

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

Nathalia Luiza Andreazza

**TRANSPORTE DE PILOCARPINA EM
SUSPENSÕES CELULARES DE *Pilocarpus microphyllus***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
NATHALIA LUIZA ANDREAZZA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a
obtenção do Título de Mestre em Biologia
Vegetal, na área de Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof.^o Dr. Paulo Mazzafera

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

An25t Andreazza, Nathalia Luiza
 Transporte de pilocarpina em suspensões celulares de
 Pilocarpus microphyllus / Nathalia Luiza Andreazza. –
 Campinas, SP: [s.n.], 2009.

 Orientador: Paulo Mazzafera.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas, Instituto de Biologia.

 1. *Pilocarpus*. 2. Pilocarpina. 3. Proteínas ABC. 4.
 Suspensões celulares. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
 III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Transport of pilocarpine in cell suspension culture of *Pilocarpus*.

Palavras-chave em inglês: *Pilocarpus*; Pilocarpine; ABC proteins; Cell suspension culture.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Paulo Mazzafera, Marcos José Salvador, Maria Cláudia Marx Young.

Data da defesa: 17/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

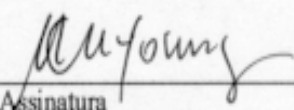
Campinas, 17 de março de 2009.

BANCA EXAMINADORA

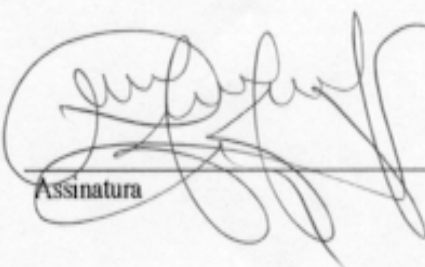
Prof.^o Dr. Paulo Mazzafera


Assinatura

Prof.^o Dr. Marcos José Salvador


Assinatura

Prof.^a Dra. Maria Cláudia Marx Young


Assinatura

Prof.^a Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya


Assinatura

Prof.^o Dr. Rodrigo Catharino Ramos


Assinatura

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Ao meu irmão,

À Saon, com muito amor

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.^o Dr. Paulo Mazzafera pela valiosa orientação, amizade e confiança que contribuíram para minha formação e bom desempenho deste trabalho.

À Dra. Ilka Nacif de Abreu pela co-orientação e disposição durante o andamento da pesquisa.

À Dra. Alexandra C.H.F. Sawaya, ao Dr. Rodrigo Catharino e ao Prof.^o Dr. Marcos N. Eberlin do Instituto de Química - Laboratório Thomson de Espectrometria de Massa pelas análises no espectrômetro de massas.

Aos Professores Doutores Ladaslav Sodek e Marcos Salvador e ao Dr. Marcelo Murai pela avaliação e críticas deferidas durante a Qualificação.

Ao Prof.^o Dr. Marcelo Carnier Dornelas e à Juliana Cazoto por apresentar e ensinar as técnicas de microscopia óptica.

À Prof.^a Dra. Marília de Moraes Castro e à Poliana Ramos Cardoso por apresentar e ensinar as técnicas de histoquímicas.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo apoio técnico e pela amizade.

A todos os colegas e amigos de laboratório, pela ajuda, amizade e por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis.

À Luciana B. Benatti e Nathalia Lucci pela imensa amizade e companherismo.

Aos amigos e companheiros de moradia: Fernanda Macieira, Lilian Cardoso, Fabiana Choi, Rafael Le-Senechal e Danilo Cunha pela amizade e paciência.

Aos grandes amigos Maria Carolina Ribeiro, Marcos Degrossoli, Rodolfo Gimenez, Rafael Faria, André Gonçalves e Alexandre Carvalho pelos bons momentos.

Ao Saon Crispim Vieira pelo amor, incentivo e compreensão.

À minha família, em especial aos meus pais Antônio Carlos Andreazza e Elisabeth Aparecida Lodo e ao meu irmão Rodolfo Luiz Andreazza pelo apoio incondicional.

Aos senhores membros da banca examinadora, pelo aceite e indispensáveis contribuições para este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

E a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Muitíssimo obrigada

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
ÍNDICE	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
Material Vegetal	14
Reagentes	14
Manutenção das culturas e montagem dos ensaios.....	14
Extração e quantificação de pilocarpina e pilosina.....	15
Toxicidade da pilocarpina a diferentes suspensões celulares	16
Localização subcelular da pilocarpina por centrifugação diferencial.....	16
Testes histoquímicos.....	17
Absorção de pilocarpina exógena pelas suspensões	18
Marcha de absorção de pilocarpina	19
Inibição de proteínas de transporte	19
Inibição por dose dependência.....	20
Inibição com variação pH do meio de cultura	21
Cinética de inibição	22
Curva de crescimento celular na presença dos inibidores	22
Análises estatísticas	23
RESULTADOS	23
Toxicidade à pilocarpina.....	24
Fracionamento celular.....	25
Testes histoquímicos.....	26
Absorção de pilocarpina exógena em função do pH do meio de cultura	28
Marcha de absorção de pilocarpina	31
Inibição da absorção e liberação de pilocarpina	33
Inibição da absorção e liberação de pilocarpina em função do pH do meio de cultura.....	37
Cinética de inibição	41
Curva de crescimento na presença de inibidores	43
DISCUSSÃO	44
Localização subcelular e citotoxicidade da pilocarpina	45
Caracterização do transporte de pilocarpina nas suspensões de <i>Pilocarpus microphyllus</i> ...	48
<i>Absorção de pilocarpina e influência do pH</i>	49
<i>Inibição das proteínas de transporte transmembrana</i>	51
<i>Cinética de inibição</i>	55
Considerações finais	56
LITERATURA CITADA	57
ANEXOS	69

RESUMO

A pilocarpina é um alcalóide imidazólico, que possui como única fonte natural espécies do gênero *Pilocarpus*. Este alcalóide é utilizado no tratamento de glaucoma e xerostomia. O elevado custo de folhas de *Pilocarpus microphyllus* no mercado internacional e conseqüente extrativismo predatório resultaram na sua inclusão na lista de espécies em extinção do IBAMA. Na busca de fontes alternativas do alcalóide conseguiu-se demonstrar que suspensões celulares desta espécie podem ser um modelo para produção e estudo da biossíntese e do transporte de pilocarpina, uma vez que produz os mesmos alcalóides encontrados nas folhas. A extração de pilocarpina a partir do meio de cultura poderá minimizar a quantidade de solventes altamente poluentes utilizados na extração deste alcalóide a partir das células, assim como, reduzir a contaminação por outros constituintes celulares. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo inicial determinar o local e limite de acúmulo intracelular de pilocarpina e verificar se o fornecimento externo de altas doses do alcalóide causaria toxidez às células produtoras e não produtoras de pilocarpina. Em seguida, caracterizar a absorção do alcalóide pelas células submetidas a diferentes valores de pH do meio de cultura e também identificar o mecanismo de transporte do alcalóide nas suspensões procurando definir qual é a proteína de membrana responsável pelo transporte de pilocarpina entre células e meio de cultura através do uso de inibidores de transportadores da família das ATPases e ATP-binding cassette proteins (ABC).

Os testes histoquímicos e o ensaio de fracionamento celular, apesar de não conclusivos, indicaram o acúmulo de pilocarpina no vacúolo, ainda que a fração correspondente a essa organela venha misturada com o conteúdo do citoplasma. As informações sobre a localização subcelular em adição aos dados de toxicidade mostraram que pilocarpina apresenta forte citotoxicidade a cultura de plantas que não apresentam sua via de

biossíntese. Culturas de *P. microphyllus* produtoras de pilocarpina apresentaram uma clara tolerância às altas doses do alcalóide (crescimento semelhante ao controle), mesmo que não produzindo o alcalóide em altas quantidades. Isto sugere a existência de um mecanismo de detoxificação específico-específico nas células aqui estudadas, que evitam a toxicidade de seus alcalóides (pilocarpina e pilosina) armazenando-os no vacúolo. Nos ensaios de absorção do alcalóide em diferentes valores de pH, observou-se que quanto maior o pH, menor a absorção do alcalóide. Nos ensaios com os inibidores de proteínas transportadoras de membrana verificou-se que as menores taxas de inibição na absorção e liberação provocadas por inibidores específicos de ATPases, a bafilomicina e pelo NH_4Cl , não descartam a participação destas proteínas, mas podem indicar uma menor participação, visto que a inibição provocada pela azida sódica, também um inibidor de ATPases, foi muito intensa. Contudo, os resultados de absorção e liberação de pilocarpina mostraram intensa inibição na presença dos inibidores de ABCs o que aponta para um transporte de pilocarpina mediado por esta família de proteínas, tanto para fora como para dentro da célula. Por fim, os ensaios de cinética apontam para uma inibição do tipo competitiva gerada pelos dois inibidores utilizados, sendo que os menores valores da Constante de Inibição (K_i), encontrados para a nifedipina indicam que este composto possui uma ação inibitória mais intensa que o vanadato de sódio.

