hours at 30 °C with different psychollatine concentrations. Bars (means \pm S.D.) with significant differences in comparison with oxidative agent control are indicated by asterisks (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$)..... 97

Figura 3. Central Disc Assay. Growth inhibition (mm) of different *Saccharomyces cerevisiae* strains exposed to paraquat and hydrogen peroxide, previously treated for 4 hours at 30 °C with different concentrations of *P. umbellata* crude foliar extract. Bars (means \pm S.D.) with significant differences in comparison with oxidative agent control are indicated by asterisks (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$)..... 98

Figura 4. Inhibition of the generation of reactive oxygen species by negative control, hexane solvent (●), crude foliar extract from *P. umbellata* (■) and psychollatine (▲) in hypoxanthine/xanthine oxidase system. Data points are means \pm S.D..... 99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Strains of *Saccharomyces cerevisiae* used in this study..... 93
- Tabela 2.** Induction of mutation in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with psychollatine or crude foliar extract from *Psychotria umbellata* in the stationary phase in PBS..... 94
- Tabela 3.** Effects of psychollatine and crude foliar extract from *Psychotria umbellata* on induced mutagenicity by hydrogen peroxide (H₂O₂) in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase in PBS..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT _{2A/C}	5-hidroxitriptamina subtipo 2A/C
AS	antranilato sintase
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
CAT ou CTT	catalase
CAN	canavanina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CPR	citocromo P450 redutase
CRY	criptocromo
D4H	desacetoxivindolina 4-hidroxilase
DA	dopamina
DAT	acetil CoA 4-O-desacetilvindolina 4-O-acetiltransferase
DHBA	ácido dihidroxibenzóico
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DW ou PS	peso seco
DXS	D-1-desoxi-xilulose 5-fosfato sintase
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FMN	flavina mononucleotídeo
G10H	geraniol 10-hidroxilase
GPV	<i>N</i> , β,D-glicopiranosilvincosamida
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
JA	ácido jasmônico
LFRs	respostas de fluência baixa
MeOH	metanol
MIAs	alcalóides monoterpeneo indólico
MM	meio mínimo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
MS	sais Murashige e Skoog
PBS	tampão salina-fosfato
PHOT	fototropina
PhyA e PhyB	fitocromo A e B
PF	peso fresco
Pfr	fitocromo vermelho-extremo
Pr	fitocromo vermelho
RFA	radiação fotossinteticamente ativa
ROS	espécies reativas de oxigênio
SC	meio completo sintético
SE	erro padrão
SGD	estrictosidina β -glicosidase
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
STR	estrictosidina sintase
TDC	triptofano descarboxilase
TR	tempo de retenção
UV	radiação ultravioleta
VLFRs	respostas de fluência muito baixa
WT	linhagem selvagem
YPD	meio completo para leveduras

RESUMO

Espécies de *Psychotria* encontradas no sul do Brasil produzem alcalóides do tipo monoterpene indólicos, alguns deles com interessantes atividades biológicas e oriundos de novas rotas biossintéticas. *P. leiocarpa* Cham. & Schlecht. acumula *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (GPV), o primeiro alcalóide *N*-glicosilado desta classe a ser descrito. O extrato contendo GPV apresenta atividade analgésica inespecífica e, na planta, sua biossíntese é regulada pelo desenvolvimento e por luz. *P. umbellata* Vell., por sua vez, produz psicolatina, que apresenta alto potencial farmacológico, pois apresenta atividade analgésica do tipo opióide, ansiolítica e antipsicótica, interagindo com receptores de diversos sistemas de neurotransmissores no sistema nervoso central. Além disso, psicolatina é um eficiente agente redutor de peróxidos e *quencher* de oxigênio *singlet in vitro*. Os objetivos do presente trabalho foram estudar a fotorregulação de GPV em plântulas de *P. leiocarpa*, assim como avaliar os efeitos antioxidantes e antimutagênicos *in vivo* do extrato foliar bruto de *P. umbellata* e de psicolatina purificada, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essas duas últimas substâncias também foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante contra o radical hidroxila *in vitro*.

Em ensaios de transição luz-escuro realizados com plântulas assépticas de *P. leiocarpa*, o acúmulo de GPV mostrou ser responsivo a alterações na condição luminosa de cultivo. O papel negativo do escuro contínuo na biossíntese de GPV foi comprovado pela redução dos níveis deste alcalóide em plântulas cultivadas na luz e transferidas para o escuro. Por outro lado, quando plântulas cultivadas no escuro foram expostas à luz, os níveis de GPV

aumentaram, indicando o caráter promotor da luz na produção de GPV. Os efeitos das transições foram mais evidentes em plântulas cultivadas em meio sem sacarose do que em plântulas cultivadas com suprimento exógeno de carboidratos.

A biossíntese de GPV é regulada por diferentes faixas de luz. As regiões do azul e do vermelho-extremo aumentaram os teores de GPV. A luz vermelha não afetou de forma significativa o teor de GPV. Os resultados revelam um padrão típico de VLFRs (*Very Low Fluence Responses*), possivelmente envolvendo ação de PhyA em conjunto com criptocromo.

Tanto o extrato bruto foliar de *P. umbellata* quanto psicolatina apresentaram efeito antioxidante *in vivo*, reduzindo a inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* sob estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio e paraquat. O extrato e o alcalóide purificado também apresentaram ótima atividade antioxidante *in vitro*, protegendo contra o ataque do radical hidroxila. Os índices de mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio foram significativamente reduzidos quando as células de *S. cerevisiae* foram co-cultivadas na presença tanto do extrato quanto de psicolatina.

Palavras-chave: *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht.; *Psychotria umbellata* Vell.; alcalóide monoterpeneo indólico; N, β -D-Glicopiranosilvincosamida; psicolatina; fotorregulação; VLFR; *Saccharomyces cerevisiae*; atividade antioxidante; atividade antimutagênica.

ABSTRACT

Species of *Psychotria* founded in southern Brazil produce a set of novel monoterpene indole alkaloids (MIAs), several of which have interesting biological activities and originate from new metabolic pathways. *P. leiocarpa* Cham. & Schlecht. accumulates *N*, β -D-glucopyranosylvincosamide (GPV), the first *N*-glycosylated MIA described. Leaf extracts containing GPV display non-specific analgesic activity and, *in planta*, its biosynthesis is regulated by development and light. *P. umbellata* Vell., in turn, produces psychollatine which has significant pharmacological potential, since it yields opioid-like analgesic, anxiolytic and antipsychotic activities, interacting with receptors of different neurotransmitter systems in the central nervous system. In addition, psychollatine is an efficient peroxide reducing agent and a singlet oxygen chemical quencher *in vitro*. This work aimed at studying the photoregulation of GPV in *P. leiocarpa* seedlings, as well as at investigating the antimutagenic and antioxidant *in vivo* effects of the crude foliar extract of *P. umbellata* and purified psychollatine using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. These last substances were also evaluated for their *in vitro* antioxidant properties against hydroxyl radicals.

In light-dark transition assays with aseptic *P. leiocarpa* seedlings, GPV accumulation showed to be responsive to changes in light condition. The negative role of continuous dark on GPV biosynthesis was shown by reduction of the alkaloid contents when light growing seedlings were transferred to dark. On the other hand, dark growing seedlings increased GPV contents after light exposure, suggesting a positive light regulation of GPV production. These

results were more evident in seedlings cultivated in media without sucrose than in seedlings cultivated with carbohydrate supplementation.

GPV biosynthesis is also regulated by different light qualities. Light in the blue and far-red regions increased GPV accumulation, whereas red light had no significant influence on GPV yield. These results are in agreement with the profile of VLFRs (Very Low Fluence Responses), mediated by PhyA with co-action of cryptochrome.

Both the crude foliar extract of *P. umbellata* and psychollatine showed *in vivo* antioxidant effects by reducing the growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* under hydrogen peroxide- and paraquat-induced oxidative stress. The extract and the purified alkaloid also showed strong *in vitro* antioxidant activity against hydroxyl radicals. The levels of hydrogen peroxide-induced mutagenicity were significantly reduced when *S. cerevisiae* cells were co-cultivated with leaf crude extract or psychollatine.

Key-words: *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht.; *Psychotria umbellata* Vell.; monoterpene indole alkaloids; *N*, β -D-Glucopyranosylvincosamide; psychollatine; photoregulation; VLFR; *Saccharomyces cerevisiae*; antioxidant activity; antimutagenic activity.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

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. Muitos alcalóides têm 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) (Kutchan, 1995).

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 drogas 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 tenha sido 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 e 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).

Muitos trabalhos relatam o envolvimento dos alcalóides em mecanismos de defesa vegetal, podendo atuar em resposta a herbivoria e ataques patogênicos (Wittstock e Gershenzon, 2002). Contudo, a biossíntese e acúmulo destes compostos representam um custo relativamente alto para as plantas, não só pelos recursos consumidos durante sua produção, mas como também por seus requerimentos para sua acumulação, visto sua toxicidade (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).

Alcalóides indólicos monoterpênicos (MIAs)

Os alcalóides indólicos monoterpênicos (MIAs) 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 tropicais, Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae, todas pertencentes à Ordem Gentianales (Roberts e Strack, 1999).

Os MIAs são, na maioria, derivados da triptamina e do monoterpeneo (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 (TDC), formando triptamina. O secoiridóide secologanina e a triptamina são condensados pela enzima strictosidina sintase (STR), formando strictosidina, um alcalóide glicosilado (Figura 1). Após sua conversão através da strictosidina β -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 monoterpeneo 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).

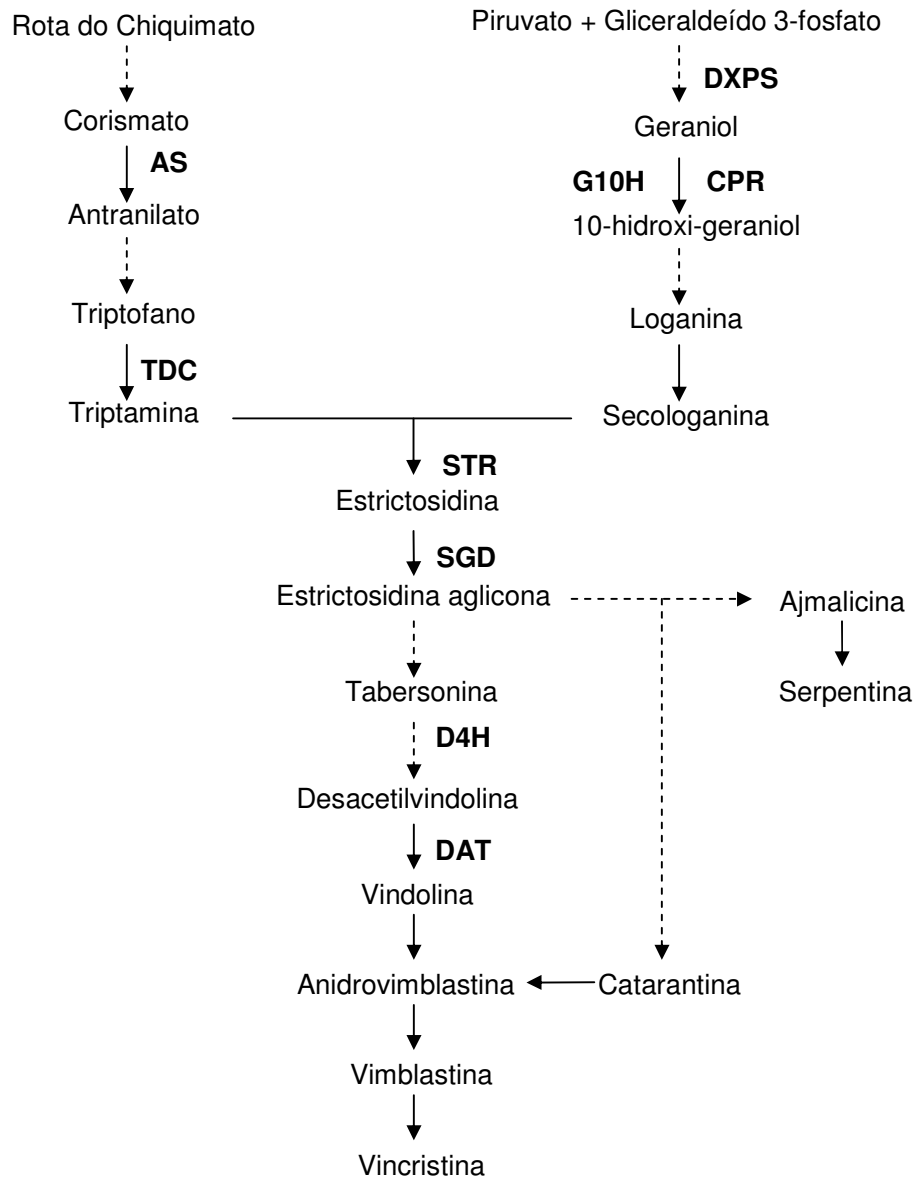


Figura 1. Biossíntese dos alcalóides indólicos em *Catharanthus roseus* (Pasquali *et al.*, 2006). AS - antranilato sintase; DXPS - D-1-desoxi-xilulose 5-fosfato sintase; G10H - geraniol 10-hidroxilase; CPR - citocromo P450 redutase; TDC - triptofano descarboxilase; STR - estrictosidina sintase; SGD - estrictosidina β -glicosilase; D4H - desacetoxivindolina 4-hidroxilase; DAT - acetil-CoA 4-O-desacetilvindolina 4-O- acetiltransferase.

A partir da síntese de estrictosidina, 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 vimblastina, 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 citosólica de TDC teve seu gene 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).

A biossíntese dos alcalóides nas plantas é frequentemente controlada durante o desenvolvimento (De Luca e 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).

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 e 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 e 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 (cujo binômio válido atualmente é *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, por via de regra, no envolvimento, ao menos nas etapas iniciais da biossíntese, das enzimas triptofano descarboxilase (TDC) e estrictosidina sintase (STR) (Kutchan, 1995; Roberts e Strack, 1999). *P. colorata* produz um alcalóide denominado quimonantina, que apresentou atividade analgésica do tipo opióide (Elisabetsky *et al.*, 1997). O termo opióide designa substâncias que produzem efeitos semelhantes aos da morfina e que são bloqueadas por antagonistas do tipo naloxona e inclui várias classes de substâncias que podem ter estrutura molecular bem distinta da morfina (Both, 2001).

***Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht.**

P. leiocarpa (Figura 2) é nativa da Argentina, Paraguai e Brasil (Smith e 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 e Porto, 1985).

Esta espécie cresce como arbusto de até 2 m de altura. As folhas possuem lâmina elíptica de base cuneada e ápice acuminado, com 4 a 11 cm de comprimento e 1,5 a 3 cm de largura (Figura 2). 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. O fruto é drupáceo e tem coloração azul-violácea quando maduro, com cálice persistente (Figura 2). 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 e Porto, 1985).



Figura 2. Detalhe de ramos apicais e infrutescências de *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht. no Morro Santana em Porto Alegre, RS.

P. leiocarpa é conhecida popularmente como erva-de-rato e contém o 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*, β -D-glicopiranosilvincosamida (Figura 3) foi identificado como o componente majoritário do extrato etanólico de folhas de *P. leiocarpa* (Lopes, 1998) e apresentou estrutura inédita.

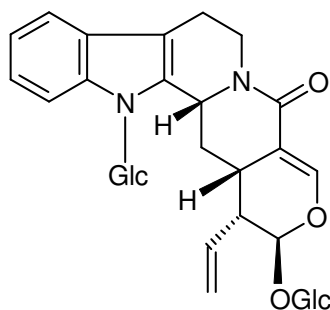


Figura 3. Estrutura de *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida (GPV). Glc = glicose (Lopes, 1998).

***Psychotria umbellata* Vell.**

Os relatos da literatura demonstram que esta espécie é de difícil circunscrição. Em 1825, ela foi denominada *Psychotria umbellata* Vell., porém em 1876 ela passou a ser *Rudgea umbellata* (Vell.) Müll. Arg.. Em 1891 ela aparece como *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e mais tarde ela passa a ser chamada *Palicourea brachypoda* (Müll. Arg.) Smith & Downs (Smith e Downs, 1956). Finalmente estas nomenclaturas passaram a ser sinônimos e o nome *Psychotria umbellata* Vell. passou a ser o binômio válido (Kerber, 1999).

P. umbellata (Figura 4) é uma árvoreta de 1 a 3 m de altura comumente encontrada em florestas tropicais e subtropicais do Brasil, ocorrendo desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, no limite sul da Floresta Tropical Atlântica (Dillenburg e Porto, 1985).