SUMMARY

Leaves of species from *Pilocarpus* genus are the only known source of pilocarpine, an imidazole alkaloid, which has been used for the treatment of glaucoma and xerostomy. Because the leaves of jaborandi are collected from plants living in the wild and the high price of pilocarpine in the international market, jaborandi was included in the endangered species list of IBAMA. Looking for alternative sources of this alkaloid, it has been shown that cell suspension cultures of *Pilocarpus microphyllus* can be a model to study the production of pilocarpine as well as a model to study its biosynthesis and metabolism, as it produces the same alkaloids that are found in leaves. Previous studies showed that high concentrations of nitrogen and the medium pH resulted in higher production and release of pilocarpine to the medium culture. Therefore, the objective of this study was to define the cell intracellular accumulation of pilocarpine and verify if exogenous by supplied pilocarpine to jaborandi cell suspensions is toxic to the cells. Moreover, the absorption of pilocarpine by cells treated with exogenous by supplied pilocarpine at different medium pH, as well as, the alkaloid transport mechanism through the cell membrane, using inhibitors of the protein families ATPases and ATP-Binding Cassette, were studied. The histochemical tests and the cell fractionation assays showed the accumulation of pilocarpine in the vacuole. This, together with the results of experiments that showed that pilocarpine was not toxic to jaborandi cells, suggests that vacuolar transport may be one of the mechanisms for the detoxification of pilocarpine in this species.

In the absorption assays with different medium pH, the higher the pH, the lower absorption of pilocarpine by the cells. Bafilomicin and NH_4Cl , which are ATPase inhibitors, were the least effective inhibitors among all the inhibitors tested for absorption and release of pilocarpine. This result does not discard the participation of these proteins in the process but

indicate that they are less important, in view of the fact that inhibition by sodium azide which affects both ABC and ATPases, was very effective. The results on absorption and release of pilocarpine by the jaborandi cells showed strong inhibition by specific ABC inhibitors, which indicates an important participation of this protein family in the transport of the alkaloid through the cell membranes. Kinetics assays showed that inhibition was a reversible competitive type in the presence of nifedipine and sodium vanadate. The lowest Inhibition Constant (K_i) was observed for nifepidine.

INTRODUÇÃO

Pilocarpus, da família Rutaceae, é o gênero de espécies popularmente conhecidas como jaborandi. Este gênero possui 18 espécies descritas para o Brasil, de acordo com Joseph (1967), ou somente 10 espécies, de acordo com Kaastra (1982), que podem ser encontradas por todo o território brasileiro, principalmente na região Leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste (Marques & Costa, 1994).

Todas as espécies apresentam concentrações variadas do alcalóide pilocarpina, entretanto, *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes e *Pilocarpus jaborandi* Holmes se destacam economicamente por conterem os maiores teores do alcalóide e apresentarem ampla distribuição geográfica, sendo encontradas no Pará, Maranhão, Piauí, Pernambuco e Ceará (Joseph, 1967; Kaastra, 1982).

Estas espécies são plantas arbustivas bastante ramificadas de porte baixo a médio, variando entre 2 a 3 metros altura (Marques & Costa, 1994). É nas folhas que se encontram os maiores teores de pilocarpina, cerca de 0,5 a 1,0% em relação a sua massa seca (Souza *et al.*, 1991).

Em estudos sobre a composição alcaloídica do jaborandi foram identificados outros 11 alcalóides imidazólicos (Figura 1) como a, pilosinina (2), anidropilosina (6) e 3-nor-8(11)-dihidropilocarpina (1), (Link *et al.*, 1972, 1974, Voigtlander *et al.*, 1978, Andrade-Neto *et al.*, 1996, Abreu *et al.*, 2007a). Acredita-se que estes alcalóides estejam envolvidos em diferentes rotas biossintéticas na formação de pilocarpina e da pilosina. O extrato foliar também apresenta entre 0,24% e 0,38% de óleo essencial, caracterizado por seu odor de bálsamo (Merk, 1983). A pilocarpina e isopilocarpina são usualmente isoladas como óleos viscosos sem cor, no entanto, na forma de sais são sólidos higroscópicos.

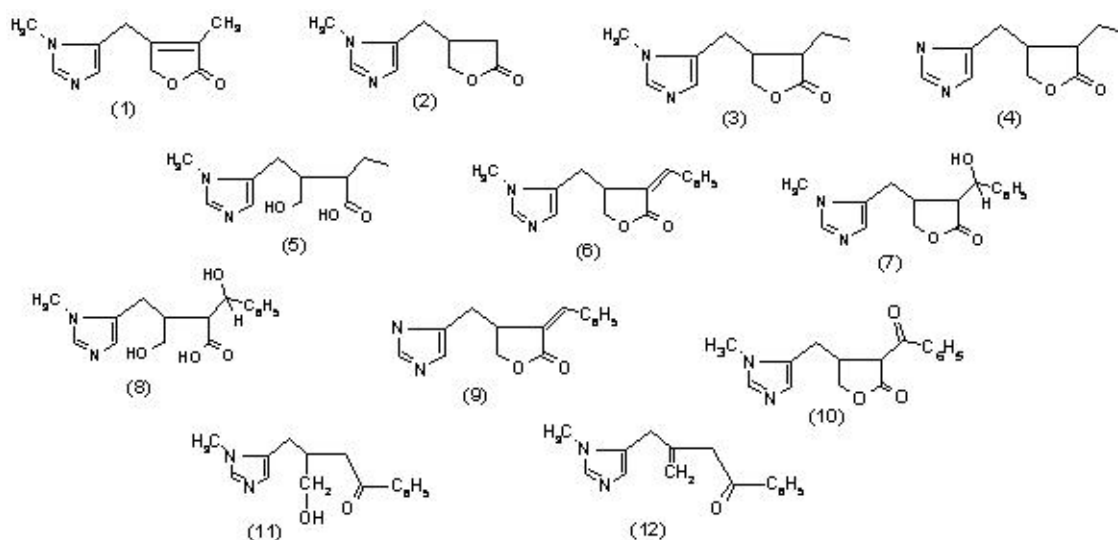


Figura 1. Alcalóides imidazólicos presentes no extrato foliar de *Pilocarpus microphyllus*: 1) 13-nor-8(11)-diidropilocarpina; 2) Pilosinina; 3) Pilocarpina; 4) Pilocarpidina; 5) Ácido Pilocárpico; 6) anidropilosina; 7) Pilosina; 8) Ácido Piloturínico; 9, 10, 11 e 12 - alcalóides inéditos

A pilocarpina foi descoberta em 1875 por Hardy e isolada em 1898 por Felter & Lloyd, entretanto, sua estrutura foi elucidada muitos anos depois (Link & Bernauer, 1972; Link *et al.*, 1974; Tedeschi *et al.*, 1974) e deste então poucos estudos foram feitos acerca deste alcalóide.

Entre os principais estudos destacam-se aqueles que se dedicam a elucidar suas propriedades farmacológicas, sendo a principal delas a diminuição da pressão intra-ocular e assim a sua utilização no tratamento de glaucoma (Webster *et al.*, 1993, Midgal, 2000). Geralmente é mais bem tolerada que os anticolinesterásicos e constitui o agente colinérgico padrão no tratamento inicial do glaucoma de ângulo aberto (Beasley & Fraunfelder, 1979). A ação miótica da pilocarpina é útil para corrigir a midríase produzida pela atropina. A pilocarpina é também empregada para impedir a formação de aderências entre íris e cristalino (Taylor, 1991) e permite a realização de medições oftalmológicas (Laibovitz *et al.*, 1996). Atualmente, alguns beta-bloqueadores, análogos sintéticos da pilocarpina passaram a ser utilizados, mas ela ainda continua sendo a substância mais utilizada no tratamento de glaucoma (Kass, *et al.*, 2002).

Este alcalóide também é estimulante de glândulas sudoríparas, lacrimais e salivares, atuando sobre as terminações nervosas das células secretoras no sistema nervoso parassimpático (Wynn, 1996). Em 1994 o uso da pilocarpina na forma oral foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) norte-americana para o tratamento de xerostomia de pós-irradiação (boca seca) em pacientes com câncer de cabeça e de pescoço, após vários estudos provando sua eficiência no estímulo para a produção de saliva (Hill & Barcza, 1966; Rieke *et al.*, 1995; Wynn 1996; Aromdee *et al.*, 1996; Saad *et al.*, 2000; Davies, 2001).

Algumas pesquisas ainda reportaram que a pilocarpina estimula o crescimento do cabelo é por isso é incorporada em algumas loções capilares (Swan, 1967; Oliveira & Akissue, 1989). Em dermatologia é usada como modificador da pele (Oliveira & Akissue, 1989). Cabe, no entanto, ressaltar que também pode apresentar vários efeitos adversos como miose, dor de cabeça, náusea, vômito, diarreia e edema pulmonar, e a administração de doses baixas pode causar diaforese intensa (Kushnick *et al.*, 1996).

As principais preparações de pilocarpina são as soluções oftalmológicas, nas quais o alcalóide está presente na forma de cloreto ou nitrato de pilocarpina em concentrações que variam de 0,25-10% (Taylor, 1991).

Já a pilosina, também encontrada em quantidades elevadas nas folhas de *P. microphyllus* (Abreu *et al.*, 2007a), foi isolada e identificada por Voigtlander *et al.* (1978). Estudos realizados em colaboração com a Faculdade de Medicina da Unicamp (Dr. Stephen Hyslop) mostraram que este alcalóide possui propriedades anti-acetilcolinérgicas e semelhantes a da pilocarpina, contudo age através de um mecanismo de ação diferente denominado mecano-recepção (Ilka Nacif Abreu, dados não publicados).