Figura 4. *Psychotria umbellata* Vell. em resquício de Mata Atlântica no Município de Dom Pedro de Alcântara, RS.

As folhas desta espécie possuem lâmina elíptica, com 9 a 13 cm de comprimento por 5 a 7 cm de largura, bordos lisos e nervuras principais e secundárias nítidas na face ventral e salientes na dorsal. As estípulas interpeciolares são inteiras, obtuso-triangulares, uma em cada lado do ramo, com bases concrecidas e tufo de pêlos na face interna. As inflorescências são terminais em cimeiras, corimbiformes, com pedúnculo curto e brácteas triangulares na base das ramificações. As flores são hermafroditas, sésseis e curto-pediceladas na mesma inflorescência. O fruto é drupáceo, comprimido lateralmente, roxo e com cálice persistente quando maduro, com duas sementes por fruto. A floração se dá nos meses de setembro a novembro e a frutificação, de janeiro a março (Dillenburg e Porto, 1985).

Em trabalho realizado em 1996, Leal e Elisabetsky encontraram atividade analgésica do tipo opióide para o extrato alcoólico bruto desta planta, utilizando

o ensaio *tail flick*. Esta atividade foi dose-dependente, sendo a de 350 mg/Kg comparável à morfina (6 mg/Kg) e reversível pela prévia administração de naloxona (Leal, 1994; Elisabetsky *et al.*, 1997).

Kerber (1999) isolou em folhas secas de *P. umbellata* um alcalóide indol-monoterpênico inédito majoritário, denominado umbelatina (Figura 5), cuja estrutura sugere a condensação do iridóide 10-oxo-5-epi-geniposídeo com triptamina. A estrutura da umbelatina sugere uma rota de biossíntese alternativa para a formação deste alcalóide, independente da ação da enzima strictosidina sintase. Atualmente esta molécula é conhecida por psicolatina (Both *et al.*, 2005; 2006; Paranhos *et al.*, 2005).

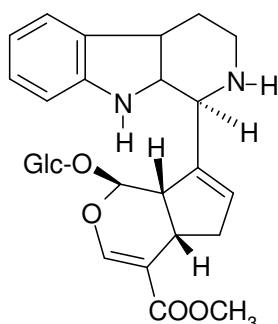


Figura 5. Estrutura química da psicolatina, anteriormente chamada umbelatina. Glc = glicose (Kerber, 1999).

Both *et al.* (2002) relataram atividade analgésica de umbelatina em modelos de dor provocados por estímulos térmicos e químicos. Este efeito analgésico mostrou ser dose-dependente (100 - 300 mg/Kg), parcialmente reversível por naloxona, sugerindo que a ativação de receptores opióides participam no modo de ação deste alcalóide. Nos testes de dor induzida por capsaicina e formalina, a umbelatina também demonstrou atividade dose-dependente e ação sinérgica quando co-administrada com o antagonista

MK-801, sugerindo a participação do sistema glutamatérgico na atividade deste composto.

Trabalhos mais recentes vêm revelando seus efeitos no SNC e o alto potencial psicofarmacológico deste alcalóide. Both *et al.* (2005) demonstraram que psicolatina apresenta efeitos ansiolíticos em doses que não afetaram o tempo de sono ou a atividade locomotora espontânea. Esse efeito foi revertido com a administração prévia de ritanserina, indicando o envolvimento de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/C} no processo. Além disso, os efeitos antidepressivos apresentados por psicolatina (3 e 7,5 mg/Kg) foram equiparáveis aos de anti-depressivos como imipramina (15 mg/Kg) e fluoxetina (50 mg/Kg). Psicolatina também afetou negativamente a aquisição de aprendizado e a consolidação de memória, sem interferir na recuperação das mesmas.

Em estudo de 2006, Both e colaboradores verificaram que psicolatina interage com outros tipos de receptores, como os glutaminérgicos NMDA e dopaminérgicos DA. Dessa maneira, estes autores estabeleceram que os efeitos comportamentais da psicolatina envolvem o *cross talk* de múltiplos receptores com os quais este composto parece interagir e sugerem o potencial uso antipsicótico do composto no tratamento de esquizofrenia, com mínimos efeitos adversos.

Na planta, psicolatina mostrou regulação ontogenética de biossíntese e revelou distribuição órgão específica, sendo acumulada em menores concentrações durante os estádios iniciais de frutificação. Frutos verdes acumularam psicolatina a $1,07 \pm 0,5\%$ do peso seco, enquanto que a polpa de frutos maduros apresentou $2,85 \pm 0,05\%$ do peso seco. As folhas apresentam

os maiores teores de psicolatina, cerca de 4% do peso seco, sendo que apenas traços deste alcalóide foram encontrados nas raízes ($0,06 \pm 0,3\%$ do peso seco), sugerindo que sua biossíntese ocorra em partes aéreas ou que seja rapidamente transportada para estas (Paranhos, Fragoso e Fett-Neto, manuscrito em preparação). Este mesmo padrão de acúmulo foi observado em plântulas regeneradas a partir de calos via embriogênese somática por nosso grupo de pesquisa (Paranhos *et al.*, 2005). Calos não apresentam psicolatina, porém as partes aéreas das plântulas diferenciadas obtidas a partir de calos apresentaram teores de psicolatina similares aos encontrados em plantas adultas de mata.

O acúmulo de psicolatina não é responsivo a estresse biótico ou abiótico, diferentemente do observado para braquicerina em folhas de *P. brachyceras*, que apresentou um aumento de cerca de duas vezes em seu conteúdo quando folhas de estacas apicais foram submetidas a dano mecânico. Folhas de estacas apicais de *P. brachyceras* expostas à radiação UV apresentaram aumento de cerca de 10 vezes no acúmulo de braquicerina (Gregianini *et al.*, 2003; 2004). Interessantemente, os níveis basais de psicolatina são comparáveis aos conteúdos de braquicerina em sua máxima indução sob tratamento de UV, caracterizando diferentes perfis predominantes de acúmulo para estes dois alcalóides: fitoanticipina para psicolatina e fitoalexina para braquicerina (Pasquali *et al.*, 2006).

Em ensaios *in vitro*, psicolatina mostrou ser eficiente atuando como agente redutor de peróxidos e apresentou atividade *quenching*, sendo capaz de capturar espécies reativas de oxigênio como oxigênio *singlet* (Paranhos, Fragoso e Fett-Neto, manuscrito em preparação). Devido à alta correlação

entre atividade *quenching* de radicais livres e de oxigênio *singlet* (Hollósy, 2002), é possível que psicolatina seja capaz de atuar na proteção contra outras formas de radicais livres. Além disso, psicolatina pode atuar como filtro de radiação UV graças a sua propriedade de absorver energia neste comprimento de onda. Estes dados *in vitro* podem estar relacionados com seu possível papel de defesa na planta.

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.

As plantas usam a luz não só como fonte de energia para a assimilação do carbono inorgânico, mas também como um importante sinal ambiental (Liu *et al.*, 2006). Assim sendo, a luz acaba por desempenhar papel fundamental na vida das plantas, afetando significativamente o desenvolvimento e a expressão de diversos genes, num processo chamado de fotomorfogênese. (Kendrick e Kronenberg, 1993; Parks, 2003). Dessa maneira, a luminosidade acaba por afetar inclusive o metabolismo de vários produtos secundários (Siebert e Kadkade, 1980; De Luca *et al.*, 1989; Fett-Neto *et al.*, 1995; Henriques *et al.*, 2004).

Estudos da biossíntese de alcalóides indólicos monoterpênicos em plântulas em desenvolvimento de *C. 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 cultivadas em condições assépticas 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 na ausência de sacarose, quando comparados aos de plântulas

crescidas na luz, sugerindo que a biossíntese do alcalóide no escuro não é limitada 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; Liu *et al.*, 2006). Segundo uma bem humorada analogia de Liscum *et al.* (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), 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) (Hérou-Bron *et al.*, 2001; Quail, 2002; Liscum *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006).

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 *et al.*, 2003).

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 ocorreu há 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 6A). 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).

O fotoreceptor pode existir em duas conformações fotointerconversíveis – 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 (Parks, 2003; Taiz e Zeiger, 2004).

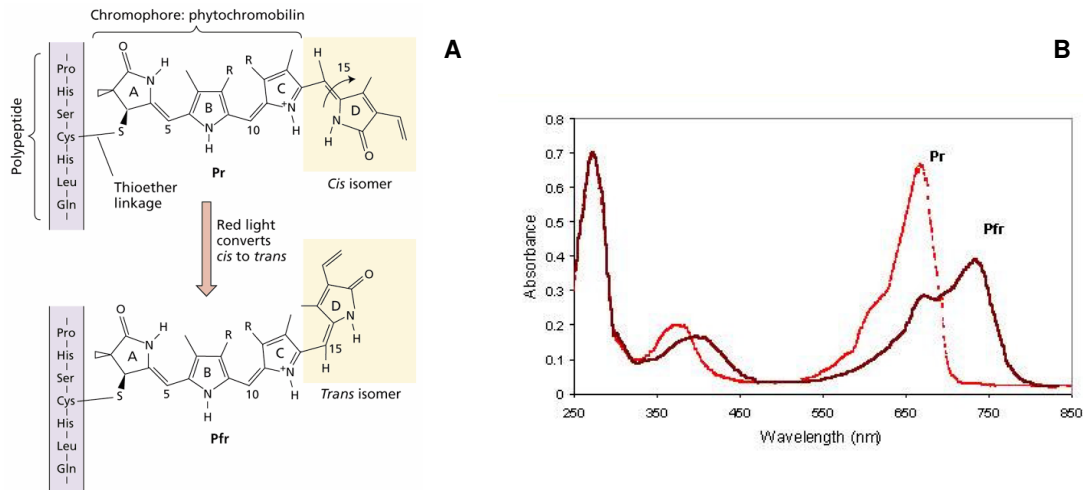


Figura 6. A. Estrutura das formas Pr (fitocromo vermelho) e Pfr (fitocromo vermelho-extremo) do cromóforo (fitocromobilina) e a região do peptídeo ligada ao cromóforo através de uma ligação tioéter. O cromóforo é submetido a uma isomerização *cis-trans* no carbono 15, em resposta à luz vermelha e vermelho-extremo. **B.** Espectros de absorção de fitocromos purificados, nas formas Pr e Pfr. (Taiz e Zeiger, 2004).

Na resposta clássica de fitocromo, a luz vermelha é indutora de processos fisiológicos enquanto que a luz na faixa do vermelho-extremo é inibitória. Essa resposta fotorreversível, de baixa fluência ou LFR (*Low Fluence Response*), requer doses baixas de irradiância e é mediada pela isoforma B do fitocromo. Contudo, as VLFRs (*Very Low Fluence Responses*) ocorrem sob fluências muito baixas de irradiância, não apresentando fotorreversibilidade e sendo mediadas pelo fitocromo A (Peer e Langenheim, 1998).

Os eventos fotomorfogênicos nas plantas mediados pelos fitocromos incluem a produção de metabólitos secundários como terpenos (Tanaka *et al.*, 1989; Yamaura *et al.*, 1989; 1991). Este grupo de pesquisadores do Japão mostrou que a promoção de acúmulo de terpenos em plântulas estioladas de tomilho (*Thymus vulgaris*) é mediada pelo fitocromo. Com ensaios de fotoconversão, nos quais as plântulas eram expostas a pulsos subsequentes 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 β -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).

A luz vermelha é relacionada com a indução da síntese de inúmeros metabólitos secundários de diferentes classes, como flavonóides e antocianinas, carotenóides e monoterpenos (Beggs *et al.*, 1986; Yamaura *et al.*, 1991; Schofield e Paliyath, 2005). Uma recente publicação revela que cerca de 250 genes do genoma de *Arabidopsis thaliana* respondem rapidamente a sinais de luz vermelha; 80% são induzidos e 20%, inibidos (Quail, 2007). Paralelamente, também há evidências de que nem sempre a regulação por luz vermelha ocorre em nível transcricional. A síntese de carotenóides em discos de pericarpo de frutos de tomate foi induzida em cerca de 50% após exposição à luz vermelha em relação aos controles do escuro. Esses resultados foram correlacionados a uma maior atividade da enzima fitoeno sintase, chave para a síntese desta classe de compostos do metabolismo secundário (Schofield e Paliyath, 2005).

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 subsequente 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 *et al.*, 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.

A formação de chiconina, uma naftoquinona utilizada em medicamentos anti-tumorais e no tratamento de HIV, é fortemente inibida por luz em cultura de células de *Lithospermum erythrorhizon*. Testes posteriores comprovaram que tal inibição era causada pela luz azul, sendo que a luz vermelha induzia uma inibição parcial (Yamamoto *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006).

Recentemente, foram isolados *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. A cada domínio da região N-terminal encontra-se ligada 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 a 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 frequentemente um processo dependente da presença de tecidos diferenciados ou de células especializadas, isto é, com algum grau de diferenciação (De Luca *et al.*, 1989; Yamaura, 1989; Verpoorte e Maraschin, 2001; Zárata *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2004). 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 ontogénéticos 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.

Espécies reativas de oxigênio - ROS (*Reactive Oxygen Species*)

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 ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) são produzidas como sub-produtos normais do metabolismo celular aeróbico e podem causar danos a macromoléculas biológicas. 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 maior parte da produção 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, uma importante fonte de ROS são os cloroplastos (Edreva, 2005). ROS também podem ser geradas por processos metabólicos como autooxidação de pequenas moléculas (hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, ferredoxinas reduzidas) produzindo $O_2^{\cdot-}$. Além disso, fatores ambientais, como irradiação, poluição ambiental e produtos tóxicos são potenciais geradores de ROS (Henriques *et al.*, 2001).

Tipos de ROS

Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$):

O radical superóxido ou ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) 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 $O_2^{\cdot-}$ é a fagocitose, na qual os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) produzem $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 através da ação de uma oxidase que transfere elétrons do NADPH para o O_2 para defesa bactericida (Forman e Thomas, 1986).

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 ($OH\cdot$). 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).

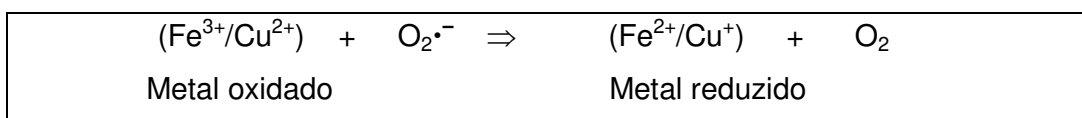
Radical hidroxila (OH•):

Os efeitos mais nocivos provocados pela produção tanto do $O_2^{\cdot-}$ quanto do H_2O_2 é a subsequente e rápida formação do radical hidroxila (OH•). O OH• é facilmente gerado a partir de H_2O_2 através da reação de Fenton (Figura 7) na presença de íons metálicos como Fe^{+2} ou Cu^{+1} (Fridovich, 1998).

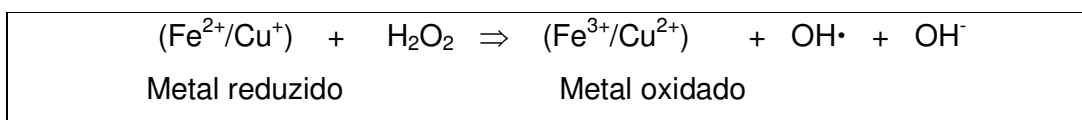
O radical OH• é considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida desse radical com metais e outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Os metais de transição, tais como ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+) aumentam a velocidade da produção de OH• (Freitas e Meneghini, 2001). A reação envolvendo metais ocorre em etapas: em um primeiro passo, o metal na sua valência mais alta (Fe^{3+} ou Cu^{2+}) reage com o radical $O_2^{\cdot-}$, produzindo íon metálico, ferroso (Fe^{2+}) ou cuproso (Cu^+) e O_2 (Reação de Haber-Weiss) (Figura 7) deixando o metal em uma valência menor. Estes íons reagem rapidamente com H_2O_2 , gerando OH•, íon hidroxil (OH^-) e Fe^{3+} (Reação de Fenton) (Figura 7).

O radical OH• 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 (Fridovich, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2000).

Reação de Haber-Weiss



Reação de Fenton



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

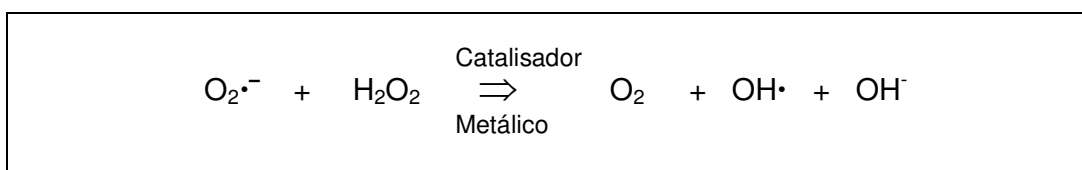


Figura 7. Representação da formação do radical OH^{\bullet} pelas reações Haber-Weiss/Fenton. (Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2000).

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, a uma remoção mais rápida dos oxidantes pela célula, protegendo a mesma contra o estresse oxidativo (Cyrne *et al.*, 2003).

Superóxido Dismutase (SOD):

A atividade de SOD dismuta $2 \text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 e 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 localizadas em 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).

Catalase (CAT):

A catalase é uma enzima ubíqua encontrada em todos os organismos conhecidos. Em células eucarióticas, está presente no citosol e nos peroxissomos. Essa enzima converte duas moléculas de H_2O_2 em duas de H_2O e O_2 . A ação dessa enzima envolve a oxidação divalente do ferro heme (IV) que compõe sua estrutura, 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).

***Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo**

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 reduzida na levedura. Na presença de concentrações de glicose abaixo da concentração crítica (0,2% no meio) e na presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbica, e nesse caso a levedura possuirá alta atividade mitocondrial, pois os genes em questão não estarão reprimidos (Halliwell e 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, criando condições para que elas possam se dividir, embora ainda não estejam se dividindo. Na fase exponencial, o número de células

aumenta exponencialmente com o tempo, com energia proveniente da fermentação. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), com uma parada transitória 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 já estão exauridas, as células entram na fase estacionária, na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Pringle e Hartwell, 1982; Fuge e 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 às células de organismos multicelulares em aspectos importantes: (i) maior parte da energia vem da respiração mitocondrial; (ii) as células estão na fase G₀, 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 e Kosman, 1992; Longo *et al.*, 1999), e a enzima catalase representada por duas formas, uma citosólica, codificada pelo gene *ctt1*, e outra peroxissomal codificada pelo gene *cat1* (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 e 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 H₂O₂ 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).

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 mutações gênicas, que correspondem a alterações ocorridas na seqüência 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 comparadas a tratamentos não mutagênicos (Brendel e 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 através do cultivo destas em meio seletivo contendo canavanina.

Referências

- Adjibadé, Y (1989) Pharmacognosie du *Psychotria forsteriana* A. Gray (Rubiaceae) – aspects botanique, chimique et essais pharmacologiques preliminaries (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. *Nature*, 366:162-166.
- Ahmad, M; Jarillo, JA; Smirnova, O; Cashmore, AR (1998) Cryptochrome blue light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature*, 392: 720-723.
- Aniszewski, T; Ciesiolka, D; Gulewicz K (2001) Equilibrium between basic nitrogen compounds in lupin seeds with differentiated alkaloid content. *Phytochem.*, 57: 43-50.
- Beggs, CHJ; Wellman, E; Grisebach, H (1986) Photocontrol of flavonoid biosynthesis. In: Kendrick, R.E.; Kronenberg, G.H.M. eds. *Photomorphogenesis in Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, 467-449.
- 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.
- Boeira, JM; Viana, AF; Picada, JN; Henriques, JAP (2002) Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 500: 39-48.
- 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.
- Both, FL (2001) Propriedades analgésicas do alcalóide umbelatina isolado de *Psychotria umbellata* (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado. Programa

de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Both, FL; Kerber, VA; Henriques AT et al. (2002) Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharm. Biol.*, 40: 336-341.
- Both, FL; Meneghini, L; Kerber, VA; Henriques, AT; Elisabetsky, EJ (2005) Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT_{2A/C} serotonin modulator. *J. Nat. Prod.*, 68(3): 374-380.
- Both, FL; Meneghini, L; Kerber, VA; Henriques, AT; Elisabetsky, EJ (2006) Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the indole alkaloid psychollatine. *J. Nat. Prod.*, 69(3): 342-345.
- Boveris, A (1998) Biochemistry of free radicals; from electrons to tissues. *Medicina*, 58: 350-356.
- Brendel, M e Henriques, JAP (2001) The pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* comprise two groups: one deficient in DNA repair and another with altered mutagen metabolism. *Mutat. Res.*, 489: 79–96.
- Brennan, RJ e Schiestl, RH (1998) Free radicals generated in yeast by the *Salmonella* test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. *Mutat. Res.*, 403: 65-73.
- 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; Hendricks, SB (1959) Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photosensitive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 45: 1703-1708.
- Camhi, SL; Lee, P; Choi, AM (1995) The oxidative stress response. *New Horiz.*, 3(2): 170-182.
- Cyrne, L; Martins, L; Fernandes, L; Marinho, HS (2003) Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces*

- cerevisiae* during stationary phase. Free Radic. Biol. Med., 34(3): 385-393.
- Dearfield, KL; Cimino, MC; Mccarroll, NE; Mauer, I; Valcovic, LR (2002) Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. Mutat. Res., 521: 121-135.
- De Luca, V; Brisson, N; Balsevich, J; 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. Curr. Opin. Plant Biol., 4: 225-233.
- Dillenburg CR e Porto ML (1985) Tribo Psychotriaceae. Boletim Instituto de Biociências da UFRGS. 76p.
- Edreva, A (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. Agric. Ecosyst. Environ., 106, 119-133.
- 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. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 52: 29-66.
- Fett-Neto, AG; Pennington, JJ; 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.
- Forman, HJ e Thomas, MJ (1986) Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. Ann. Rev. Physiol., 48: 669-680.
- 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.
- Freitas, JM e Meneghini, R. (2001) Iron and its sensitive balance in the cell. Mutat. Res., 475: 153-159.
- Fridovich, I (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol., 201: 1203-1209.
- Fuge, EF e Werner-Washburne, M. (1997) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Hohmann, S., Mager, W.H. (eds.) *Yeast Stress Responses*, New York: Springer, p. 53-74
- 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.
- 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.
- Gralla, EB e Kosman, DJ (1992) Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. Adv. Genet., 30: 251-319.
- 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(5): 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(10): 2023-2036.

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.

Halliwell, B e Gutteridge, JMC (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. Oxford University Press, New York.

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, β -D-glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from *Psychotria leiocarpa*. *Phytochem.*, 65: 449-454.

Henriques, JAP; Valsa, JO; Gomes, RA (1987) 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.

Henriques, JAP; Dafré, LA; Picada, JN e Maris, AF (2001) 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.

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. *Ann. Bot.*, 88(Special Issue): 737-743.

Hoehne, FC (1978). Plantas e substâncias tóxicas e medicinais. São Paulo: Novos Horizontes. Reimpressão de 1939.

Hollósy, F (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33: 179-197.

Huang, MR; Rio, AG; Nicolas, A; Kolodner, RD (2003) A genome wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(20): 11529-11534.

Hughes, EH e Shanks, JV (2002) Metabolic engineering of plants for alkaloid production. *Metab. Eng.*, 4: 41-48.

Izawa, S; Inoue, Y; Kimura, A (1995) Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 368(1): 73-76.

Izawa, S; Inoue, Y; Kimura, A (1996) Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 320: 61-7.

Jamieson, DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1511-1527.

Jansen, MAK; Gaba, V; Greenberg, BM (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.*, 3: 131-135.

- Kendrick, RE e Kronenberg, GHM, eds. (1993) *Photomorphogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 864 p.
- Kerber, VA (1999) Análise dos alcalóides de *Psychotria brachyceras* Mull. Arg. E *P. umbellata* Vell. e o estabelecimento e caracterização de cultura de células de *P. umbellata* Vell. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Kutchan, TM (1995) Alkaloid Biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 7: 1059-1070.
- Lajis, NH; Mahmud, Z; Toia, RF (1993) The alkaloids of *Psychotria rostrata*. *Planta Méd.*, 59: 383-384.
- 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.
- Leal, MB e Elisabetsky, E (1996) Opioid-like activity of *Psychotria brachypoda*. *Int. J. Pharm.* 34: 267-272.
- Lee, JH; Choi, IY; Kil, IS; Kim, SY; Yang, ES; Park, JW (2001) Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1526: 191-198.
- Lin, C e Shalitin (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 54: 469-496.
- Liscum, E; Hodgson, DW; 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.
- Liu, Z.; Qi, J.L.; Chen, L., et al. (2006) Effect of light on gene expression and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, 84(1), 39-46.

- Longo, VD; Gralla, EB; Valentine, JS (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 271(21): 12275-12280.
- Longo, VD; Liou, LL; Valentine, JS; Gralla, EB (1999) Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. Arch. Biochem. Biophys., 365: 131-142.
- 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.
- Macgregor, JT; Casciano, D; Müller, L (2000) Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. Mutat. Res., 455: 3-20.
- Maris, AF; Assumpção, ALK; Bonatto, D; Brendel, M; Henriques, JAP (2001) Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria. Curr. Genet., 39: 137-149.
- McKnight, 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.
- 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(3): 235-248.
- 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. *Syst. Bot.*, 24:5-27.
- Paranhos, JT; Fragoso, V; Henriques, AT; Ferreira, AG; Fett-Neto, AG (2005) Regeneration of *Psychotria umbellata* and production of the analgesic indole alkaloid umbellatine. *Tree Physiol.*, 25, 251-255.
- 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.
- 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(4): 287-96.
- Peer WA e Langenheim JH (1998) Influence of phytochrome on leaf monoterpene variation in *Satureja douglasii*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 26(1): 25-34.
- Perry, LM (1980) Rubiaceae. In: *Medicinal plants of east and southeast Asia*, MIT Press. 347-360p.
- Picada, JN; Maris, AF; Ckless, K; Salvador, M; Borisov, NNK; Henriques, JAP (2003) Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutat. Res.*, 539: 29-41.
- Poli, P; Buschini, A; Candi, A; 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, JR e Hartwell, LH (1982) 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.

Pungartnik, C; Picada, JN; Brendel, MB; Henriques, JAP (2002) Further phenotypic characterization of pso mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA repair and response to oxidative stress. Genet. Mol. Res., 1(1): 79-89.

Quail, PH (2002) Phytochrome photosensory signaling networks. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3: 85-93.

Quail PH (2007) Phytochrome-regulated gene expression. J. Integr. Plant Biol., 49(1): 11-20.

Revers, LF; Cardono, J; Bonatto, D; Grey, M; Feldmann, H; Brendel, M; Henriques, JAP (2002) Thermoconditional modulation of the pleiotropic sensitivity phenotype by the *Saccharomyces cerevisiae* PRP19 mutant allele pso4-1. Nucleic Acids Res., 30(22): 4993-5003.

Robbers, JE; Speedie, MK e Tyler, VE (1996) Pharmacognosy and pharmacobiothechnology. Willians & Wilkins, Philadelphia.

Roberts, MF e Strack, D (1999) Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. In: WINK, M. Biochemistry of plant secondary metabolism. Ann. Plant Rev., 1:17-78.

Sancar, A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. Chem. Rev.,103: 2203-2237.

Schofield, A e Paliyath, G (2005) Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. Plant Physiol. Biochem., 43(12): 1052-1060.

- 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; Tabata, M (1989) Phytochrome-mediated production of monoterpenes in Thyme seedlings. *Phytochem.*, 28(11): 2955-2957.
- Terziyska, A; Waltschewa, L; Venkov, P (2000) A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environ. Pollut.*, 109: 43-52.
- 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.
- Waters, MD; Stack, HF; Jackson, MA (1999) Genetics toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutat. Res.*, 437: 21-49.
- Wittstock, U e Gershenzon, J (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 1-8.
- Yamamoto, H; Zhao, P; Yazaki, K; Inoue, K (2002) Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 1086-1090.

- Yamaura, T; Tanaka, S; Tabata, M (1989) Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in Thyme seedlings. *Phytochem.*, 28(3): 741-744.
- Yamaura, T; Tanaka, S; 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; Verpoorte, R (2001) Terpenoid índole alkaloid profile changes in *Catharanthus pusillus* during development. *Plant Sci.*, 160: 971-977.

OBJETIVOS

O presente estudo visa caracterizar a fotorregulação de GPV em *Psychotria leiocarpa* e avaliar os efeitos antioxidantes e antimutagênicos do extrato bruto foliar de *P. umbellata* e de seu alcalóide majoritário purificado. Para tanto, este trabalho foi dividido em dois capítulos, como segue:

Capítulo 1 - Fotorregulação do alcalóide *N*, β -D-Glicopiranosilvincosamida em *Psychotria leiocarpa*.

Este capítulo teve como objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o efeito da transição luz-escuro no acúmulo de GPV em plântulas crescidas em condições assépticas de *P. leiocarpa*;
- ✓ Avaliar os conteúdos de GPV, bem como de proteínas e de açúcares, em plântulas crescidas em condições não assépticas de *P. leiocarpa* expostas a filtros enriquecidos para diferentes comprimentos de onda (vermelho, azul e vermelho-extremo) ao longo do tempo e identificar os sistemas fotorreceptores envolvidos.

Capítulo 2 - Antioxidant and antimutagenic properties of the crude foliar extract and the alkaloid psychollatine of *Psychotria umbellata* in *Saccharomyces cerevisiae*.

Este capítulo teve como objetivos específicos:

- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do extrato foliar de *P. umbellata* e de psicolatina na levedura *S. cerevisiae* sob estresse oxidativo;

- ✓ Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato foliar de *P. umbellata* e de psicolatina, utilizando o sistema hipoxantina/xantina oxidase.
- ✓ Verificar o efeito antimutagênico do extrato foliar de *P. umbellata* e de psicolatina na levedura *S. cerevisiae*.

CAPÍTULO 1

Fotorregulação do alcalóide *N*, β -D-glicopiranosilvincosamida em
Psychotria leiocarpa Cham. & Schlecht.

Introdução

O gênero *Psychotria* (Rubiaceae) é conhecido por produzir alcalóides, principalmente do tipo polindolínicos (Adjibade *et al.*, 1992; Hart *et al.*, 1974; Libot *et al.*, 1987), com diferentes efeitos farmacológicos como inibição da agregação de plaquetas humanas (Beretz *et al.*, 1985), citotoxicidade (Roth *et al.*, 1986) e atividade antidepressiva, ansiolítica e analgésica do tipo opióide (Both *et al.*, 2005).

Psychotria leiocarpa Cham. & Schlecht. cresce como um arbusto de até 2 m de altura e é nativa da Argentina, Paraguai e Brasil (Smith e Downs, 1956), tendo ampla distribuição no Rio Grande do Sul (Dillenburger e Porto, 1985). Esta espécie acumula um alcalóide indólico monoterpênico *N*-glicosilado denominado *N*, β -D-Glicopiranosilvincosamida (GPV) com atividade analgésica inespecífica (Elisabetsky *et al.*, 1997; Lopes, 1998).

Na busca da otimização da produção de biofármacos, vários estudos vem sendo realizados a fim de elucidar as condições mais adequadas de sistema de cultivo para dada espécie. Fatores como estágio ontogenético, diferenciação dos tecidos e compartimentalização celular e estímulos ambientais, como luz, são essenciais para o acúmulo de alguns alcalóides (De Luca e St.-Pierre, 2000). 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, e embora não seja necessária para a biossíntese de catarantina, é capaz de aumentar seu acúmulo (De Luca *et al.*, 1989, Zhao *et al.*, 2001).

Em estudo anterior de nosso grupo, constatou-se o envolvimento da luz na biossíntese de GPV em *P. leiocarpa*. Em plantas adultas de mata, órgãos

expostos à luz, como as folhas, apresentam cerca de 2,5% do peso seco de GPV, enquanto que órgãos desenvolvidos no escuro apresentam teores baixos deste composto, estando o mesmo ausente em raízes (Henriques *et al.*, 2004). Além disso, plântulas assépticas cultivadas sob escuro contínuo, independentemente do fornecimento ou não de sacarose exógena, acumularam teores mais baixos de GPV do que plântulas cultivadas na luz.

Entretanto o envolvimento da luz nem sempre é positivo. Em alguns casos, como ocorre em *Taxus cuspidata*, a luz branca em calos e suspensões celulares inibiu o crescimento e o acúmulo de taxol (Fett-Neto *et al.*, 1995). A formação de chiconina, uma naftoquinona utilizada em medicamentos anti-tumorais e no tratamento de HIV, é fortemente inibida pela luz branca e azul, sendo que a luz vermelha induz uma inibição parcial (Liu *et al.*, 2006). Paralelamente, a síntese de monoterpenos, flavonóides, antocianinas e carotenóides é induzida por luz vermelha, sendo que a regulação do fitocromo nem sempre ocorre em nível transcricional (Beggs *et al.*, 1986; Yamaura *et al.*, 1991; Schofield e Paliyath, 2005).