Como as únicas fontes naturais destes alcalóides são espécies do gênero *Pilocarpus* de ocorrência somente no território brasileiro, a pilocarpina hidroclorada é um dos alcalóides parasimpatomiméticos e mióticos mais caros e chega a movimentar anualmente cerca de US\$

400 milhões (Carvalho, 2004). Sendo assim, em função do elevado preço do quilo das folhas secas (US\$ 4,00), a expansão do mercado de pilocarpina nos últimos trinta anos, provocou o crescimento descontrolado no extrativismo de folhas de jaborandi, principalmente da espécie *P. microphyllus*, considerada como sendo o “jaborandi legítimo” ou “jaborandi do Maranhão”, devido a sua maior ocorrência neste Estado (Corrêa, 1969). Este processo conduziu ao quase esgotamento das populações naturais, o que resultou na sua inclusão na lista do IBAMA de plantas brasileiras sob risco de extinção (IBAMA, 1992).

Paralelamente à pressão sobre as populações naturais, acelerou-se o processo de domesticação e privatização da espécie pela indústria farmacêutica alemã Merck (SUDEMA, 1970) em fazendas localizadas no Estado do Maranhão implantadas por ela a partir de 1969 até 1999, período em que se chegou a coletar cerca de 4000 kg de folhas por hectare/ano (Vieira, 1999). A Merck detém o monopólio da compra de folhas de jaborandi resultantes do extrativismo, assim como o da sua produção. Atualmente a produção gira em torno de 1.400 kg de folhas por hectare/ano. Em 2002, a Merck concedeu à empresa brasileira Centroflora (Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda., antiga Vegetex-Merck) o direito de realizar a extração da pilocarpina, mas ainda é responsável pela purificação e comercialização do alcalóide (www.centroflora.com.br; Pinheiro, 1997).

Frente à grande importância econômica e farmacológica do jaborandi e na ausência de informações na literatura sobre aspectos fisiológicos e bioquímicos da pilocarpina na planta, deu-se início na Unicamp a diversos estudos com a espécie *P. microphyllus*. Entre eles podemos destacar os trabalhos de: indução da produção de pilocarpina em folhas de jaborandi por ácido salicílico e metiljasmonato (Avancine *et al.*, 2003), regulação da produção de pilocarpina em calos de *P. microphyllus* (Abreu *et al.*, 2005), diversidade genética de *Pilocarpus* (Sandhu *et al.*, 2006) e de caracterização do perfil dos alcalóides imidazólicos em *P. microphyllus* em diferentes estações e partes da planta (Abreu *et al.*, 2007b).

Outro estudo, ainda em andamento, procura elucidar a via de biossíntese da pilocarpina e dos demais alcalóides imidazólicos com a utilização de plantas e de suspensões celulares. Acredita-se que estes sejam derivados do aminoácido histidina, que possui um anel dinitrogenado, o qual seria convertido em um anel imidazólico e os átomos de carbono adicionais seriam provenientes do acetato ou da treonina (Dewick, 1997). Contudo cabe ressaltar que outras rotas são possíveis, visto que, por exemplo, o alcalóide imidazólico anosmine, é formado a partir de duas unidades de lisina (Hemscheidt & Spenser, 1991).

Em outros três trabalhos houve participação da autora desta tese e resultaram em três publicações, que podem ser encontradas no final desta dissertação em Anexos.

No trabalho **“HPLC-ESI-MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*”** (Sawaya *et al.*, 2008) procurou-se desenvolver uma técnica de análise qualitativa e quantitativa dos alcalóides imidazólicos através de HPLC acoplado ao ESI-MSⁿ. Para isso, utilizaram-se dois extratos de alcalóides obtidos a partir de folhas frescas de plantas de *P. microphyllus* mantidas em casa de vegetação e outra a partir de uma pasta, rejeito resultante do processo de extração industrial de pilocarpina pela Vegeflora. Tanto as folhas como a pasta foram submetidas ao processo de extração dos alcalóides desenvolvido por Avancine *et al.* (2003). Trata-se de um método adequado para análises de rotina de amostras que contém estes alcalóides, assim como para separação e identificação de alcalóides conhecidos e novos desta família e, talvez, possa ser aplicado para futuros estudos das vias de biossíntese da pilocarpina em *P. microphyllus*.

Já no trabalho, intitulado **“Cell suspension as a tool to study the biosynthesis of pilocarpine in Jaborandi”** (Abreu *et al.*, 2008) promoveu-se a indução de calos celulares utilizando como explantes pecíolos de plantas de *P. microphyllus* mantidos em casa de vegetação, que em seguida foram utilizados para o estabelecimento de seis linhagens celulares tanto primárias como resultantes de subcultivos. Análises do conteúdo de alcalóides e de

curvas de crescimento mostraram que as linhagens primárias apresentavam maiores teores de pilocarpina e pilosina e melhor crescimento celular. Células subcultivadas mostravam um decréscimo dos teores de alcalóides e a partir de 24 subcultivos a produção estabilizava. Ainda neste trabalho verificou-se que as suspensões celulares de *P. microphyllus* podem ser um modelo para produção em quantidades elevadas e estudo da biossíntese de pilocarpina, uma vez que produz os mesmos alcalóides encontrados nas folhas.

Diversos autores já relataram que a regulação de alcalóides de diferentes classes pode ser influenciada por diferentes fatores abióticos, tais como luz, temperatura, composição gasosa, salinidade, estresse osmótico, ácido jasmônico, alterações de pH e estresses nutricionais (Stafford *et al.*, 1986; Baricevic *et al.*, 1999; Godoy-Hernandes *et al.*, 2000; Van der Fits *et al.*, 2000; Li & Liu, 2003). Abreu *et al.* (2005) verificaram que mudanças no pH, variações nas concentrações de N e P no meio de cultura intensificavam a produção de pilocarpina a partir de calos, sendo que pH 6,8 induziu maior produção e liberação de pilocarpina para o meio de cultura. Os tratamentos com valores de pH do meio iguais a 4,8 e 5,8 produziram ao redor de 20% a menos de pilocarpina em relação ao tratamento com pH 6,8.

Portanto, a fim de se verificar como as suspensões celulares se comportariam da mesma maneira, um terceiro trabalho, **“Production of imidazole alkaloids in cell cultures of jaborandi as affected by the medium pH”** (Andreazza *et al.*, 2009), foi desenvolvido, no qual a produção de pilocarpina e pilosina foi analisada em duas das linhagens de suspensões celulares estabelecidas por Abreu *et al.* (2007a). Estas linhagens foram submetidas a diferentes valores do pH do meio de cultura, 4,8; 5,8; 6,8; 7,8; 8,8; 9,8, e a produção dos alcalóides foi acompanhada por 30 dias de subcultivo nas células e no meio de cultura. Ambas as linhagens produziram pilocarpina enquanto que somente a linhagem C produziu a pilosina. Maiores teores de pilocarpina foram produzidos nos tratamentos de pH mais elevado em ambas as linhagens, enquanto que o maior teor de pilosina foi produzido no pH 7,8. Por fim os teores

dos dois alcalóides estudados sempre eram mais elevados nas células que no meio de cultura sendo que para a maioria dos tratamentos notou-se uma maior liberação do alcalóide no 20º dia de subcultivo. A produção de outros alcalóides identificados em folhas de jaborandi também foi verificada neste trabalho.

Por meio de todos estes estudos, pode-se concluir que uma alternativa ao extrativismo seria a produção dos alcalóides imidazólicos através do cultivo *in vitro* de células, uma vez que, por apresentarem estrutura química muito complexa, sua síntese química é difícil e de custo elevado. Além disso, a obtenção destes compostos a partir de plantas traz problemas tais como variação da quantidade e qualidade do material vegetal e períodos prolongados de cultivo antes que as plantas possam ser coletadas (Verpoorte & Van der Heijdenj, 1993).

A cultura de tecidos em plantas já é bastante utilizada como alternativa para propagação comercial de plantas de interesse alimentício, medicinal e ornamental (garantem constância na qualidade das mudas livres de doenças) e para manutenção de bancos de germoplasma e de bancos clonais em centros de pesquisa (George & Sherrington, 1984; Shimomura, 1997).

O potencial da cultura de órgão e células para produção de compostos químicos finos foi inicialmente explorado com cultura de raízes em 1954, sendo a primeira patente registrada por Routien & Nickell, em 1956. Nos anos seguintes, com o aprimoramento da técnica, a cultura de tecidos em suspensões celulares, quando bem sucedida, tem se mostrado bastante promissora para produção de metabólitos secundários *in vitro*, visto que permite uma rápida proliferação celular, em curtos intervalos de tempo, o que possibilita a realização de estudos sobre regulação de um determinado metabólito secundário sob condições controladas e fáceis de serem manipuladas (Rout *et al.*, 2000).

Da mesma forma, a cultura de tecidos em biorreatores também tem se mostrado bastante aplicável. A fim de otimizar a produção dos metabólitos, vários estudos têm sido

feitos no que concerne a elucidação das vias biossintéticas, taxas de acúmulo da substância de interesse, sítios de armazenamento dentro das células e de catabolismo. Uma vez que a regulação da síntese destes compostos é feita a um nível gênico, umas das propostas do uso da cultura de células é clonar os genes do metabolismo secundário e aumentar a expressão dos genes que codificam para as enzimas da via, favorecendo assim a síntese do metabólito de interesse (Verpoorte & Van der Heijden, 1993; Verpoorte *et al.*, 1999; Verpoorte & Memelink, 2002).