O presente trabalho visou estudar a modulação por luz no acúmulo de GPV através de ensaios de transição luz-escuro, sendo que a influência do suprimento exógeno de carboidratos também foi investigada. Além disso, a influência da qualidade de luz (azul, vermelho e vermelho-extremo) na produção de GPV e nos teores de proteínas e açúcares em plântulas de *P. leiocarpa* foi analisada.

Materiais e Métodos

Germinação de sementes de *Psychotria leiocarpa*: Frutos de *P. leiocarpa* (depósito no Herbário da UFRGS – ICN: 120756) foram coletados em plantas crescendo espontaneamente no Morro Santana em Porto Alegre-RS. Após a retirada manual das polpas dos frutos, as sementes foram armazenadas em refrigerador a 10 ± 2 °C por cerca de duas semanas. As sementes foram submetidas a assepsia superficial com etanol 70% por 1 minuto, seguido por 20 minutos de imersão 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 germinadas *in vitro* ou *ex vitro*, como segue.

Parte das sementes foi inoculada em meio de cultura previamente autoclavado por 15 minutos a 120 °C e 1,5 atm, contendo 0,1 x MS (Murashige e Skoog, 1962) solidificado com ágar 0,6%, com ou sem sacarose (1,5%). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 2 °C, no escuro contínuo ou na luz (fotoperíodo de 16 horas/dia e R.F.A. de aproximadamente $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). As sementes mantidas no escuro foram avaliadas sob luz verde. Outra parte das sementes foi semeada 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 sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/dia (R.F.A. de aproximadamente $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, lâmpadas fluorescentes brancas) e temperatura de 28 ± 2 °C.

Efeito de transições luz-escuro no acúmulo de GPV: As plântulas crescidas em condições assépticas com seis a dez folhas obtidas a partir de sementes cultivadas por cerca de 6 meses *in vitro* sem sacarose sob condições de luz ou escuro contínuo foram utilizadas em um estudo de transição luz-escuro a fim de investigar a influência da luz na biossíntese de GPV. Parte das plântulas cultivadas na luz foi transferida para o escuro contínuo e parte das plântulas cultivadas no escuro foi transferida para a luz, permanecendo nestas condições por 14 dias. Foram coletadas as partes aéreas de plântulas aos 7 e 14 dias após a transição.

Posteriormente, com um outro lote de plântulas todo germinado na luz (fotoperíodo 16 horas/dia) com ou sem sacarose (1,5%) repetiu-se o procedimento de transferências descrito anteriormente. Porém, como todo esse lote de plântulas foi mantido na luz, parte dessas plântulas foi submetida a um pré-tratamento de indução de estiolamento e mantida no escuro por 25 dias, sendo que, ao longo deste processo, tais plântulas foram avaliadas sob luz verde. Após a indução de estiolamento, as transferências foram realizadas e partes aéreas das plântulas foram coletadas aos 14 dias após as transições. Após coletas, as amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e mantidas a 5 °C até a análise do alcalóide.

Efeito da qualidade de luz no acúmulo de GPV, proteínas e açúcares: 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 não asséptica descrita anteriormente foram regadas com 0,1 x MS

(Murashige e Skoog, 1962) e, após sete dias, foram submetidas a filtros de celofane cujo efeito corresponde a um enriquecimento da luz transmitida 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 e Yang (1999) e Héraut-Bron *et al.* (2001) e seus espectros de absorbância, obtidos por varredura em espectrofotômetro Cintra 5 (GBC, Victoria, Austrália), encontram-se anexados ao fim deste trabalho. A R.F.A. foi padronizada entre os tratamentos, no primeiro experimento foi de $\sim 30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e no segundo, $\sim 90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Neste segundo experimento, um pré-tratamento de indução de estiolamento foi utilizado, no qual, antes do início das exposições aos filtros, as plântulas foram submetidas ao escuro contínuo por 55 dias.

Para o primeiro experimento, plântulas foram coletadas aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias e, no segundo experimento, coletou-se aos 7, 17 e 27 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 °C até a realização das quantificações.

Extração e análise de GPV: Para quantificação de GPV, amostras de partes aéreas de plântulas foram padronizadas para peso e volume de extração, ou seja, a razão massa de tecido para volume de metanol foi mantida próxima a 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 280 nm). As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 (*Hewlett-Packard ODS Hypersil*, 5 µm, 100 x 2,1 mm). A fase móvel constituiu-se de solvente A (MeOH-H₂O, 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% de B, numa taxa de fluxo de 0,2 mL.min⁻¹.

Para a quantificação de GPV, 10 ou 20 µL 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 (Henriques *et al.*, 2004). 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.

Extração e análise de proteínas e hexoses solúveis totais: Para extração e quantificação protéica utilizou-se o método de Bradford (1976), no qual o corante utilizado (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) interage com resíduos de aminoácidos, especialmente os básicos. Para extração de proteínas solúveis totais, pulverizou-se cerca de 20 mg de material fresco em nitrogênio líquido e adicionou-se 1 mL de tampão TrisHCl a 50 mM. As amostras foram agitadas

vigorosamente por 1 minuto; incubadas em gelo por 10 minutos; novamente agitadas em vórtex 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, os extratos foram incubados por no mínimo 10 minutos com o reagente de Bradford e as leituras foram obtidas a 595 nm, usando o modelo *SpectraMax 250* da *Molecular Devices*. Uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina) foi gerada e os teores protéicos foram expressos em mg de proteína por mg de material vegetal extraído (peso fresco ou seco, dependendo do experimento).

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 1,0 mL de etanol 80% 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, alíquotas de extratos foram incubadas por 20 minutos com 1,0 mL de fenol 5% (p/v) e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Uma curva padrão de D-Glicose foi gerada e as leituras de amostras e da curva padrão procedidas a 490 nm, usando o modelo *SpectraMax 250* da *Molecular Devices*. Os teores de hexoses totais foram expressos em mg de hexoses por mg de material vegetal extraído.

Análises estatísticas: Os dados foram avaliados quanto à homogeneidade de variância e, quando adequado, analisados por ANOVA com homogeneidade de variância assumida ou não, seguida por teste de Duncan ou Dunnett's T3, respectivamente, $p \leq 0,05$ ou $0,15$ (Rohlf e Sokal, 1969). Foi utilizado o programa estatístico SPSS for *Windows* versão 12.0. Todos experimentos foram realizados no mínimo por duas vezes de forma independente e cada tratamento possuía de 3 a 4 repetições em cada experimento.

Resultados e Discussão

Efeitos da transição luz-escuro no acúmulo de GPV

Em estudo anterior de nosso grupo, sugeriu-se o envolvimento da luz no controle do acúmulo de GPV (Henriques *et al.*, 2004). Isso pode ser comprovado em experimentos de transição luz-escuro nos quais partes aéreas de plântulas cultivadas na luz apresentaram um teor significativamente maior de GPV que de plântulas estioladas (Figura 1).

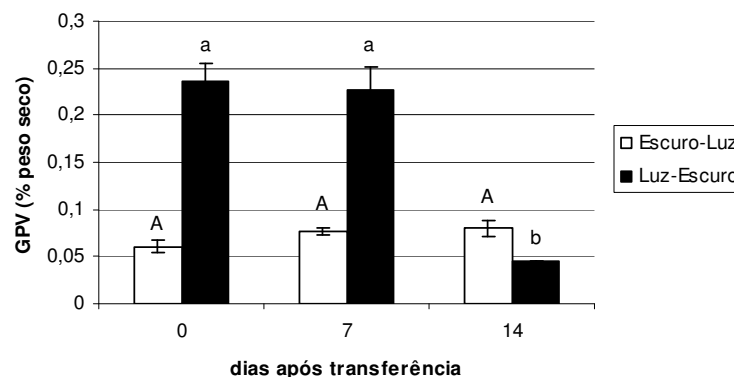


Figura 1. Acúmulo de GPV em % do peso seco de plântulas *in vitro* em meio 0,1 x MS (Murashige e Skoog, 1962) desprovido de sacarose, cultivadas no escuro contínuo e transferidas para a luz (Escuro-Luz) e cultivadas na luz e transferidas para o escuro (Luz-Escuro). Barras de mesmo grupo compartilhando letras iguais, não diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Quando plântulas cultivadas sem sacarose na luz foram transferidas para o escuro, em 14 dias o acúmulo de GPV decaiu de 0,23% do peso seco para 0,045% (Figura 1). Quando plântulas estioladas foram transferidas para a luz, em 14 dias o teor do alcalóide permaneceu inalterado (~0,07% do peso seco), mostrando apenas uma tendência de aumento. Cabe ressaltar que as plântulas utilizadas nestas transições de escuro para luz foram germinadas e tiveram todo o seu desenvolvimento sob escuro contínuo. Sabendo-se que as enzimas envolvidas na biossíntese de alcalóides podem estar associadas a diversos compartimentos sub-celulares, incluindo estroma de cloroplasto e membrana de tilacóides, estruturas relacionadas com o fluxo de energia celular a partir de luz (Facchini, 2001), provavelmente o tempo de exposição não foi suficiente para a estruturação celular requerida ou mesmo para a retomada da atividade enzimática envolvida na biossíntese deste alcalóide, sugerindo a necessidade de maiores tempos de exposição à luz.

Resultados de experimentos de germinação anteriores realizados pelo nosso grupo indicam um certo grau de fotoblastia das sementes de *P. leiocarpa*. Quando expostas à luz, as sementes apresentaram um percentual de germinação maior, em torno de 45%, enquanto que no escuro esse índice não ultrapassou os 10%. Uma vez que a germinação no escuro resulta em baixo número de plântulas, optou-se por adotar um pré-tratamento de indução de estiolamento nas plântulas crescidas em condições assépticas germinadas na luz. Tendo como base o experimento anterior, tais plântulas foram submetidas ao escuro contínuo por 25 dias, a fim de garantir a indução de estiolamento. Após esse período, parte das plântulas que foram mantidas na luz foi transferida para o escuro e parte das plântulas estioladas foi novamente

transferida para a luz, e 14 dias após as transferências os teores de GPV foram analisados.

Observou-se que os efeitos das transições foram mais evidentes em plântulas cultivadas na ausência de sacarose, apesar de haver uma nítida tendência de comportamento semelhante no tratamento com sacarose (Figura 2). Isso foi consistente em todas as repetições independentes desse experimento, exceto para a transição luz-escuro de plântulas cultivadas com sacarose, que, em uma das repetições, revelou diferença significativa em relação ao tratamento de luz contínua (dados não mostrados). As plântulas submetidas à indução de estiolamento revelaram teores de GPV semelhantes aos de plântulas mantidas na luz, sugerindo que talvez para estas plântulas germinadas na luz a duração do pré-tratamento poderia ter sido maior ou que a breve exposição à luz verde durante as avaliações de estiolamento tenha sido suficiente para causar alguma produção de GPV, sugerindo uma resposta do tipo fluência muito baixa.

Esses dados sugerem que a biossíntese de GPV, ao menos na ausência de sacarose exógena, seja modulada por luz de forma responsiva a alterações na condição luminosa e estão de acordo com dados já publicados (Henriques *et al.*, 2004). Além disso, o efeito da transição do escuro para a luz por 14 dias elevou os teores de GPV para níveis superiores aos encontrados em plântulas do tratamento sem sacarose cultivadas na luz. A luz pode ser necessária para a ativação de enzimas ou transcrição de genes biossintéticos envolvidos na síntese do alcalóide e na diferenciação dos cloroplastos. Em culturas de calos diferenciados de *Catharanthus roseus*, a biossíntese de vindolina é altamente controlada por luz e a mediação deste processo possivelmente ocorre através

da atividade de peroxidases e do desenvolvimento do cloroplasto (Zhao *et al.*, 2001).

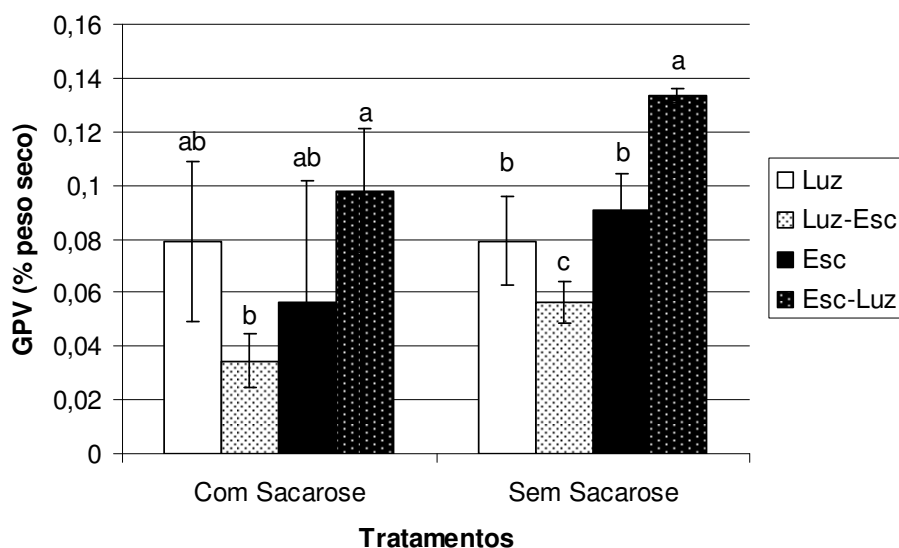


Figura 2. Acúmulo de GPV em % do peso seco de plântulas *in vitro* em meio 0,1 x MS (Murashige e Skoog, 1962), com ou sem sacarose (1,5%) cultivadas no escuro contínuo e transferidas para a luz (Esc-Luz) e cultivadas na luz e transferidas para o escuro (Luz-Esc), 14 dias após transferências. Barras de mesmo grupo compartilhando letras iguais não diferem estatisticamente segundo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Em alguns pontos, observou-se que as plântulas em meio com sacarose apresentam teores de GPV inferiores aos de plântulas cultivadas na ausência deste carboidrato. O metabolismo do carbono fotossintético pode estar relacionado a essa observação, uma vez que há um maior aporte de intermediários biossintéticos específicos, tais como as moléculas terpeníicas de biossíntese plástica (p. ex. secologanina) (Mummelink *et al.*, 2001) em plantas fotossinteticamente ativas, comparado a plantas com a fotossíntese reprimida pela presença de carboidratos exógenos (Sheen *et al.*, 1999).

Efeito da qualidade de luz no acúmulo de GPV

Em experimento realizado com filtros enriquecedores 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 3A e 4A). Independentemente da qualidade de luz, plântulas amostradas em tempos tardios apresentaram conteúdos de GPV maiores que os de plântulas amostradas nos primeiros pontos de coleta. Isso concorda com dados da literatura para esta espécie, que sugerem que o acúmulo de GPV é regulado positivamente 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 monoterpênóides, respectivamente (Rchid e Baccou, *apud* Verpoorte e Maraschin, 2001; Yamaura *et al.*, 1989).

Segundo análise comparativa entre os gráficos da figura 3, pode-se inferir que, ao passo que os níveis de GPV acumulados são incrementados ao longo do tempo (Figura 3A), os níveis de proteína e de açúcares caem (Figura 3B e C). 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 segundo ensaio (R.F.A. foi de $\sim 90 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) este possível dreno de carboidratos para biossíntese de metabólitos secundários também fica evidenciado no último tempo de coleta, aos 27 dias, no qual os tratamentos

que apresentaram os menores teores de açúcares (Figura 4B) correspondem aos de maiores concentrações de GPV (Figura 4A).