Além disso, um dos aspectos desejados para a produção de metabólitos secundários em biorreatores é a compreensão de como ocorre o transporte destas substâncias intracelularmente, caso existam locais distintos de produção e armazenamento, assim como a sua liberação para o meio de cultura (Dixon, 1985; Pedersen *et al.*, 1987; Verpoorte *et al.*, 1999). Desta maneira, o meio de cultura pode ser removido e reciclado, resultando na simplificação da purificação da substância de interesse em função da não contaminação por outros constituintes celulares. Além disso, também minimiza-se a quantidade de solventes altamente poluentes (ácidos e bases fortes e clorofórmio) utilizados na purificação destes compostos a partir de células. Portanto, é desejável conhecer qual o mecanismo de transporte que controla a liberação de alcalóides para o meio de cultura através da membrana, pois uma das estratégias de aumentar a liberação dos mesmos para o meio de cultura seria a super-expressão dos genes que codificam para proteínas de transporte nas culturas celulares (Oksman-Caldentey & Inze, 2004).

Os dois principais mecanismos propostos para o transporte intra e extracelular de metabólitos secundários são: um sistema com gradiente de H^+ , mediado via H^+ -antiporte e, um segundo, denominado ABC (transporte primário energizado diretamente pelo transportador “ATP-Binding Cassete” - ABC) (Martinoia *et al.*, 2002). Dependendo da espécie estudada o transporte do metabólito é feito por uma destas vias ou no caso algumas espécies o transporte

entre meio e célula e via ABC proteínas e entre citossol e tonoplasto, via ATPases (Otani *et al.*, 2005).

H⁺-ATPases pertencem a superfamília de P-type ATPases. Já foram identificados 46 e 43 genes desta superfamília em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, respectivamente (Baxter, *et al.*, 2003). As P-type ATPases podem ser divididas em dez ramos filogenéticos dos quais seis são encontrados em plantas. O ramo das H⁺-ATPases é subdividido em cinco subfamílias que aparecem antes da separação entre as espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas (Arango *et al.*, 2003). Em nenhuma das subfamílias estas proteínas atuam trocando o sódio e o potássio como é feito pelas Na⁺/K⁺-ATPase de células animais. Ao invés disso, as plantas, assim como os fungos, possuem uma bomba de prótons que acopla a hidrólise do ATP ao transporte de prótons para fora da célula, o que estabelece um gradiente eletroquímico na membrana plasmática que é dissipado por um transporte secundário usando prótons como simporte ou antiporte, assim como o sódio é usado em células animais. Funções adicionais a estas proteínas, tais como participação na abertura estomática, no crescimento celular, na regulação do pH intracelular, no transporte de açúcar também foram propostas (Zhao *et al.*, 2000; Vitart *et al.*, 2001; Merlot *et al.*, 2007; Gevaudant *et al.*, 2007).

Já os transportadores ABC, constituem uma grande família protéica descrita em organismos de todos os taxa e amplamente conhecidos em microrganismos (Higgins, 1992). Estudos com células cancerígenas levantaram os primeiros indícios de que estas proteínas seriam responsáveis no transporte de metabólitos secundários, visto que, são responsáveis por promover a resistência dos tumores a uma ampla diversidade de drogas (muitas delas oriundas de plantas), realizando o efluxo destas substâncias para fora das células (Juliano & Ling, 1967; Chen *et al.*, 1986; Ueda *et al.*, 1986 e 1987). Estudos recentes têm demonstrado que a participação destas proteínas não está restrita a processos de desintoxicação (Martinoia *et al.*, 2002).

Apesar de pouco estudados em plantas, nos últimos anos demonstrou-se que estas proteínas estão envolvidas no transporte de hormônios, lipídios, metais, xenobióticos, metabólitos secundários (Sánchez-Fernández *et al.*, 2001) e, dependendo da direção do transporte em relação ao citoplasma, são categorizados como proteínas de influxo ou de efluxo (Saurin *et al.*, 1999; Dassa *et al.*, 2001). Além disso, também participam de processos de compartimentalização vacuolar e contribuem na interação com patógenos e na modulação de canais de íons (Yazaki, 2005; Rea, 2007).

O sequenciamento completo da *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) permitiu a identificação de 129 genes que codificam para proteínas do tipo ABC (sendo que 103 são de proteínas de membrana e o restante para proteínas livres do citoplasma). Estas proteínas são tipicamente compostas por domínios transmembranares (TMDs) e domínios nucleotídicos (NBDs) (Theodoulou, 2000). Os NBDs são relativamente conservados e capazes de se combinar e hidrolisar o ATP para liberar energia. Este domínio apresenta motivos conservados, entre eles às seqüências denominadas Walker A e Walker B e os loops H e Q. Já os TMDs, composto por diversas alfa-hélices hidrofóbicas, utilizam esta energia para capturar e transportar o substrato alvo pela membrana plasmática (Verrier *et al.*, 2008).

Aquelas proteínas que possuem um domínio de cada tipo são chamadas de *half-size* e estão presentes em organismos procariotos e eucariotos, enquanto que aquelas que possuem dois domínios de cada tipo, proteínas *full-size*, estão presentes somente em eucariotos. Acredita-se que todos os domínios NBDs compartilhem de uma mesma origem evolutiva e mecanismos, enquanto que os TMDs, podem diferir consideravelmente em seqüência e portanto exibir importantes diferenças quanto ao seu mecanismo de ação. Isto se reflete na diversidade de substratos que são transportados pelas ABCs (Higgins *et al.*, 2004).

A família de proteínas ABC de plantas foi dividida em oito subfamílias, de A-H, em uma classificação recente proposta por Verrier *et al.* (2008). A subfamília B compreende as proteínas full-size PGP-MDR (*P-glycoproteins multidrug resistance*) que estão associadas ao transporte de auxinas, metabólitos secundários e xenobióticos. Esta subfamília de ABCs é a responsável por conferir resistência de células cancerígenas a medicamentos (Higgins, 1992; Gottesman & Pastan 1993). Acredita-se que estes transportadores estejam envolvidos no transporte de certos metabólitos através da membrana para promover sua acumulação em partes específicas da planta ou em células (Yasaki, 2005).

Apesar de algumas proteínas MDR de plantas já terem sido identificadas e caracterizadas (Schulz & Kolukisaoglu, 2006), poucos genes de MDR em plantas medicinais foram clonados, como por exemplo, o CjMDR1 em *Coptis japonica* (Shitan *et al.*, 2003) e CrMDR1 em *Catharanthus roseus* (Jin *et al.*, 2007). Além destes, outros homólogos MDR foram clonados da batata, *Solanum tuberosum* (Wang *et al.*, 1997) e do trigo, *Triticum aestivum* (Sasaki *et al.*, 2002), em triagens de genes induzidos por alumínio e proteínas capazes de interagir com a calmodulina, respectivamente.

Em trabalhos com culturas em suspensão de *Coptis japonica*, verificou-se que as células são capazes de absorver berberina adicionada no meio de cultura e acumulá-la no vacúolo, o que mostra uma atividade de influxo destes transportadores (Sakai *et al.*, 2002 e Shitan *et al.*, 2003). Por outro lado, ao fornecer um precursor de berberina para as células em culturas de *Thalictrum minus*, estas a produzem e a jogam para o meio de cultura, revelando uma atividade de efluxo das proteínas (Terasaka *et al.*, 2003). Nestes trabalhos os autores discutem que este processo de compartimentalização dos alcalóides no vacúolo ou de sua liberação para o meio de cultura seriam estratégias adotadas pelas espécies para prevenir-se de sua citotoxicidade.

Neste contexto, partindo do conhecimento de que alcalóides imidazólicos são

produzidos e liberados para o meio de cultura em suspensões celulares de *P. microphyllus* e que estes processos são influenciados por alterações do pH, estudos que envolvam a determinação do local de acúmulo deste alcalóide nas células e os mecanismos de transporte da pilocarpina entre célula e meio, aliado as estratégias que aumentem a produção desta substância pelas suspensões, poderiam contribuir para o desenvolvimento de melhores estratégias para obtenção mais eficaz e economicamente viável de pilocarpina em cultivo de células.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Determinar o local de acúmulo intracelular de pilocarpina nas células em suspensões;
- Verificar a sensibilidade das suspensões de *P. microphyllus* a altas doses do alcalóide pilocarpina;
- Determinar o mecanismo envolvido no transporte deste alcalóide entre células e meio de cultura, procurando identificar se há a participação de proteínas ATPases e/ou proteínas ABC neste processo;
- Verificar a influência do pH do meio de cultura no transporte de pilocarpina entre células e meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Para a realização de todos os experimentos foi utilizada a linhagem A de suspensões celulares de *P. microphyllus* estabelecidas de acordo com Abreu *et al.* (2007a) no Departamento de Fisiologia Vegetal – IB, Universidade Estadual de Campinas. A escolha desta linhagem se deve ao seu bom crescimento e uniformidade do tamanho dos grânulos celulares, o que não foi observado nas demais linhagens disponíveis. Nos ensaios de toxicidade também utilizou-se suspensões de *C. arabica* estabelecidas e mantidas de acordo com Filippi *et al.*, (2007). Para o ensaio de localização subcelular, além das suspensões celulares, também foram utilizadas folhas jovens de plantas de *P. microphyllus* crescendo na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal (Sandhu *et al.*, 2005).