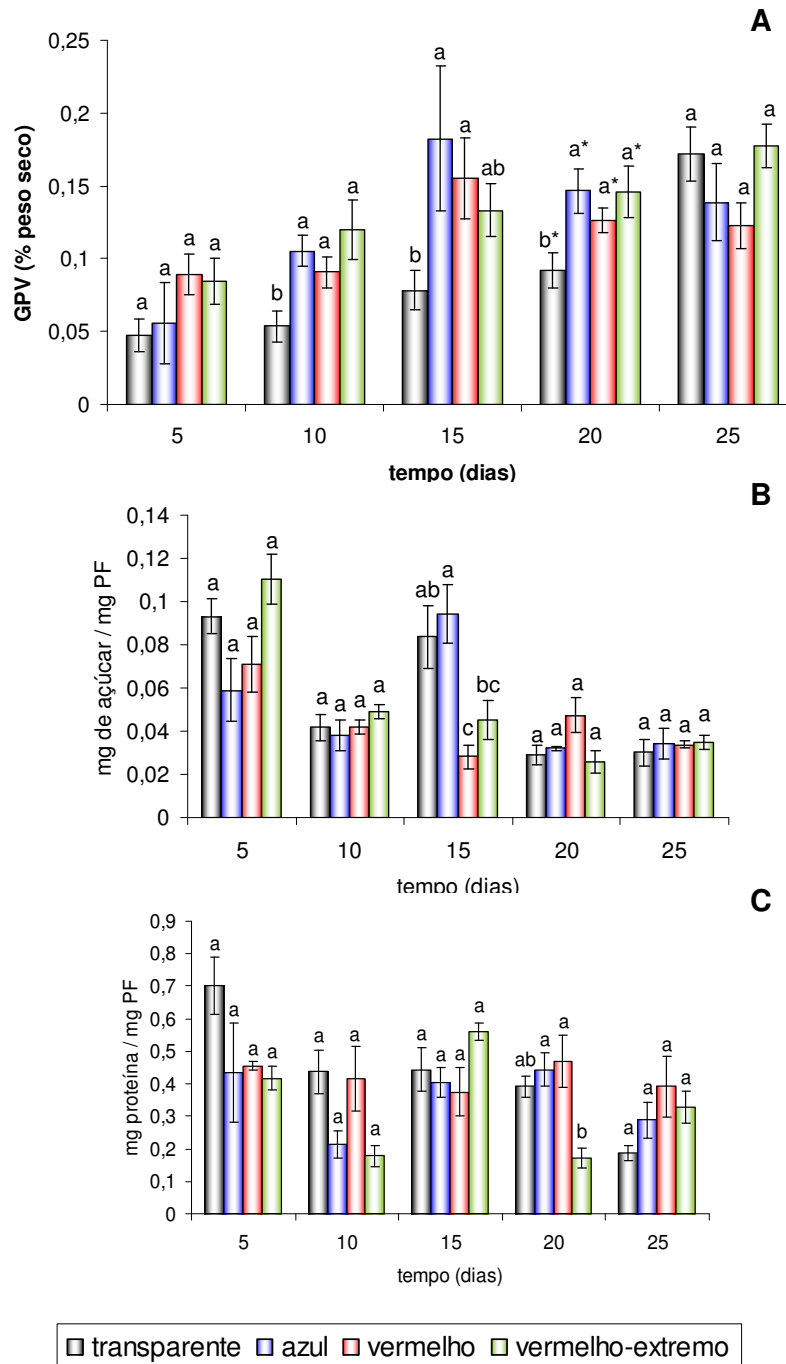


Figura 3. Efeito de filtros enriquecidos para diferentes qualidade de luz em plântulas de *P. leiocarpa*. R.F.A. de $\sim 30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. **A.** Teores de GPV (% do peso seco). Barras compartilhando letras iguais (comparações válidas dentro de cada tempo) não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p \leq 0,15$ (letras com asterisco indicam diferenças significativas a $p \leq 0,05$). **B.** e **C.** Teores de hexoses e de proteínas solúveis totais foliares, respectivamente (PF = peso fresco). Barras compartilhando letras iguais (comparações válidas dentro de cada tempo) não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan $p \leq 0,15$.

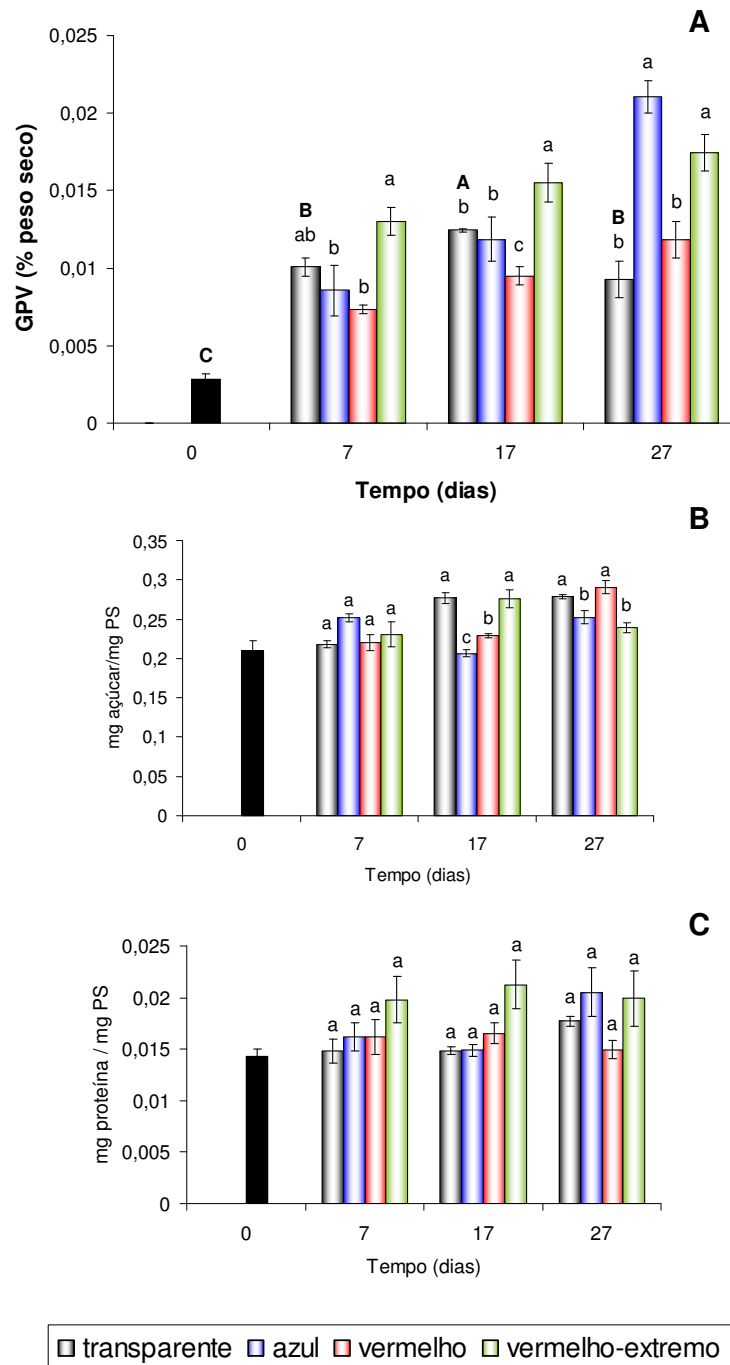


Figura 4. Efeito de filtros enriquecidos para diferentes qualidade de luz em plântulas de *P. leiocarpa*. R.F.A. de $\sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Barras pretas = controle pós-estiolamento. **A.** Teores de GPV (% do peso seco). Barras compartilhando letras iguais não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan, $p \leq 0,05$ (letras minúsculas referem-se a comparações dentro de cada tempo de coleta e maiúsculas, entre controles dos diferentes tempos de coleta). **B.** e **C.** Teores de hexoses e de proteínas solúveis totais foliares, respectivamente (PS = peso seco). Barras compartilhando letras iguais (comparações válidas dentro de cada tempo) não diferem entre si segundo ANOVA seguida pelo teste de Duncan $p \leq 0,05$.

No presente estudo, não foram amostrados os cotilédones, mesmo assim, os resultados suportam uma condição transiente das plântulas quanto à obtenção de autonomia fotoautotrófica. Ou seja, na medida em que o conteúdo de proteínas e, principalmente, de açúcares (decaimento mais acentuado ao longo do tempo) decaem, o indivíduo passa a ativar seu metabolismo fotossintético de carbono. O maior acúmulo de GPV pode estar relacionado a isto, pois é provável que, em condição fotoautotrófica, ocorra um maior suprimento de intermediários específicos, tais como as moléculas terpênicas, em função do aumento de atividade metabólica nos cloroplastos. Ao menos em *Catharanthus roseus*, a secologanina, intermediário da biossíntese da maior parte dos alcalóides indólicos monoterpênicos, deriva da rota plástica da DXS (D-1-desoxi-xilulose 5-fosfato sintase) (Memelink *et al.*, 2001), sendo necessária a presença e funcionalidade desta estruturas para a produção destes compostos (De Luca e Laflamme, 2001).

Ao analisar os teores protéicos e de carboidratos de plantas expostas aos diferentes tipos de luz dentro de cada tempo, verifica-se que em poucas situações ocorreram diferenças significativas entre tratamentos nos parâmetros avaliados do metabolismo primário (Figura 3B e C; 4B e C); quando este fato ocorreu, não foi possível observar uma tendência consistente ao longo do tempo, sugerindo uma certa homogeneidade quanto ao metabolismo primário entre as plantas expostas à luz branca ou luz enriquecida nos diferentes comprimentos de onda.

No entanto, observou-se influência dos diferentes tipos de luz no acúmulo de GPV de plântulas quando comparadas àquele apresentado por

plântulas crescidas sob filtro transparente (Figura 3A e 4A). Esta tendência é clara e apresenta diferenças significativas a $p \leq 0,05$ no dia 20 do primeiro experimento (Figura 3A) e em todos os tempos do segundo experimento (Figura 4A). Mesmo quando as diferenças não são significativas, verifica-se uma tendência consistente de maior acúmulo de GPV em luz enriquecida, especialmente para luz azul e vermelha-extrema.

Dessa forma, os resultados sugerem uma atuação conjunta de diferentes sistemas fotorreceptores, criptocromo e fitocromo. A ação conjunta de sistemas fotorreceptores é conhecida em várias situações (Parks, 2003). No enverdecimento de raízes de *Arabidopsis* sob luz azul, por exemplo, constatou-se forte ação sinérgica de criptocromo e fitocromo (Usami *et al.*, 2004). Considerando-se os tipos de fitocromo, é provável que a indução de GPV seja mediada por PhyA, uma vez que em *Arabidopsis* e em outras espécies mais estudadas, sabe-se que este tipo mais fotolábil de fitocromo controla respostas em ambientes enriquecidos com luz vermelha-extrema contínua (Sullivan e Deng, 2003).

Em uma revisão de Parks (2003), comenta-se 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, uma limitação inerente 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 nunca vivenciam condições de luz ambiente deficientes em todas regiões do espectro. Isto significa que não existem instâncias práticas durante o crescimento e desenvolvimento de uma planta nas quais somente o fitocromo atue e controle as respostas fotobiológicas. O isolamento fotobiológico experimental deve revelar que as funções dos fitocromos normalmente atuam orquestradas com outras classes de fotorreceptores, sendo que eventos de co-ativação são essenciais para muitas respostas fotomorfogênicas.

Analisando-se a figura 3C, observa-se que as plântulas do tratamento vermelho-extremo nos tempos amostrais 10 e 20 dias apresentaram os menores níveis protéicos. Contudo, nestes mesmos tempos amostrais, tal tratamento gerou conteúdos elevados de GPV (Figura 3A), equiparáveis aos tratamentos azul e vermelho. Uma vez que a forma ativa do fitocromo (Pfr) é formada quando da exposição à luz vermelha absorvida pela forma inativa (Pr), esperava-se que os níveis de GPV apresentassem diferenças significativas para esta faixa de luz quando comparados ao tratamento controle. Porém, como já discutido, a indução de acúmulo de GPV ocorreu sob luz vermelha-extrema e a luz vermelha não foi capaz de alterar significativamente o acúmulo de GPV em relação à luz branca controle, exceto aos 17 dias de tratamento do segundo ensaio, quando foi inibitória (Figura 4A). Tal perfil de resposta de indução de GPV poderia se enquadrar nas VLFRs (do inglês, *Very Low Fluence Responses*), que são desencadeadas em ambientes ricos em luz vermelha-extrema, não fotorreversíveis e mediados por PhyA (Taiz e Zeiger, 2002).

O espectro de ação (magnitude de resposta biológica em relação a comprimentos de onda) de respostas do tipo VLFR situa-se na faixa do vermelho e do azul (cores correspondentes ao espectro de absorção de Pr), pois o Pfr também é a forma ativa neste caso (apenas não mostrando fotorreversibilidade por ser capaz de desencadear as respostas em concentrações muito pequenas, geradas sob fluências muito baixas). No entanto, apesar do Pr absorver também na faixa do azul, esta absorção é cerca de apenas 25% da absorção verificada na faixa do vermelho (Taiz e Zeiger, 2002). Considerando-se este fato e a magnitude de indução de GPV por luz azul observada especialmente aos 27 dias do segundo ensaio (Figura 4A), é razoável supor o envolvimento conjunto de fitocromo (PhyA) e criptocromo na indução deste alcalóide. Porém, a cinética mais rápida de indução de GPV em plantas pré-tratadas com escuro por luz vermelha-extrema, comparado ao mesmo efeito de luz azul (Figura 4A), parece indicar uma maior importância de PhyA no processo.

Em estudo realizado com diferentes quimiotipos de *Satureja douglasii*, foi verificado que o tratamento com vermelho-extremo aumentou os teores de monoterpenos, especialmente de cânfora (Peer e Langenheim, 1998). Sendo assim, estes autores sugeriram que a produção destes compostos, ao menos para um quimiotipo desta lamiácea, é regida pelo fitocromo que medeia uma resposta de fluência muito baixa (VLFRs). Vários estudos relatam que, mesmo para uma mesma espécie, as plantas podem diferir quanto à sensibilidade à qualidade de luz, sendo que geralmente indivíduos de populações de áreas mais abertas são mais responsivos e tendem a se enquadrar no perfil fotorreversível de LFRs (do inglês *Low Fluence Responses*) (Peer e

Langenheim, 1998). Uma vez que *P. leiocarpa* é uma arvoreta, ocupando a região de sub-boque na mata, está inserida em uma área coberta e protegida no interior da floresta, rica em luz na faixa do vermelho-extremo. Dessa maneira, do ponto de vista adaptativo, faz sentido adequar a produção de metabólitos secundários segundo um perfil de VLFRs em plantas crescidas espontaneamente na mata. As características deste tipo de resposta estão de acordo com os resultados observados, ou seja, indução de GPV por luz vermelha-extrema contínua e por luz azul e ausência de efeito inibitório consistente de luz vermelha.

A fim de resolver tais questões de fluência de resposta, o segundo experimento foi realizado incrementando-se a irradiância de ~30 para ~90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Tal incremento foi aliado à um pré-tratamento de escuro por cerca de 2 meses, ao qual todas as plântulas foram submetidas antes do início das exposições aos filtros enriquecedores para diferentes qualidades de luz, fazendo assim com que as plântulas se tornassem mais sensíveis e responsivas à exposição luminosa.

Observando-se a figura 4A, pode-se constatar que os efeitos dos diferentes filtros se tornam mais evidentes quando comparados aos do experimento anterior (Figura 3A). A partir dos 17 dias de exposição, o filtro vermelho-extremo induziu um incremento nos teores de GPV em partes aéreas de plântulas de *P. leiocarpa* (Figura 4A), o que ocorreu também em plântulas expostas à luz azul na última amostragem. Ao analisar os teores de GPV no controle pós-estiolamento, verifica-se uma queda expressiva em relação aos controles do filtro transparente, o que não ocorre com os teores protéicos e de

açúcares que se mantêm em valores equiparáveis ao longo de todo o experimento (Figura 4). Estas plântulas apresentavam cerca de 10 meses de idade e foram germinadas e cultivadas na luz, sendo que eram suficientemente robustas para suportar esse período prolongado sob escuro contínuo e não apresentaram nenhum sintoma visível indicativo de estiolamento severo, mostrando apenas um maior alongamento caulinar. Este dado reforça a adaptação fisiológica desta espécie ao ambiente sombreado do sub-bosque, especialmente nas fases iniciais da ontogenia.

Sob irradiância mais alta, no segundo experimento, a luz vermelha pareceu não alterar de forma consistente o acúmulo de GPV, enquanto que a luz vermelha-extrema induziu o acúmulo de GPV (Figura 4A). Vários estudos indicam os efeitos positivos da luz vermelha não só no acúmulo de monoterpenos, flavonóides, antocianinas e carotenóides (Yamaura *et al.*, 1991; Beggs *et al.*, 1986), mas também na transcrição de genes e ativação de enzimas (Schofield e Paliyath, 2005; Vazquez-Flota e De Luca, 1998). Em *Catharanthus roseus*, foi mostrado que a transcrição do gene e a atividade da enzima desacetoxivindolina 4-hidroxilase (D4H), envolvida na biossíntese do alcalóide indólico vindolina, eram promovidas por luz vermelha e reprimidas por luz vermelha extrema (Vasquez-Flota e De Luca, 1998). Cabe ressaltar, no entanto, que *C. roseus* é uma espécie heliófila, ao contrário de *P. leiocarpa*.