Reagentes

A pilocarpina, todos os inibidores, o DTT (ditiotretol) e o ácido 2,4 diclorofenoxiacético foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO,USA), enquanto que a pilosina foi obtida da Merck Pharmaceutical Company (Rio de Janeiro, Brasil). Os reagentes utilizados para extração dos alcalóides das culturas celulares, os reagentes para preparo das soluções dos testes histoquímicos, o diacetato de fluoresceína, o ácido ascórbico e a sacarose foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). A resina plástica (Historesin-Leica) foi adquirida da Leica microsystems (Heidelberg, Germany).

Manutenção das culturas e montagem dos ensaios

As células de *P. microphyllus* e *C. arabica* foram cultivadas em erlenmeyers de 125 ml contendo 30 ml de meio MS líquido (Murashige e Skoog, 1962), contendo 5,77 μ M de

ácido 2,4 diclorofenoxiacético, 3% de sacarose e pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas no escuro, sob agitação constante de 110 rpm. As culturas foram repicadas a cada 15 dias.

A montagem dos ensaios de absorção de pilocarpina exógena, localização subcelular, toxicidade, inibição e cinética foram realizados em um fluxo laminar localizado em uma sala adequada para manipulação de cultura de tecidos, a fim de se manter as células em condições estéreis. Todos os ensaios realizados neste trabalho foram feitos em triplicatas experimentais, cada uma delas com triplicatas técnicas.

Extração e quantificação de pilocarpina e pilosina

A extração de alcalóides das frações de célula e meio de cada amostra foi feita de acordo com Avancine *et al.* (2003), na qual são adicionados 10 ml de NH_4OH (10%) para cada grama de células frescas e 5 ml de NH_4OH (10%) para cada 1 ml de meio. Para as células o material foi macerado em graal após a adição de NH_4OH a fim de se homogeneizar a mistura e depois transferido para frascos com tampa rosqueada. Após 15 minutos, foram adicionados 10 ml de clorofórmio e o tubo contendo a mistura era agitado vigorosamente em vórtex. Após centrifugação a 3000 g por 20 min, o clorofórmio foi recuperado e o restante foi re-extraído por mais duas vezes, cada uma com a adição de 5 ml de clorofórmio. As frações clorofórmicas foram reunidas e extraídas duas vezes com 5 ml de H_2SO_4 (2%). As frações ácidas foram reunidas e alcalinizadas a pH 12 com NH_4OH concentrado. Após duas extrações em 2 ml de clorofórmio, as frações foram reunidas, secas em *speed-vac* e solubilizadas em 500 μl de água milli-Q. As quantificações de pilocarpina nos extratos foram realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em sistema isocrático, utilizando coluna supelcosil LC18 (Supelco) e como eluente solução aquosa contendo 0,3% de trietilamina e 12% de metanol, com pH ajustado para pH 3 com H_3PO_4 . O fluxo foi de 1 ml/min, o volume injetado das

amostras foi de 25 µl e a detecção com detector de UV (ultravioleta) a 212 nm. A identificação de pilocarpina nas amostras foi feita pelo tempo de retenção e co-injeção com padrão puro de pilocarpina e pilosina. A quantificação se deu por comparação dos picos nas amostras com corridas com quantidades conhecidas de pilocarpina e pilosina.

Toxicidade da pilocarpina a diferentes suspensões celulares

A fim de se avaliar a sensibilidade de diferentes suspensões celulares a pilocarpina, 3 g de células com 15 dias de sub-cultivo foram incubadas em 30 ml de meio de cultura pH 5,8 contendo diferentes concentrações de pilocarpina (0 a 10 mM tanto para *P. microphyllus* como para as suspensões de *C. arabica*). Após 20 dias de cultivo, as suspensões foram filtradas a vácuo e lavadas por três vezes com água milliQ. Determinou-se a massa fresca das células e o volume do meio de cultura assim como seus teores de pilocarpina.

Verificou-se a viabilidade das células com o diacetado de fluoresceína (Balestri & Cinelli, 2001). De cada frasco de células em suspensão coletamos 0,2 ml de suspensão e a ele adicionados 500 µl de solução 0,5% de fluoresceína diacetato. Após 5-10 minutos observou-se as células em um microscópio de fluorescência. Células com o interior fluorescentes mantêm viabilidade por mostrarem integridade e funcionalidade da membrana plasmática.

Localização subcelular da pilocarpina por centrifugação diferencial

Para este ensaio foram utilizadas células em condições naturais de cultivo e células que receberam pilocarpina. No segundo caso, 5 g de células foram incubadas em 30 ml de meio de cultura (pH 5,8) e após uma hora de incubação, adicionou-se pilocarpina na concentração final de 0,25 mM. Após doze horas de tratamento coletou-se as células para realização do fracionamento celular. Em ambos os casos (com e sem pilocarpina) as suspensões celulares foram filtradas a vácuo e 5 g de células foram coletadas e lavadas três vezes com água milliQ.

O fracionamento celular em cloroplasto, mitocôndria e citoplasma + vacúolos foi feito usando-se um método de centrifugação diferencial (Wingsle *et al.*, 1991) com adaptações. Utilizaram-se 10 ml de tampão de extração (5% de DTT, 0,5% de ascorbato, 30 mM de sacarose, pH 8,0, 4°C) para macerar suavemente os grânulos celulares em um cadinho, com cerca de 0,5 g de areia lavada. Filtrou-se o macerado em funil de vidro com cinco a seis camadas de gaze para eliminar o excesso de areia lavada. Em seguida este filtrado bruto foi então novamente filtrado por mais três vezes em uma membrana de 100µM (MilliPore®) a fim de se individualizar as células e eliminar a areia lavada que ainda restava. Ressuspendeu-se os resíduos restantes nesta membrana em 10 ml de tampão e refiltrou-se. O filtrado resultante foi então novamente filtrado duas vezes em uma membrana de 45µm (Whatman®) a fim de separar as células ainda restantes das organelas individualizadas. Depois, dividiu-se este filtrado em dois tubos e levou-se para centrifugar, a 400 g por 20 min, a 4°C. Separou-se o sobrenadante (1) do “pellet” que continha os cloroplastos. Ressuspendeu-se delicadamente o “pellet” em 5 ml de tampão e centrifugou-se novamente a 400 g por 20 min a 4°C, para lavagem dos cloroplastos. Repetiu-se o mesmo procedimento por mais duas vezes. Os sobrenadantes resultantes destas lavagens foram preservados para posterior quantificação de pilocarpina a fim de se obter o total produzido pelas células. O sobrenadante 1 foi então centrifugado em rotor swing a 110000 g por 15 minutos a 4°C, para separação da mitocôndria (pellet, ressuspensão em 5 ml de tampão) e citoplasma/vacúolo (sobrenadante). Extraíu-se e quantificou-se a pilocarpina em cada fração subcelular. O mesmo procedimento foi feito utilizando-se 1 g de folhas jovens de plantas de *P. microphyllus*.

Testes histoquímicos

Para realização dos testes histoquímicos as células foram separadas do meio de cultura através de filtração a vácuo e lavadas três vezes com água milliQ. Em seguida foram fixadas a

vácuo em paraformaldeído 4% (p/v), por 24h a 4°C, para que ocorresse a submersão dos aglomerados de células no fixador. Depois, foram desidratadas em série etílica e emblocadas em resina plástica (Hitoresin, Leica), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, com o uso de micrótomo rotativo (Leica RM2145) secções de 5µm foram feitas e fixadas em lâminas.

Para análise estrutural dos aglomerados de células algumas lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (p/v), em tampão de tetraborato de sódio. Já as lâminas submetidas aos testes histoquímicos não foram coradas. Testes histoquímicos e seus respectivos controles foram realizados para a detecção de alcalóides com os reagentes de Wagner (Furr & Mahberg, 1981) e Dragendorff (Svedsen & Verpoorte 1983).

Os aspectos relevantes da análise do laminário foram registrados através de fotomicrografias digitais (600dpi) obtidas em microscópio Olympus BX51 e as escalas pela projeção da lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas. As imagens foram editadas no programa Photoshop 7.0 e pranchas com as fotomicrografias feitas em PowerPoint versão 2003.

Absorção de pilocarpina exógena pelas suspensões

Células (1 g) de *P. microphyllus*, com 15 dias de sub-cultivo, foram transferidas para erlenmeyers de 25 ml contendo 6 ml de meio de cultura, alterados somente quanto aos valores de pH do meio de cultura, ou seja, 4,8; 5,8; 6,8; 7,8; 8,8 e 9,8, em um total de 36 erlenmeyers para cada um destes valores de pH (tratamentos). Após uma hora de incubação adicionou-se pilocarpina aos erlenmeyers para a concentração final de 0,25 mM. Logo após a adição do alcalóide coletou-se três frascos de cada tratamento de pH, sendo este o tempo 0 e, a partir dele, a cada duas horas, durante 12 h coletou-se mais três frascos de cada tratamento. Nos intervalos de cada coleta as suspensões foram mantidas em shaker, sob agitação de 110 rpm à

25°C, no escuro. Nas coletas, as células e o meio foram separados por filtração a vácuo e o pH foi determinado no meio, que foi reservado. As células foram lavadas por 3 vezes com água milliQ para remoção do excesso do alcalóide e as frações de lavagem foram unidas com o meio de cultura que havia sido reservado. A extração e quantificação de pilocarpina foram feitas nas células e nos meios de cultura como descrito acima.

Marcha de absorção de pilocarpina

Células (1 g) de *P. microphyllus*, com 15 dias de sub-cultivo, foram transferidas para erlenmeyers de 25 ml contendo 6 ml de meio de cultura pH 5,8, em um total de 120 erlenmeyers. Após uma hora de incubação dividiu-se os erlenmeyers em 4 grupos de 30 e em cada grupo adicionou-se pilocarpina para a concentração final de 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM. As suspensões foram incubadas em shaker sob agitação de 110 rpm à 25°C, no escuro. Coletou-se três erlenmeyers de cada tratamento (concentração de alcalóide) após 0, 2, 6, 10 e 12 h da inclusão de pilocarpina. A coleta das células e do meio, assim como as suas respectivas extrações e quantificações de pilocarpina foram feitas da mesma maneira como descrito no item anterior.

Inibição de proteínas de transporte

Nos estudos com uso de inibidores das proteínas de transporte, células (1 g) foram transferidas para 6 ml de meio de cultura, pH 5,8 contendo inibidores, cujas concentrações já se verificou que resultaram na inibição da função de proteínas ABC e/ou ATPases (Drose & Altendorf, 1996; Hu *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1998, Terasaka *et al.*, 2003 e Sakai *et al.*, 2002).

Os inibidores específicos para ABC proteínas foram: ciclosporina A (100 µM); nifedipina (50 µM); *buthionine sulfoximine* (5 mM); verapamil (50 µM) e quinidina (50 µM).

Já os inibidores para ATPases foram: azida sódica (1 mM); NH_4Cl (10 mM); glutathione (100 μM) e bafilomicina A1 (1 μM). Para cada inibidor. Também utilizou-se o vanadato de sódio (1 mM), responsável por inibir a função de ambas as famílias protéicas aqui estudadas. Para cada tratamento (inibidor) foram feitos um total de 6 erlenmeyers.

Após uma hora de incubação, adicionou-se pilocarpina na concentração final de 0,25 mM em metade dos frascos (3) de cada tratamento. A outra metade foi mantida sem pilocarpina exógena a fim de se verificar a inibição da liberação da pilocarpina endógena. As suspensões foram incubadas em shaker, sob agitação de 110 rpm à 25°C, no escuro. Determinaram-se as quantidades absorvidas de pilocarpina após 10 h de sua adição no meio de cultura e as quantidades liberadas no meio após 10 h da adição dos inibidores. A coleta das células e do meio, assim como as suas respectivas extrações e quantificações de pilocarpina foram feitas da mesma maneira como descrito anteriormente.

O vanadato de sódio foi despolimerizado antes de ser usado de acordo com o método de Goodno (1979). A quinidina, nifedipina e ciclosporina A foram dissolvidas em DMSO (dimetilsulfóxido) e para verificar se o DMSO afetava na absorção de pilocarpina pelas culturas adicionou-se 10 μl desta substância no controle. O DMSO não afeta a absorção de pilocarpina ou a viabilidade celular nesta concentração.

Inibição por dose dependência

A fim de verificarmos se a inibição de alguns destes inibidores era dose dependente, células (1 g) foram transferidas para 6 ml de meio de cultura, pH 5,8, contendo os seguintes inibidores nas respectivas concentrações: Azida sódica (0; 0,05; 0,1; 1 mM); *buthionine sulfoximine* (0; 1; 3; 5 mM), ciclosporina A (0; 10; 50; 100 μM) e vanadato de sódio (0; 0,01; 0,1; 1mM). Para cada concentração de cada inibidor utilizado foram feitos um total de 6 erlenmeyers. Após uma hora de incubação, adicionou-se pilocarpina para a concentração final

de 0,25 mM em metade dos frascos (3) de cada tratamento. A outra metade foi mantida sem pilocarpina exógena a fim de se verificar a inibição da liberação da pilocarpina endógena. As suspensões foram incubadas em shaker, sob agitação de 110 rpm à 25°C, no escuro. Determinaram-se as quantidades absorvidas de pilocarpina após 10 h de sua adição no meio de cultura e as quantidades liberadas no meio após 10 h da adição dos inibidores. A coleta das células e do meio, assim como as suas respectivas extrações e quantificações de pilocarpina foram feitas da mesma maneira como descrito anteriormente.

Inibição com variação pH do meio de cultura

Células de *P. microphyllus* (1 g), com 15 dias de sub-cultivo, foram transferidas para 6 ml de meios de cultura alterados somente quanto ao pH, ou seja, 5,8 e 9,8 (72 erlenmeyers de 25 ml para cada tratamento). Após uma hora de incubação, para cada pH, os erlenmeyers foram divididos em três grupos de 24 frascos. No grupo 1, adicionou-se quinidina (50 µM), no grupo 2, nifedipina (50 µM) e no grupo três, vanadato de sódio (1mM). Após mais uma hora de incubação adicionou-se em metade dos frascos de cada grupo, de cada pH, pilocarpina (0,25 mM) e a outra metade permaneceu como estava. As suspensões foram incubadas em shaker, sob agitação de 110 rpm à 25°C, no escuro. A primeira coleta dos tratamentos (3 repetições, portanto 3 erlenmeyers) que receberam pilocarpina (hora 0) foi feita instantes depois na adição do alcalóide e após 2, 6 e 12 horas. Já, a primeira coleta dos frascos sem pilocarpina (hora 0) ocorreu logo depois da adição dos inibidores e após 2, 6 e 12 horas. A coleta das células e do meio, assim como as suas respectivas extrações e quantificações da pilocarpina foram feitas da mesma maneira com descrito anteriormente.

Cinética de inibição

Células (1 g) foram transferidas para 6 ml meio de cultura (pH 5,8,) em 36 erlenmeyers de 25 ml. Após uma hora de incubação os erlenmeyers foram divididos em três grupos de 12. Em cada grupo adicionou-se 0 μ M, 25 μ M e 50 μ M de nifedipina, respectivamente. Após alguns instantes, a cada três erlenmeyers de cada uma das concentrações de inibidor adicionou-se, respectivamente, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM e 0,5 mM de pilocarpina. As suspensões foram incubadas em shaker, sob agitação de 110 rpm à 25°C, no escuro. Determinaram-se as quantidades absorvidas de pilocarpina após 2 h de sua adição no meio de cultura. O mesmo ensaio foi feito com o inibidor vanadato de sódio, mas nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM. Também dosou-se a concentração de pilocarpina nas células controle a fim de sabermos a sua produção endógena.

Calculou-se a constante de absorção de pilocarpina e constante de inibição dos inibidores através da construção dos gráficos primários e secundário e extrapolação das retas segundo o modelo de Lineweaver - Burke.

Curva de crescimento celular na presença dos inibidores

A fim de se verificar se os inibidores apenas afetavam a viabilidade celular avaliou-se o crescimento das células na presença de alguns deles. Para isso, 3 g de células foram adicionados em frascos de 125 ml contendo 30 ml de meio de cultura, pH 5,8 acrescidos de 50 μ l de DMSO, 1 mM de azida sódica, 1 mM de vanadato, 50 μ M de nifedipina, 50 μ M de quinidina e 5 mM de *buthionine sulfoximine*, com três repetições para cada tratamento. As suspensões foram incubadas em um shaker, sob agitação de 110 rpm à 25°C, no escuro. O crescimento das culturas foi acompanhado durante 20 dias medindo-se a massa das células a cada 4 dias. Para isto as culturas foram filtradas e a massa de células determinada.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Toxicidade à pilocarpina

Neste ensaio o efeito inibitório da pilocarpina no crescimento das culturas de *P. microphyllus* e de *C. arabica* foi examinado (figura 2). As culturas de *P. microphyllus* mostraram-se bastante tolerantes a adição de grandes quantidades de pilocarpina no meio de cultura, sem que isso afetasse o seu crescimento ao longo de 20 dias (figura 2A), quando as células e meio foram coletados para determinação de seus teores de pilocarpina (figura 3). Nos tratamentos em que se adicionou até 0,5 mM de pilocarpina, a maior parte do alcalóide foi encontrada nas células. Já nos demais tratamentos, acima de 1 mM, nota-se que os teores deste alcalóide no meio são cada vez mais altos e nas células, praticamente se mantém (figura 3A). A adição de pilocarpina em suspensões celulares de *C. arabica* inibiu fortemente o crescimento das culturas (figura 2B). Os teores do alcalóide encontrados nas células foram praticamente nulos, ficando quase que toda a pilocarpina no meio de cultura (figura 3B).