Há relatos de que nem sempre a luz vermelha estimula a biossíntese de metabólitos secundários. A chinconina é uma naftoquinona amplamente utilizada em medicamentos anti-tumorais, antiinflamatórios e de tratamento de HIV e como corante de cosméticos e alimentos. Foi constatado que a sua

biossíntese é fortemente inibida pela luz branca e azul, sendo que a luz vermelha também induz uma inibição parcial quando comparada ao controle do escuro (Liu *et al.*, 2006). Os níveis de transcritos de enzimas como a HMGR, chave para a síntese de unidades terpênicas de origem predominante citoplasmática, caíram sob luz vermelha contínua. A síntese de camptotecina, alcalóide com propriedades anti-tumorais, foi induzida por luz verde (Park *et al.*, 2003). Em tabaco, foi observado que a concentração de nicotina foi reduzida por suplementação de 5 minutos com luz vermelha extrema ao final do fotoperíodo (efeito de fim de dia), enquanto que fenóis solúveis, principalmente ácido clorogênico, apresentaram aumento de concentração (Tso *et al.*, 1970). Para o caso de alcalóides monoterpênicos indólicos como GPV, o metabolismo de fenóis é importante na produção de porções indólicas.

Após 27 dias de exposição, o filtro azul aumentou significativamente os teores de GPV em plântulas de *P. leiocarpa* (Figura 4A). Esse comprimento de onda também parece regular positivamente a síntese de outros metabólitos, como, por exemplo, antocianinas. As respostas dependentes de luz azul são mediadas por criptocromo (CRY) e linhagens de plântulas de tomate anti-senso para *CRY1* sob luz azul sofreram uma redução nos conteúdos de antocianinas (Ninu *et al.*, 1999). O mesmo ocorreu com linhagens anti-senso para este mesmo gene em *Brassica napus* (Chatterjee *et al.*, 2006).

Conclusões

No presente estudo, a fotorregulação da biossíntese de GPV em plântulas cultivadas em condições assépticas e não assépticas de *Psychotria leiocarpa* foi investigada. Os dados aqui apresentados são a seqüência experimental de estudos publicados anteriormente por nosso grupo. A luz de fato parece ser um requerimento para o acúmulo de GPV, uma vez que plântulas cultivadas na luz mantidas 14 dias no escuro contínuo apresentaram uma expressiva redução nos teores de GPV.

Em experimento no qual foi avaliada a influência do suprimento exógeno de carboidratos nos níveis de GPV de plântulas submetidas a transferências luz-escuro, pode-se observar que a biossíntese deste composto é responsiva a alterações na condição luminosa. Quando as plântulas mantidas na luz eram transferidas para o escuro, observou-se uma redução na concentração de GPV, enquanto que plântulas estioladas tenderam a aumentar este acúmulo quando expostas à luz. Esses efeitos se tornaram mais evidentes em plântulas cultivadas em meio sem sacarose, plenamente engajadas em metabolismo fotoautotrófico.

O acúmulo de GPV mostrou ser regulado por qualidade de luz. Os tratamentos de exposição à luz na faixa do azul e do vermelho-extremo aumentaram de forma consistente os teores de GPV de plântulas quando comparados ao controle transparente, sem, no entanto, alterar de forma expressiva parâmetros relacionados ao metabolismo primário, como 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.

A indução de acúmulo de GPV nas plântulas previamente mantidas no escuro em resposta ao enriquecimento com vermelho-extremo remete às respostas de fluência muito baixa (VLFs), mediadas por PhyA. Uma vez que *P. leiocarpa* cresce como sub-arbusto em áreas ricas em luz na faixa do vermelho-extremo, adaptativamente, faz sentido adequar a produção de metabólitos secundários segundo um perfil de VLFs.

Referências

Adjibade, Y.; Weniger, B.; Quirion, J.C.; Kuballa, B.; Cabalion, P.; Anton, R., 1992. Dimeric alkaloids from *Psychotria fosteriana*. *Phytochemistry*, 31, 317-319.

Beegs, C.H.J.; Wellman, E.; Grisebach, H., 1986. Photocontrol of flavonoid biosynthesis. In: Kendrick, R.E.; Kronenberg, G.H.M. eds. *Photomorphogenesis in Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, 467-449.

Beretz, A.; Roth-Georger, A.; Corre, G.; Kuballa, B.; Anton, R.; Cazenale, J.P., 1985. Polyindolinic alkaloids from *Psychotria fosteriana*. Potent inhibitors of the aggregation of human platelets. *Planta Medica*, 4, 300-303.

Both, F.L.; Meneghini, L.; Kerber, V.A.; Henriques, A.T.; Elisabetsky, E. J., 2005. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT_{2A/C} serotonin modulator. *Journal of Natural Products*, 68(3), 374-380.

Bradford, M.M., 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.

Chatterjee, M.; Sharma, P.; Khurana, J.P., 2006. Cryptochrome 1 from *Brassica napus* is up-regulated by blue light and controls hypocotyl/stem growth and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, 141, 61-74.

De Luca, V.; Brisson, N.; Balsevich, J.; Kurz, W.G.W., 1989. Regulation of vindoline biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Molecular cloning of the first and last steps in biosynthesis. In: Kurz, W.G.W., *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures II*. Springer, Berlin 154-161.

De Luca, V. e Laflamme, P., 2001. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *C. Op. Plant Biol.*, 4: 225-233.

De Luca, V. e St-Pierre, B., 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci.*, 5: 168-173.

Dillenburg, C.R. e Porto, M.L., 1985. RUBIACEAE- Tribo Psychotreae. *Boletim do Instituto de Biociências da UFRGS* 39, 1-76.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28(3): 350-356.

Elisabetsky, E.,; Amador, T.A.; Leal, M.B., et al., 1997. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of *Psychotria* alkaloids as potencial analgesics. *Ciência e Cultura*, 49, 378-385.

Facchini, P.J., 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, A.G.; Pennington, J.J.; DiCosmo, F., 1995. Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata* Sieb and Zucc. *J. Plant Physiol.*, 146: 584-590.

Ghosh, S. e Majumdar, D., 2003. Temporal variation in sugar exudation rate of hydroponically grown Pusa Basmati 1 at seedling stage. *Crop Manag. & Physiol.*, 28:46-47.

Hart, N.K.; Johns, S.R.; Lamberton, J.A.; Summons, R.E., 1974. Psychotridine, a $C_{55}H_{62}N_{10}$ alkaloid from *Psychotria beccarioides* (Rubiaceae). *Austrian Journal of Chemistry*, 27, 639-346.

Henriques, A.T.; Lopes, S.O.; Paranhos, J.T. et al., 2004. N, β -D-glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry*, 65: 449-454.

Héraut-Bron, V.; Robin, C.; Varlet-Grancher, C.; 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.

Libot, F.; Miet, C.; Kunesch, N.; Poisson, J.E.; Pusset, J.; 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.

Lin, B.L. e Yang, W.J., 1999. Blue light and abscisic acid independently induce heterophyllous switch in *Marsilea quadrifolia*. *Plant Physiol.* 119: 429-434.

Liu, Z.; Qi, J.L.; Chen, L., et al., 2006. Effect of light on gene expression and shikonin formation in cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84(1), 39-46.

Lopes, S.O., 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.

Memelink, J., Verpoorte, R., Kijne, J.W., 2001. ORCAization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* 6(5), 212-219.

Murashige, T, e Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

Ninu, L.; Ahmad, M.; Miarelli, C.; Cashmore, A.R.; Giuliano, G., 1999. Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *Plant Journal*, 18(5), 551-556.

Park, Y.G.; Kim, M.H.; Yang, J.K.; Chung, Y.G.; Choi, M.S., 2003. Light-susceptibility of camptothecin production from in vitro cultures of *Camptotheca acuminata* Decne. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(1), 32-36.

Parks, B.M. 2003. The red side of photomorphogenesis. *Plant Physiology* 133: 1437-1444.

Peer, W.A. e Langenheim, J.H., 1998. Influence of phytochrome on leaf monoterpene variation in *Satureja douglasii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26 (1): 25-34.

Rohlf, F.J. e Sokal, R.R., 1969. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco.

Roth, A.; Kuballa, B.; Bounthanh, C.; Cabalion, P.; Sévenet, T.; Beck, J.P.; Anton, R., 1986. Cytotoxic activity of polyindoline alkaloids of *Psychotria forsteriana* (Rubiaceae) (1). *Planta Medica*, 5, 450-453.

Schofield, A, e Paliyath, G., 2005. Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(12), 1052-1060.

Sheen, J.; Zhou, L.; Jang, J-C., 1999. Sugars as a signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 410-418.

Smith, L.B. e Downs, R.J., 1956. Resumo preliminar das Rubiáceas de Santa Catarina. *Sellowia*, 7, 13-86.

Sullivan, J.A. e Deng X.W. 2003. From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Developmental Biology* 260: 289-297.

Taiz, L. e Zeiger, E. 2002. Plant Physiology , 3rd edition, Sinauer, Suntherland, 690p.

Tso, T.C., Kasperbauer, M.J., Sorokin, T.P. 1970. Effect of photoperiod and end-of-day light quality on alkaloids and phenolic compounds of tobacco. Plant Physiology 45: 330-333.

Usami, T., Mochizuki, N., Kondo, M., Nishimura, M., Nagatani, A. 2004. Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. Plant Cell Physiology 45: 1798-1808.

Vazquez-Flota, F.A. e De Luca, V., 1998. Developmental and light regulation of desacetoxyvindoline 4-hydroxylase in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Physiol., 117(4): 1351-1361.

Verpoorte, R. e Maraschin, M., 2001. Engenharia do metabolismo de plantas medicinais. In: Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros. 500p.

Yamaura, T.; Tanaka, S.; Tabata, M., 1989. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in Thyme seedlings. Phytochem., 28(3): 741-744.

Yamaura, T.; Tanaka, S.; Tabata, M., 1991. Participation of phytochrome in the photoregulation of terpenoid synthesis in Thyme seedlings. Plant Cell Physiol., 32(5): 603-607.

Zhao, J.; Zhu, W.H.; Hu, Q., 2001. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. Plant Growth Regulation, 33(1), 43-49.

CAPÍTULO 2

**Antioxidant and antimutagenic properties of the crude foliar extract
and of the alkaloid psychollatine of *Psychotria umbellata* Vell. in
*Saccharomyces cerevisiae***

A ser submetido ao periódico *Mutagenesis*

**Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid
psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell.**

Variluska Fragoso^{1&}, Naíla Cannes do Nascimento^{1&}, Dinara Jaqueline Moura², Ana
Catarina Romano e Silva², Marc François Richter³, Jenifer Saffi^{2,3*}, Arthur Germano
Fett-Neto¹

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

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

³ Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil
(ULBRA), Canoas, RS, Brasil

* Corresponding author: Laboratório de Genética Toxicológica, Avenida Farroupilha
8001, Prédio 01 sala 122; Bairro São José, CEP 92425-900, Canoas, RS, Brasil.
Tel.: +55 51 34774000 ext. 2774; fax: +55 51 34779214.

E-mail address: saffi@cbiot.ufrgs.br (J. Saffi)

& These authors contributed equally to this work.

Abstract

Psychollatine is a monoterpene indole alkaloid produced and accumulated by *Psychotria umbellata* Vell. (Rubiaceae) leaves in relatively high amounts (approximately 3% of the dry weight). The alkaloid displayed opioid-like analgesic, anxiolytic, antidepressive and antipsychotic activities. In vitro assays suggested a protective role for this molecule in plant oxidative stress responses. This work reports the in vivo antioxidant properties of psychollatine and the crude foliar extract from *Psychotria umbellata*, using strains of *Saccharomyces cerevisiae* proficient and deficient in antioxidant defenses exposed to H₂O₂ and paraquat. The antimutagenic activity of *P. umbellata* and its main alkaloid were assayed in *S. cerevisiae* N123 strain in presence of H₂O₂. Moreover, the in vitro antioxidant capacity of these substances on the hydroxyl radical (OH•) were investigated, using the hypoxanthine/xanthine oxidase assay. Psychollatine and the crude foliar extract of *P. umbellata* showed protective effect against oxidative stress in yeast, acting both as antioxidant and antimutagenic agents.

Key-words: Psychollatine; *Psychotria umbellata*; oxidative stress; antimutagenicity; *Saccharomyces cerevisiae*.

Introduction

Monoterpene indole alkaloids (MIAs) represent a large and diverse class of plant alkaloids whose members occur mainly in Apocynaceae, Rubiaceae and Loganiaceae (1). Ethnobotanical and chemotaxonomical studies on species of *Psychotria*, one of the largest and more complex genus from Rubiaceae, resulted in the discovery of a set of novel bioactive MIAs, some of them with clear pharmaceutical potential (2).

Psychotria umbellata Vell. (3) is a shrub that reaches 1-3 m in height and grows in the tropical and subtropical forests of Brazil; its southern limit is the restricted region of the northernmost Atlantic Forest remnants of the state of Rio Grande do Sul. The species accumulates relatively high amounts of an unusual MIA called psychollatine (Figure 1), which has been shown to have an opioid-like analgesic effect in a dose-dependent manner, besides its anxiolytic, antidepressive, antipsychotic and amnesic effects, by modulating different neurotransmitter systems, including NMDA, opioid and serotonergic 5-HT_{2A/C} receptors (4, 5, 2).

Psychollatine is restricted to shoots and its accumulation seems to be regulated by developmental stage. The dependence on differentiated shoots for psychollatine biosynthesis could be observed in plants regenerated by somatic embryogenesis. Psychollatine was absent in rhizogenic calli but, in shoots of differentiated plants derived from these calli, the alkaloid was found in amounts equivalent to those observed in field grown individuals (6).

The most common source of free radicals of the cell in aerobic eukaryotic organisms is the respiratory chain of mitochondria, since 2 to 5% of the total oxygen undergoes an incomplete reduction that generates reactive oxygen species (ROS)

including superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals ($OH\cdot$) (7). In plants, another important source of ROS is the chloroplast (8). ROS can attack important biological macromolecules like DNA, proteins and lipid membranes. ROS toxicity, due to protein oxidation or to the production of lipid and carbohydrate derivatives that can react with protein functional groups, has been involved in development and progression of several diseases, such as cancer (9 - 12) Thus, the identification of new effective antioxidants is a topic of interest; several plant extracts or secondary metabolites have shown potential to protect against oxidant-induced damage (13, 14). Few reports have been published on antioxidant activities of the crude extracts or compounds isolated from *Psychotria* (15), especially of MIAs displaying such property. The potential protective role of psychollatine against oxidative stress was suggested by in vitro assays that showed action against singlet oxygen, superoxide and peroxide (J.T.Paranhos, V.Fragoso and A.G.Fett-Neto, in preparation).

Considering the pharmacological properties of psychollatine, the present study was undertaken with a biological model (baker's yeast) to obtain information on the antioxidant mechanism(s), antimutagenesis properties and toxicity of the alkaloid to eukaryotic cells. The properties of purified psychollatine and crude foliar extracts of *P. umbellata* were investigated both in wild type and in mutant yeast strains defective in endogenous antioxidant defense proteins.

Materials and methods

Chemicals: Psychollatine was isolated from leaves of *Psychotria umbellata* (16). Crude extracts were prepared with 1 mg of dry leaves from *P. umbellata*

extracted in 5 mL methanol (HPLC grade), mixed and sonicated for 30 min. The extracts were centrifuged at 5000 g for 10 min and the supernatant was recovered and then dried for 5 h in SpeedVac not exceeding 35 °C, preventing possible degradation. The oxidant reagents hydrogen peroxide (H₂O₂) and paraquat (methyl viologen), amino acids, nitrogenated bases, hypoxanthine, xanthine oxidase and salicylic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 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 cells treatment, stock solutions of the crude extract and alkaloid were prepared immediately prior to use. In the mutagenicity and antimutagenicity assays, dimethylsulfoxide (DMSO) was used as solvent. The appropriate concentrations were obtained by dilution of stock solution in sterile distilled water and the final concentration of DMSO in the incubation mixture never exceeded 0.2% (v/v).

***Saccharomyces cerevisiae* strains and media:** Strains of *Saccharomyces cerevisiae* employed in this study are described in Table 1. The antioxidant effects of crude extract and purified alkaloid on cellular systems were evaluated using strains of *S. cerevisiae* deficient in superoxide dismutase and/or catalase.