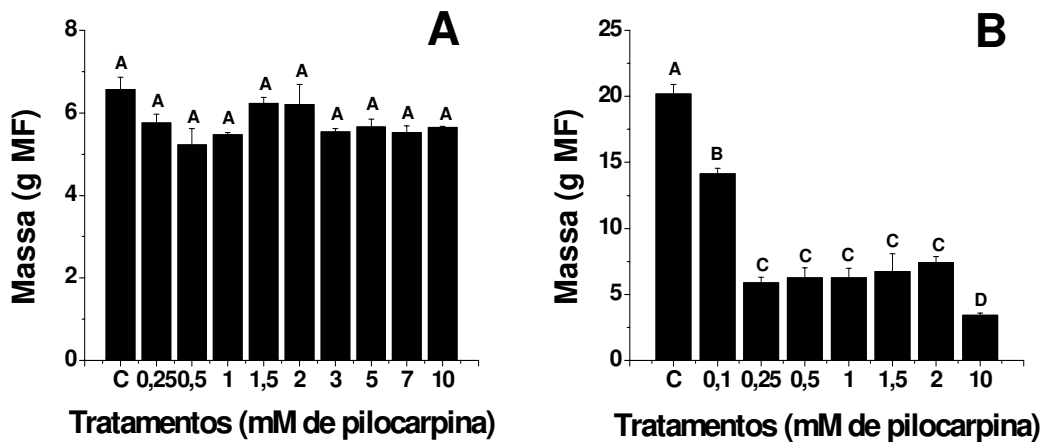


Figura 2. Efeito da pilocarpina no crescimento das suspensões celulares de *Pilocarpus microphyllus* (A) e *Coffea arabica* (B). A massa fresca (MF) representa o crescimento das células após 20 dias de cultivo. Letras diferentes indicam diferença estatística com 5% de significância pelo teste Tukey. Médias de 3 repetições.

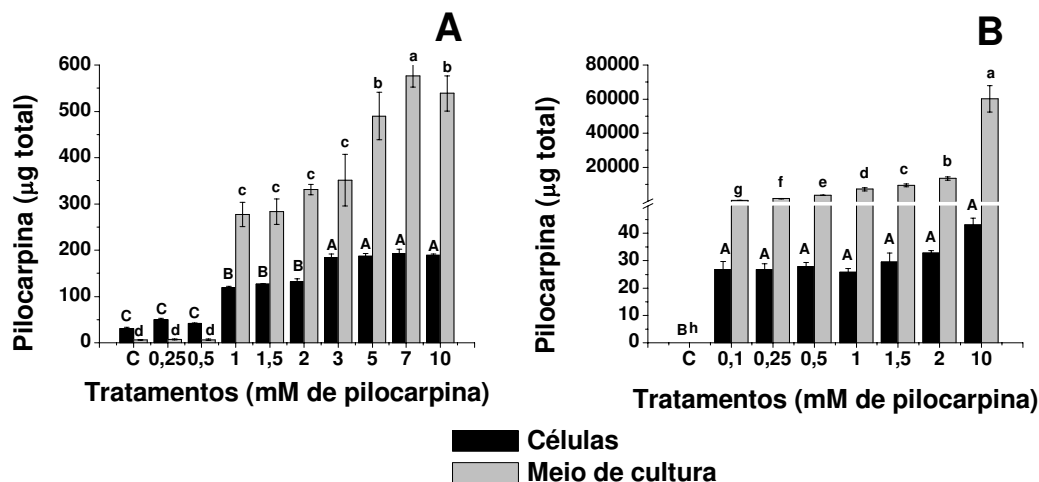


Figura 3. Teor de pilocarpina nas células e meio de cultura nas suspensões celulares de *Pilocarpus microphyllus* (A) e *Coffea arabica* (B), após 20 dias de sub-cultivo. Letras diferentes indicam diferença estatística com 5% de significância pelo teste Tukey). Média de 3 repetições.

Fracionamento celular

Tanto nas células cultivadas sem a adição de pilocarpina como naquelas que receberam pilocarpina foi possível verificar que houve uma diferença significativa dos teores do alcalóide em cada fração celular obtida, concentrando-se majoritariamente na fração correspondente ao vacúolo + citoplasma (figuras 4A e B). Acredita-se que as baixas concentrações do alcalóide tanto no cloroplasto como na mitocôndria seria resultado de eventuais contaminações ao longo do processo de fracionamento.

O mesmo pode-se verificar para as folhas de plantas de *P. microphyllus*, nas quais também foi detectada a presença do alcalóide pilosina, porém em menores quantidades em relação à pilocarpina (figura 4C).

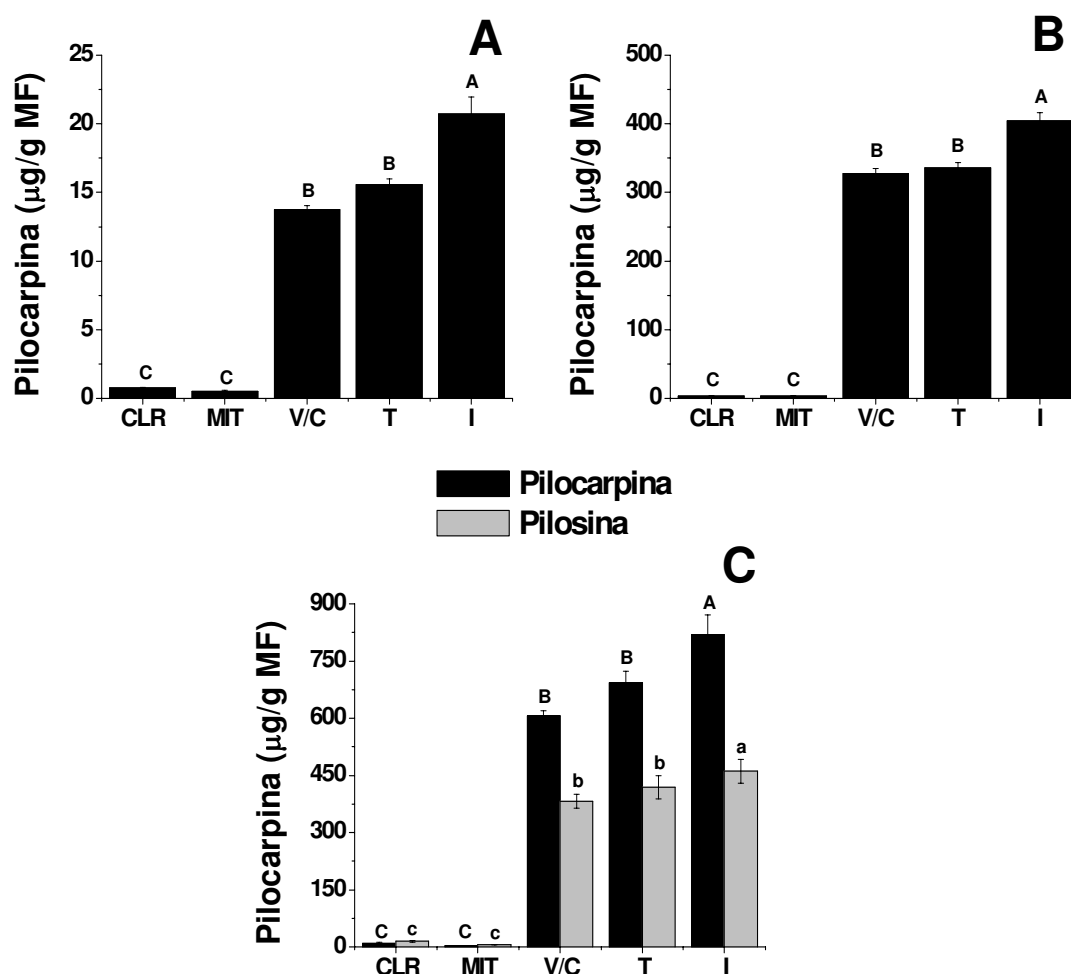


Figura 4. Localização subcelular da pilocarpina em suspensões celulares sem adição de pilocarpina (A), suspensões celulares com adição de pilocarpina (B) e em folhas (C) de *Pilosina microphyllus*. CLR, cloroplasto; MIT, mitocôndria; V/C, vacúolo + citoplasma, T, total e I, células integras. O Total representa a soma dos teores de pilocarpina de todas as frações obtidas ao longo do processo fracionamento. Letras diferentes indicam diferença estatística com 5% de significância pelo teste Tukey. Médias de 3 repetições.

Testes histoquímicos

Os resultados obtidos nos testes histoquímicos podem ser observados na figura 5, e como esperado, foram positivos para presença de alcalóide no interior das células com ambos os reagentes utilizados, Wagner (coloração caramelo a castanho) e Dragendorff (coloração alaranjada). Além disso, os resultados sugerem o acúmulo destes metabólitos no interior do

vacúolo, local onde a intensidade de coloração foi mais intensa (setas pretas) para ambos os reagentes utilizados. Cabe ressaltar que pelo reagente de Dragendorff também foi possível verificar acúmulo de amido pelas células.