For mutagenic and antimutagenic assays we used the haploid strain N123, which is very responsive to H₂O₂ induced mutagenesis since it shows a low glutathione content (17). Complete liquid medium (YPD) containing 1% yeast extract, 2% bacto peptone and 2% dextrose was used for routine growth. 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 nitrogenated bases (adenine, lysine, histidine, leucine, uracil, metionine and tryptophan) at a

concentration of 2.0 mg per 100 mL MM. For mutagenic assay SC medium was supplemented with 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ canavanine. The herbicide paraquat, a redox cycling compound, was used to increase the intracellular flux of superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$). The appropriate concentrations of H_2O_2 and paraquat were determined by survival assays, according to the differential sensitivity of each strain. Sub-lethal concentrations of the oxidants were used for all subsequent experiments.

Growth inhibition (central disk assay): Stationary phase cultures of *S. cerevisiae* strains were obtained by inoculation of an isolated colony into liquid YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose). Yeast cells were diluted in PBS (phosphate buffered saline - Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 and KCl ; 20 mM; pH 7.4) to an appropriate density of $1-2 \times 10^7$ cells/mL for the growth inhibition assay. 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; growing concentration of the extracts and alkaloid (100, 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were placed on a filter-paper disk in the center of the plate and pre-incubated for 4 h at 30 °C. Afterwards, 5 μL of 30% H_2O_2 or 8 μL of paraquat (500 mM) were placed on a same filter-paper disk and incubated for two days at 30 °C. Impaired growth was measured as mm 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). Assays were repeated two times and plating for each dose was in duplicate.

Mutagenicity and antimutagenicity in vivo assay: For the mutagenicity assay, cells in a density of $1-2 \times 10^8$ cells/mL were exposed to psychollatine concentrations varying from 25 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and incubated for 1 h at 30 °C in term-mixer. For the antimutagenic assay, the same procedure was taken but cells plus

psychollatine or crude foliar extract were also exposed to oxidative mutagenic agent (H_2O_2) and then the mixture was further incubated. Suitable aliquots were plated in triplicate on solid SC with or without canavanine. Plates were incubated in the dark at 30 °C for 72 h before counting the survivors and revertant colonies. Forward mutation was measured with the canavanine resistance assay (CAN1-can1) (18) after induction with different treatments. Assays were repeated at least three times and plating for each dose was in triplicate.

Hipoxanthine/xanthine oxidase in vitro assay: The assay employed to determine antioxidant potential of purified psychollatine and crude foliar extracts of *P. umbellata* and hydroxyl radical scavenging was based on the method described by Owen et al. (19). Briefly, both the extract and pure compound were diluted 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 the specific range, starting from 0.05 mg/mL. A 5.0 μ L aliquot of xanthine oxidase (18 mU) dissolved in 3.2 M NH_4SO_4 was added to initiate the reaction. The sample tubes were incubated for 3 h at 37 °C, at which time the reaction was complete. A 30 μ L aliquot of the reaction mixture was analyzed by HPLC, using chromatographic conditions as described by Owen et al. (19). Chromatographic analyses were done using a gradient based on methanol/water/acetic acid with a μ BondaPak C18 reverse phase column (Waters) and detection at 325 nm. The HPLC equipment had a Waters 2695 separation module and 2487 UV detector. The amount of dihydroxyphenols (2,5-dihydroxybenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid) produced by hydroxyl radical ($OH\cdot$) attack on salicylic acid was determined from standard curves generated with the respective pure dihydroxyphenols. Each time point was tested with three replicates and the experiment was independently repeated twice.

Statistics: Statistical analyses of the data were performed using ANOVA One-Way and Dunnett's Multiple comparison Test. *P*-values equal or less than 0.05 were considered significant. Data were expressed as means \pm SD (standard deviation).

Results

Wild type cells (WT) and isogenic mutant strains of *S. cerevisiae* lacking antioxidant defenses (Table 1) were treated with solvent (50% DMSO) and several concentrations of the alkaloids and crude foliar extract from *Psychotria umbellata* for 1 h, during the stationary phase. After three days of incubation at 37 °C, all strains showed the same sensitivity to substances as that observed for the WT cells grown in PBS and none of the substances induced significant effects on yeast grown in the employed concentrations (data not shown). Hence, we used the non cytotoxic concentration range of alkaloid and extract from 25 to 500 $\mu\text{g/mL}$ in the following experiments in order to investigate the protective activity against oxidants in the same strains.

Central disk assay: to examine the role of psychollatine and *P. umbellata* crude foliar extract in cell oxidative stress, yeast cells during stationary phase were pre-treated with several non-cytotoxic concentrations of the alkaloid or extract for 4 h. After that, these cells were exposed for two days to sub-lethal concentrations of either H_2O_2 or paraquat, a $\text{O}_2\cdot^-$ generating compound. A higher survival rate was observed as a consequence of the antioxidant effect of the tested substances (Figure 2 and 3).

The results of the growth inhibition assay showed that psychollatine was more effective in protection of strains of *S. cerevisiae* treated with paraquat, different from

what was observed for the foliar extract of *P. umbellata*, which was more protective when the cells were treated with H₂O₂ (Figure 2 and 3). Except for the double mutant *sod1Δctt1Δ*, which was protected by psychollatine against both paraquat and H₂O₂ cytotoxicity, the *sod2Δ* and *sod1Δsod2Δ* mutants showed increased growth in almost all of the tested concentration of psychollatine in the paraquat treatment. A dose-dependent protection was not observed (Figure 2). Overall, the 250 µg/mL concentration seemed to be the most efficient concentration tested, however the 100 µg/mL dose was also protective against paraquat. For the crude foliar extract of *P. umbellata*, all tested concentrations were effective against H₂O₂ for *sod1Δ*, *ctt1Δ* and *sod1Δctt1Δ* (Figure 3). In the paraquat treatment, only the *sod2Δ* showed increased growth when the cells were pre-treated with extract, and, in this case, the 500 µg/mL dose was not effective.

Hipoxanthine/xanthine oxidase in vitro assay: the antioxidant capacity of psychollatine and crude foliar extract from *P. umbellata* was determined by monitoring the production of hydroxyl benzoic acids (DHBA) as a product of the hydroxyl radical (OH•) attack on salicylic acid in the hypoxanthine/xanthine oxidase assay. *P. umbellata* crude foliar extract and the purified psychollatine showed a pronounced antioxidant activity in a dose-dependent manner (Figure 4).

Mutagenicity and antimutagenicity in vivo assay: both psychollatine and the crude foliar extract of *P. umbellata* did not affect the survival and did not induce mutagenesis in *S. cerevisiae* N123 strain in stationary phase of growth (Table 2). To investigate the protective effects of these substances against the induced forward mutagenesis in N123 yeast strain, the cells were treated with H₂O₂ as mutagenic agent. The two highest tested concentrations of psychollatine and the 100 µg/mL

dose of the extract yielded increased cell survival and inhibited the mutagenic action of H₂O₂ (Table 3).

Discussion

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been a useful model for studies of the eukaryotic response to oxidant challenge, particularly during the stationary growth phase (11, 20). Among the natural enzymatic defense mechanism against oxidative burst, *S. cerevisiae* produces superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase, and small molecules and peptides (glutathione and thioredoxins) that detoxify ROS. Superoxide dismutases play a protective role by catalyzing the dismutation of superoxide radicals (O₂^{•-}) to hydrogen peroxide (H₂O₂). *S. cerevisiae*, like other eukaryotes, contains CuZnSOD (encoded by *SOD1* gene) in the cytosol and MnSOD (product of the gene *SOD2*) in the mitochondria (21). Catalase is an ubiquitous enzyme (22) that converts two molecules of H₂O₂ into two H₂O and O₂ (23). Two catalase isoforms from yeast, Cat1 (encoded by *CAT1* gene) and Ctt1 (encoded by *CTT1* gene) have been described (24, 25).

The results of growth inhibition assay using wild-type and isogenic strains lacking antioxidant defenses of *S. cerevisiae* showed that after the treatment with psychollatine and *P. umbellata* extract there was a decrease of the growth inhibition induced by the H₂O₂ and paraquat (Figures 2 and 3). Psychollatine significantly decreased the growth inhibition of the yeast cells showing protective effects especially when cells were challenged with paraquat. This effect is evident in strains of SOD null mutants, such as *sod1Δ*, *sod2Δ* and double mutants *sod1Δsod2Δ* and *sod1Δ ctt1Δ*. Superoxide anion has been shown to inactivate certain (4Fe-4S)

cluster-containing enzymes by oxidizing one iron atom, causing its release from the cluster (26). This process leads to both enzyme inactivation and further oxidative damage of cellular compounds, since free iron can promote, via the Fenton reaction, the formation of hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) (12). These mutants in the absence of superoxide dismutase can accumulate excess of superoxide anion and consequently free iron (27). In this case, psychollatine probably is acting as a chemical defense against superoxide radical in strains without the specific enzyme that convert this radical to a less reactive H_2O_2 molecule.

In agreement with that, in H_2O_2 treatment, the double mutant *sod1 Δ sod2 Δ* did not differ from control, but null mutants of CTT, which detoxifies H_2O_2 , seemed to be more protected by psychollatine than the other strains. However, psychollatine showed a weak protection against H_2O_2 , being more effective against the harmful effects of paraquat.

The crude foliar extract of *P. umbellata* in paraquat treatment decreased growth inhibition only in *sod2 Δ* mutant. However, under H_2O_2 exposure, the extract protected *sod1 Δ* , *ctt1 Δ* and *sod1 Δ ctt1 Δ* . Despite the fact that the extract did not protect the double mutant *sod1 Δ sod2 Δ* , for *sod1 Δ* and *sod2 Δ* mutants there seems to be a certain prevalence of extract protection against H_2O_2 rather than paraquat, perhaps related to SOD1 and SOD2 subcellular localization and/or extract uptake by cells. The 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose seemed to be the most efficient concentration of extract tested, followed by the 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose.

The capacity of alkaloid and crude extract to scavenge $\text{OH}\cdot$ radicals was confirmed in the in vitro hypoxanthine/xantine oxidase assay (Figure 4). The extract showed a notable in vitro $\text{OH}\cdot$ scavenging activity and was apparently more

protective against H₂O₂ damages than psychollatine in *S. cerevisiae* (Figure 2 and 3). It is known that *P. umbellata* leaves have about 2.3 mg of total flavonoids / g of dry weight (L.R.Correa and A.G.Fett-Neto, personal communication), and these substances can improve antioxidant properties of the extract (28). Moreover, it is possible that psychollatine acts more as a O₂•⁻ scavenger than as a H₂O₂ scavenger. The possible protective role of psychollatine against ROS may be explained by the presence of two secondary amines, double bonds and the glucose residue in its structure (Figure 1) (29).

As previously pointed out, DNA can be a target of ROS action. Oxidative lesions in DNA include base modifications, sugar damage, strand breaks and abasic site formation. Antimutagenic activity of substances derived from plants may be due to a variety of mechanisms such as inhibition of genotoxic effects, signal transduction modulation, antioxidant activity and scavenging of free radicals (30, 31). To test the protecting action of *P. umbellata* foliar extract and psychollatine on H₂O₂-induced mutagenesis we used the N123 strain of *S. cerevisiae*. Both the extract and alkaloid showed a pronounced antimutagenic effect at higher concentrations (Table 3). Interestingly, these same doses have shown to be efficient against paraquat and H₂O₂-induced stress in the central disc assay. The antioxidant activity and OH• scavenging activity may contribute to the antimutagenic effect.

These findings suggest new pharmacological properties for psychollatine and the leaf extract of *P. umbellata*.

Funding

Research Grant from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* – number 350254/1997-4). Student bursaries from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES - *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*) and CNPq.

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.

References

1. O'Connor, S.E. and Maresh, J.J. (2006) Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. Nat. Prod. Rep., **23**(4), 532-547.
2. Pasquali, G., Porto, D.D. and Fett-Neto, A.G. (2006) Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. J. Biosc. Bioeng., **101**(4), 287-96.
3. Smith, L.B. and Downs, R.J. (1956) Resumo preliminar das Rubiáceas de Santa Catarina. Sellowia, **7**, 13-86.
4. Both, F.L., Meneghini, L., Kerber, V.A., Henriques, A.T. and Elisabetsky, E. J. (2005) Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT_{2A/C} serotonin modulator. J. Nat. Prod., **68**(3), 374-380.

5. Both, F.L., Meneghini, L., Kerber, V.A., Henriques, A.T. and Elisabetsky, E. J. (2006) Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the indole alkaloid psychollatine. J. Nat. Prod., **69**(3), 342-345.
6. Paranhos, J.T., Fragoso, V., Henriques, A.T., Ferreira, A.G. and Fett-Neto, A.G. (2005) Regeneration of *Psychotria umbellata* and production of the analgesic indole alkaloid umbellatine. Tree Phys., **25**, 251-255.
7. Boveris, A. (1998) Biochemistry of free radicals; from electrons to tissues. Medicina, **58**, 350-356.
8. Edreva, A. (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. Agric. Ecosyst. Environ., **106**, 119-133.
9. Stadtman, E.R. and Berlett, B.S. (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. Chem. Res. Toxicol., **10**, 485-494.
10. Wiseman, H. and 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.
11. 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 Radic. Biol. Med., **34**(3), 385-393.
12. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2000) Free Radic. Biol. Med., 3rd edn. Oxford University Press, New York.
13. Zhang, W., Guo, Y.W. and Gu, Y. (2006) Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: chemistry and biological activity. Curr. Med. Chem., **13**(17), 2041-90.

14. Borek, C. (2001) Antioxidant health effects of aged garlic extract. J. Nutrit., **131**(3S), 1010S-5S.
15. Saha, K., Lajis, N.H., Israf, D.A., Hamzah, A.S., Khozirah, S., Khamis, S. and Syahida, A. (2004) Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. J. Ethnopharmacol., **92**(2-3), 263-267.
16. Both, F.L., Kerber, V.A., Henriques, A.T. and Elisabetsky, E. (2002) Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. Pharm. Biol., **40**, 336-341.
17. Brendel, M., Grey, M., Maris, A., Hietkamp, J., Fesus, Z., Pich, C., Dafré, L., Schmidt, M., Eckardt-Schupp, F. and Henriques, J.A.P. (1998) Low glutathione pools in the original *pso3* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. Curr. Genet., **33**(1), 4-9.
18. Whelan, W.L., Gocke, E. and Manney, T.R. (1979) The CAN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine-structure analysis and forward mutation rates. Genet., **91**, 35-51.
19. 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. Eur. J. Cancer Prev., **5**(4), 233-240.
20. Longo, V.D., Gralla, E.B. and Valentine, J.S. (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., **271**(21), 12275-12280.
21. Jamieson, D.J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, **14**, 1511-1527.

22. 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 Radic. Biol. Med., **17**(3), 235-248.
23. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev., **59**(3), 527-605.
24. Cohen, G., Rapatz, W. and Ruis, H. (1988) Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. Eur. J. Biochem., **176**(1), 159-63.
25. Hartig, A. and Ruis, H. (1986) Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. Eur. J. Biochem., **160**(3), 487-90.
26. Liochev, S.I. and Fridovich, I. (1994) The role of $O_2^{\cdot-}$ in the production of OH^{\cdot} : in vitro and in vivo. Free Radic. Biol. Med., **16**(1), 29-33.
27. 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. J. Biol. Chem., **275**, 11645-11649.
28. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med., **20**, 933-956.
29. Gregianini, T.S., Da 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. Photochem. Photobiol., **78**(5), 470-474.

30. Mantle, D., Lennard, T.W. and Pickering, A.T. (2000) Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. Adv. Drug React. Toxicol. Rev., **19**, 223-240.
31. DeFlora, S., Bennicelli, C. and Bagnasco, M. (1999) Rationale and mechanisms of cancer chemoprevention. Rec. Res. Cancer Res., **151**, 29-44.

Legend of Figures

Fig. 1. Chemical structure of the monoterpene indole alkaloid psychollatine. Glc – glucose residue.

Fig. 2. Central Disc Assay. Growth inhibition (mm) of different *Saccharomyces cerevisiae* strains exposed to paraquat and hydrogen peroxide, previously treated for 4 hours at 30 °C with different psychollatine concentrations. Bars (means \pm S.D.) with significant differences in comparison with oxidative agent control are indicated by asterisks (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$).

Fig. 3. Central Disc Assay. Growth inhibition (mm) of different *Saccharomyces cerevisiae* strains exposed to paraquat and hydrogen peroxide, previously treated for 4 hours at 30 °C with different concentrations of *P. umbellata* crude foliar extract. Bars (means \pm S.D.) with significant differences in comparison with oxidative agent control are indicated by asterisks (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$).

Fig. 4. Inhibition of the generation of reactive oxygen species by negative control, hexane solvent (●), crude foliar extract from *P. umbellata* (■) and psychollatine (▲) in hypoxanthine/xanthine oxidase system. Data points are means \pm S.D.

Table 1. Strains of *Saccharomyces cerevisiae* used in this study.

Strain	Genotype	Source
EG103 (SOD-WT)	<i>MATα leu2-3 112his3-Δ1 trp1-289 ura3-52</i>	E. Gralla*
EG118 (<i>sod1Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3</i>	E. Gralla
EG110 (<i>sod2Δ</i>)	like EG103, except <i>sod2::TRP1</i>	E. Gralla
EG133 (<i>sod1Δ sod2Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3</i> and <i>sod2::TRP1</i>	E. Gralla
EG223 (<i>ctt1Δ</i>)	like EG103, except <i>ctt1::TRP1</i>	E. Gralla
EG (<i>sod1Δ ctt1Δ</i>)	like EG103, except <i>sod1::URA3</i> and <i>ctt1::TRP1</i>	E. Gralla
N123	<i>MATα his1-7</i>	J. Henriques**

* Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles, USA 90024-1569.

** Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil 91501-970.

Table 2. Induction of mutation in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with psychollatine or crude foliar extract from *Psychotria umbellata* in the stationary phase in PBS.

Agent	Treatment	Survival (%)	Can/10 ⁷ survival ^a
Solvent ^b		100	1.40 ± 0.08 ^d
H ₂ O ₂ ^c		52.25*	12.59 ± 0.84*
Psychollatine	25 µg/mL	85.24	1.38 ± 0.24
	50 µg/mL	86.51	1.09 ± 0.47
	100 µg/mL	88.22	1.67 ± 0.71
	250 µg/mL	87.89	1.44 ± 0.34
<i>P. umbellata</i> extract	25 µg/mL	72.96	1.58 ± 0.36
	50 µg/mL	87.64	1.96 ± 0.26
	100 µg/mL	91.49	2.07 ± 0.36
	250 µg/mL	87.19	2.31 ± 0.82

^a Locus-specific revertants; ^b Negative Control (solvent 50% DMSO); ^c Positive control (hydrogen peroxide); ^d Mean and standard deviation for three independent experiments; Data significant in relation to negative control (solvent) group at **P* ≤ 0.001/ One-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test.

Table 3. Effects of psychollatine and crude foliar extract from *Psychotria umbellata* on induced mutagenicity by hydrogen peroxide (H₂O₂) in haploid N123 strain of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase in PBS.

Agent	Treatment	Survival (%)	Can/10 ⁷ survival ^a
Solvent ^b		100	1.40 ± 0.08 ^d
H ₂ O ₂ ^c		45.95	12.59 ± 2.51
Psychollatine	25 µg/mL + H ₂ O ₂	54.44	11.76 ± 1.49
	50 µg/mL + H ₂ O ₂	59.27	10.64 ± 1.49
	100 µg/mL + H ₂ O ₂	68.18	6.07 ± 0.88**
	250 µg/mL + H ₂ O ₂	72.43*	6.01 ± 1.61**
<i>P. umbellata</i> extract	25 µg/mL + H ₂ O ₂	61.49	11.20 ± 0.25
	50 µg/mL + H ₂ O ₂	64.28	11.69 ± 3.12
	100 µg/mL + H ₂ O ₂	78.53*	6.92 ± 1.66**
	250 µg/mL + H ₂ O ₂	72.25*	9.23 ± 1.39

^a Locus-specific revertant; ^b Negative Control (solvent 50% DMSO); ^c Positive control (hydrogen peroxide); ^d Mean and standard deviation for three independent experiments; Data significant in relation to positive control group at * $P \leq 0.01$; ** $P \leq 0.001$ / One-way ANOVA Dunnett's Multiple Comparison Test.

Figure 1.

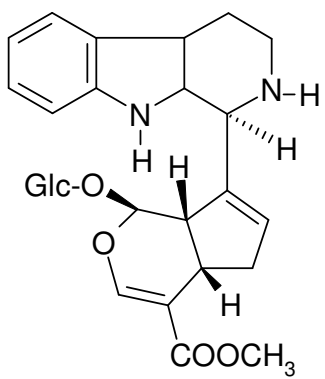


Figure 2.

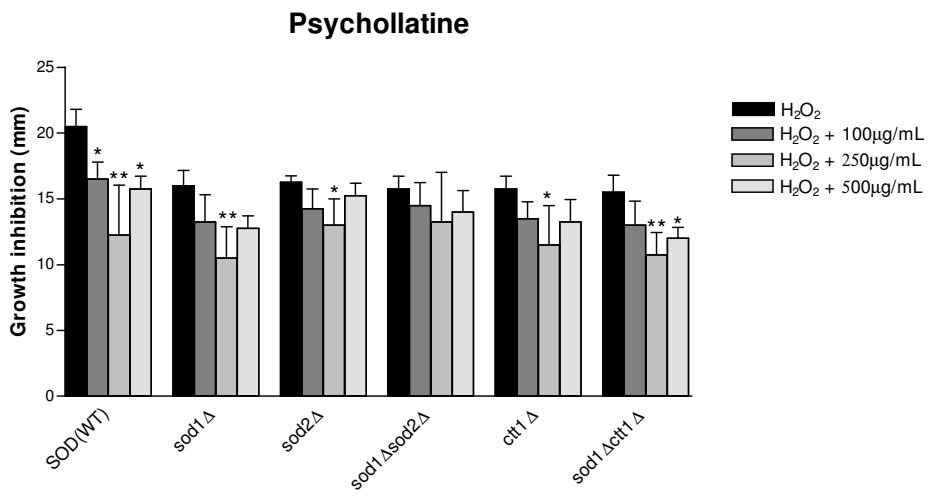
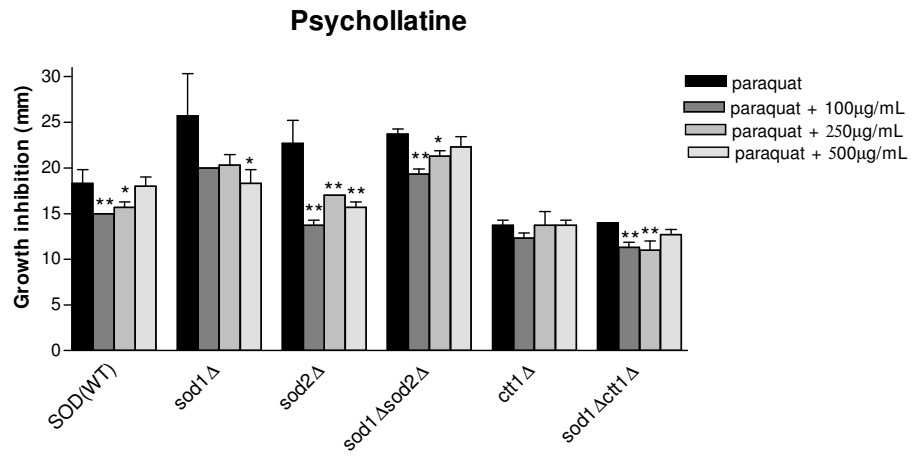


Figure 3.

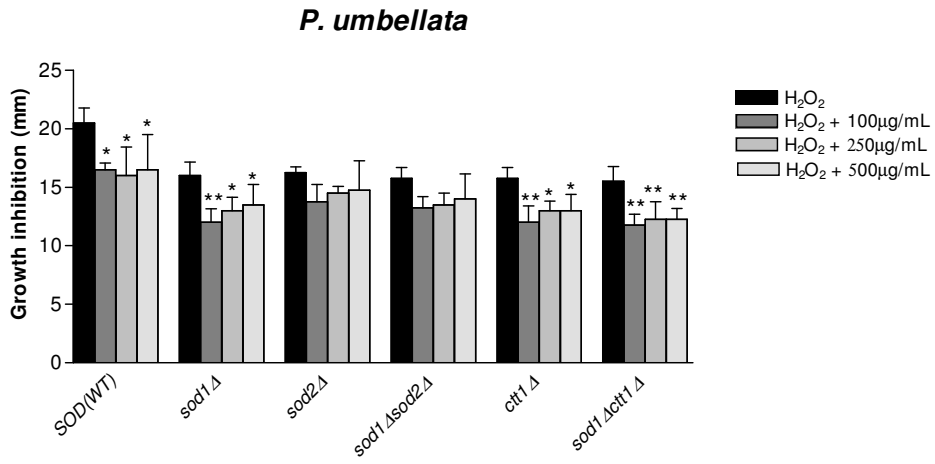
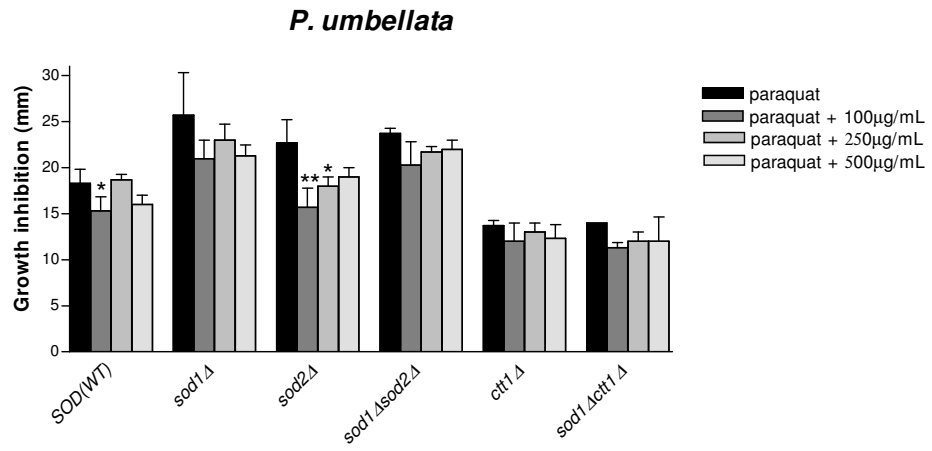
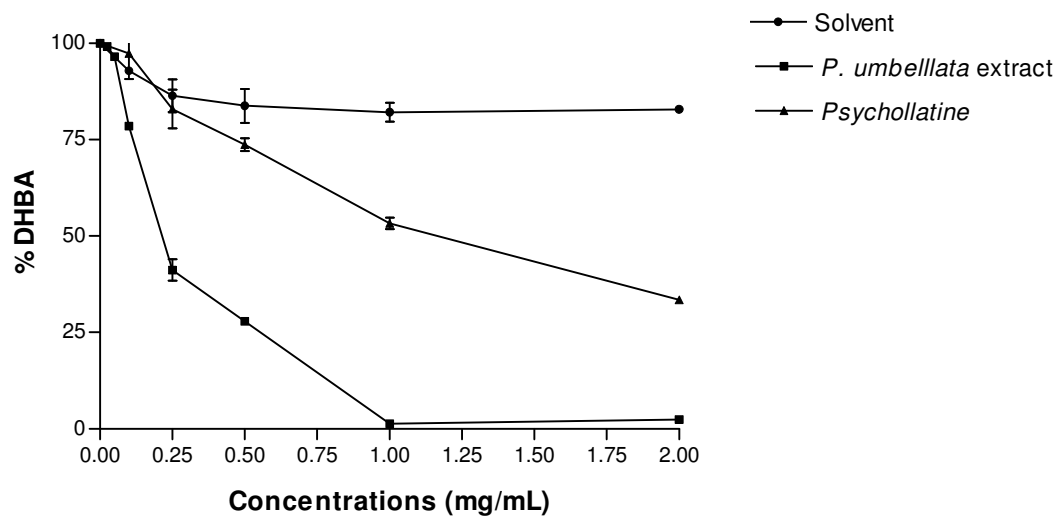


Figure 4.



CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O acúmulo de *N*, β-D-glicopiranosilvincosamida (GPV) em *Psychotria leiocarpa* é responsivo a transferências luz-escuro. Plântulas crescidas em condições assépticas cultivadas sem sacarose e na luz, quando transferidas para o escuro contínuo, em 14 dias após transferência, tiveram seus conteúdos reduzidos em cerca de cinco vezes. Paralelamente, plântulas germinadas na luz que foram submetidas a uma indução de estiolamento por 25 dias, após 14 dias de cultivo na luz, apresentaram um aumento significativo nos teores acumulados de GPV. Os efeitos repressor do escuro e indutor da luz nas transferências foram mais evidentes em plântulas cultivadas sem sacarose, apesar da nítida tendência de comportamento semelhante nas plântulas cultivadas em meio com 1,5% de sacarose.

O acúmulo de GPV é temporalmente controlado, sendo que sua concentração na plântula aumenta ao longo do tempo. O acúmulo de GPV é afetado por diferentes faixas de luz, havendo uma aparente atuação conjunta de diferentes sistemas fotorreceptores. As faixas de luz do azul e do vermelho-extremo regulam positivamente a produção deste alcalóide. O padrão de resposta à luz na faixa do vermelho/vermelho-extremo parece corresponder aos padrões de VLFRs, mediadas por PhyA e sem fotorreversibilidade. Este perfil está de acordo com o esperado para estrato arbustivo de sub-bosque umbrófilo ocupado por *P leiocarpa*.

Tanto o extrato bruto foliar de *Psychotria umbellata* quanto o alcalóide purificado psicolatina reduziram significativamente a inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* submetida a estresse oxidativo gerado por H₂O₂ e

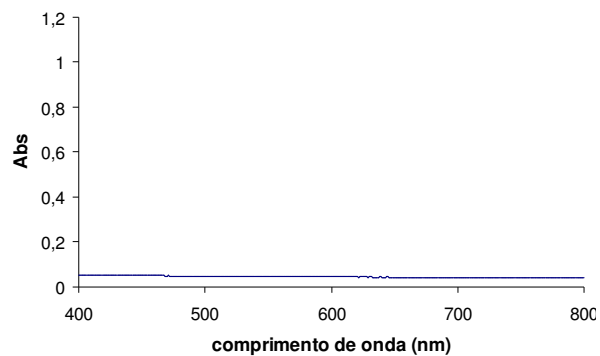
paraquat. Essa atividade antioxidante também foi comprovada em ensaio *in vitro*, no qual o extrato foliar e psicolatina revelaram-se eficientes agentes antioxidantes para o radical hidroxila.

O crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* não é afetado pelo extrato foliar de *P. umbellata* nem por psicolatina, sendo que estas substâncias não apresentaram toxicidade. Os índices de mutagênese induzida por H₂O₂ foram significativamente reduzidos na presença de psicolatina e de extrato de *P. umbellata*, e, devido aos altos teores de psicolatina encontrados em folhas desta espécie, as concentrações que apresentaram ação antimutagênica do extrato foram similares às de psicolatina purificada. De forma geral, os resultados indicam novas propriedades para psicolatina e *P. umbellata*, com potencial nas aplicações farmacêuticas de protetores solares, cosméticos e antioxidantes.

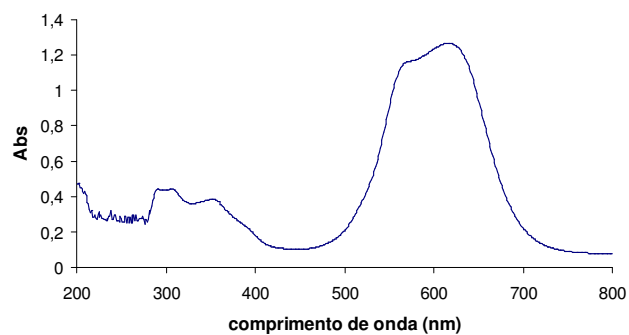
ANEXOS

Espectros de absorvância dos filtros utilizados

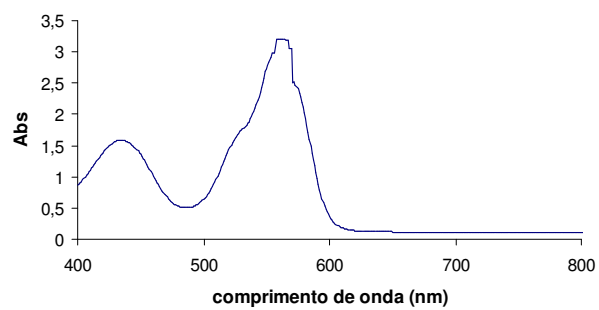
Transparente



Azul



Vermelho



Vermelho-extremo