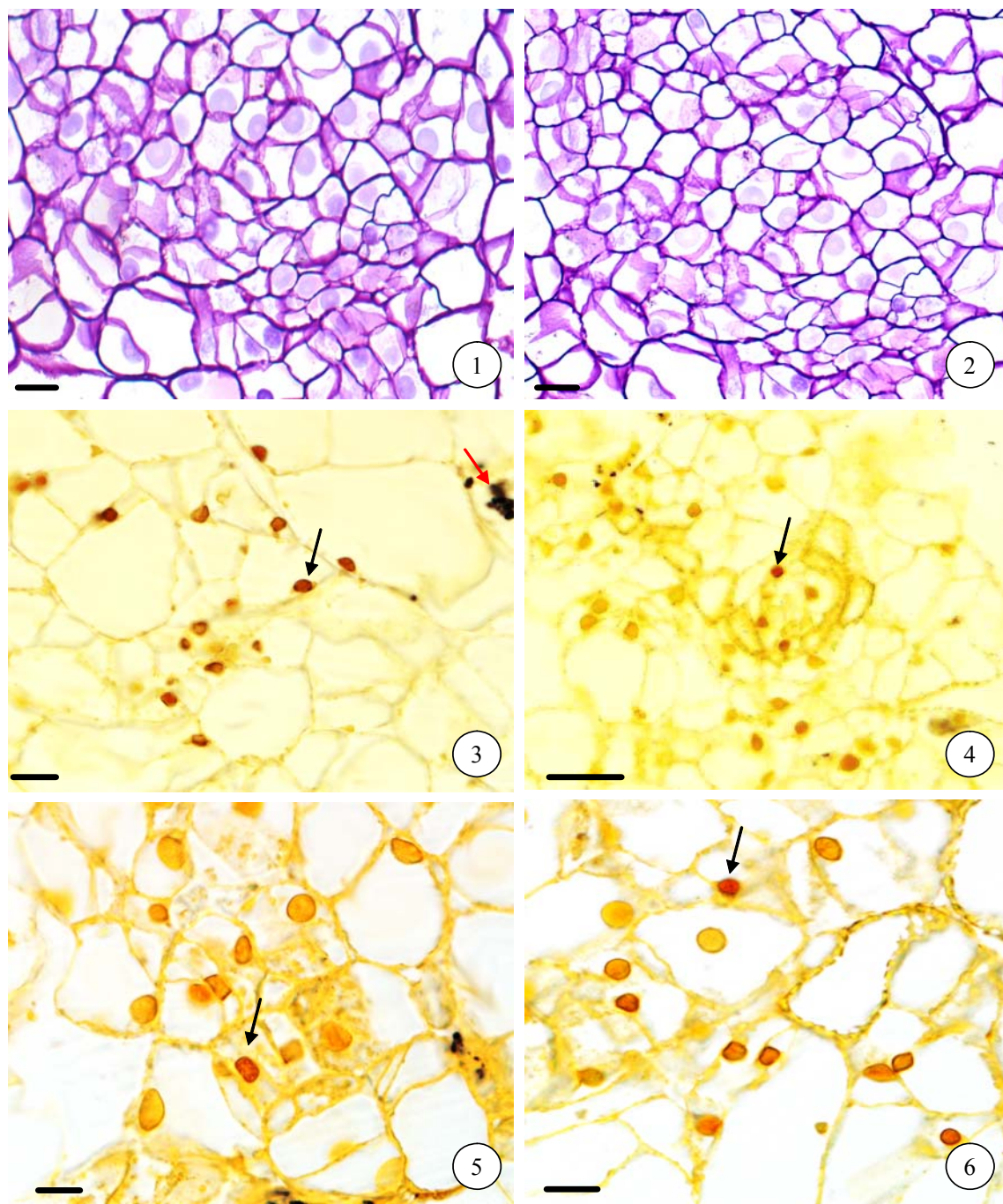


Figura 5. Secções (5µm) dos aglomerados celulares de *Pilocarpus microphyllus* com 15 dias de subcultivo. Cortes corados com azul de toluidina (1-2), cortes submetidos ao testes com reagente de Dragendorff (3-4) e Wagner (5-6). Escalas: 4. 75 µm; Demais figuras. 30 µm. Setas: Preta. Vacúolos; Vermelha. Amido.

Absorção de pilocarpina exógena em função do pH do meio de cultura

Nos valores de pH 5,8 e 6,8 do meio de cultura, observou-se que toda a pilocarpina adicionada no meio de cultura foi gradativamente absorvida pelas células ao longo das 12 h de cultivo (figuras 6A e 6B). Durante este período, os pHs desses dois tratamentos não variaram muito (figuras 7A e 7B). Já nos demais tratamentos (figuras 6C, 6D e 6E) pode-se observar que quanto maior o valor do pH do meio, menor a absorção de pilocarpina. Nos tratamentos de pH inicial do meio em 7,8 e 8,8 nota-se que a absorção da pilocarpina pelas células passa a ser maior quando o valor do pH do meio diminui e atinge valores inferiores a 7,5, o que ocorre com 4 e 8 h, respectivamente (figuras 7C e 7D). No meio com pH 9,8 isto é bem menos evidente (figuras 6E e 7E).

Também se acompanhou o comportamento das culturas com o pH 5,8 acrescidas de pilocarpina ao longo de 25 dias de cultivo (figuras 6F e 7F). Acredita-se que provavelmente a maioria da pilocarpina adicionada no meio foi absorvida pelas células nas primeiras doze horas de tratamento, em função dos resultados do ensaio anterior em pH 5,8 (absorção em diferentes valores de pH do meio). No 3º dia de cultivo dia (1º de análise após a montagem do ensaio) os teores de pilocarpina já estão muito baixos, o que indica para uma provável transformação deste alcalóide em outro composto dentro da célula. O pH do meio durante o período de acompanhamento da cultura praticamente não variou em relação ao pH inicial, de 5,8 (figura 7F).

Pode-se também notar uma variação no teor de pilocarpina no tempo 0 (adição do pilocarpina seguido por separação das células e meio de cultura e extração de ambas as frações). Esta variação pode ter sido influenciada pelo valor do pH do meio de cultura, visto que em pHs mais elevados o teor de pilocarpina foi menor no tempo 0; e/ou por variações na sensibilidade do HPLC.

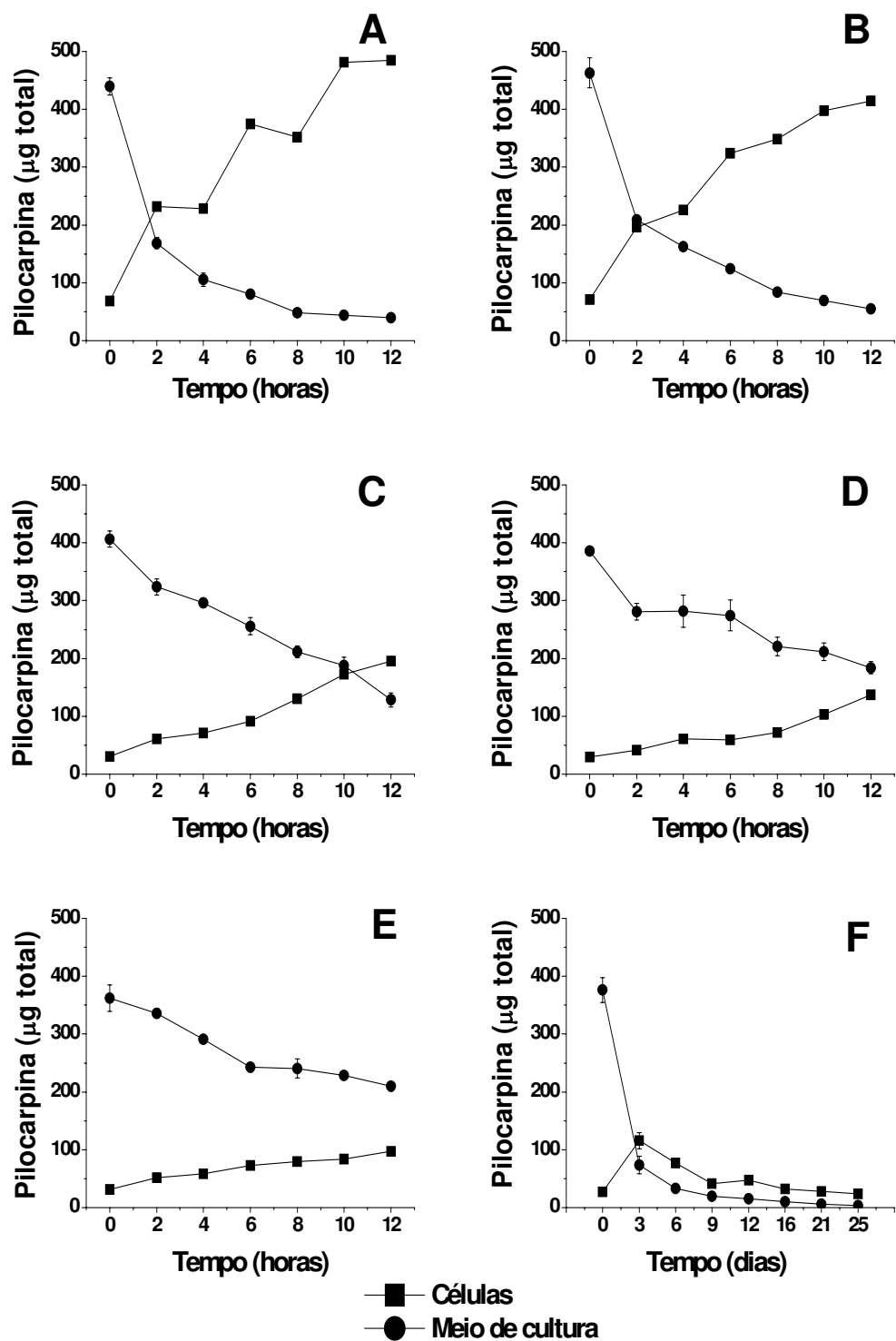


Figura 6. Absorção de pilocarpina (0,25 mM) pelas suspensões celulares de *Pilocarpus microphyllus*, com pH inicial do meio de cultura de 5,8 (A), 6,8 (B), 7,8 (C), 8,8 (D) e 9,8 (E) durante 12 h. Em (F), células em meio com pH 5,8 foram acompanhadas até 25 dias de cultivo. Médias de 3 repetições.

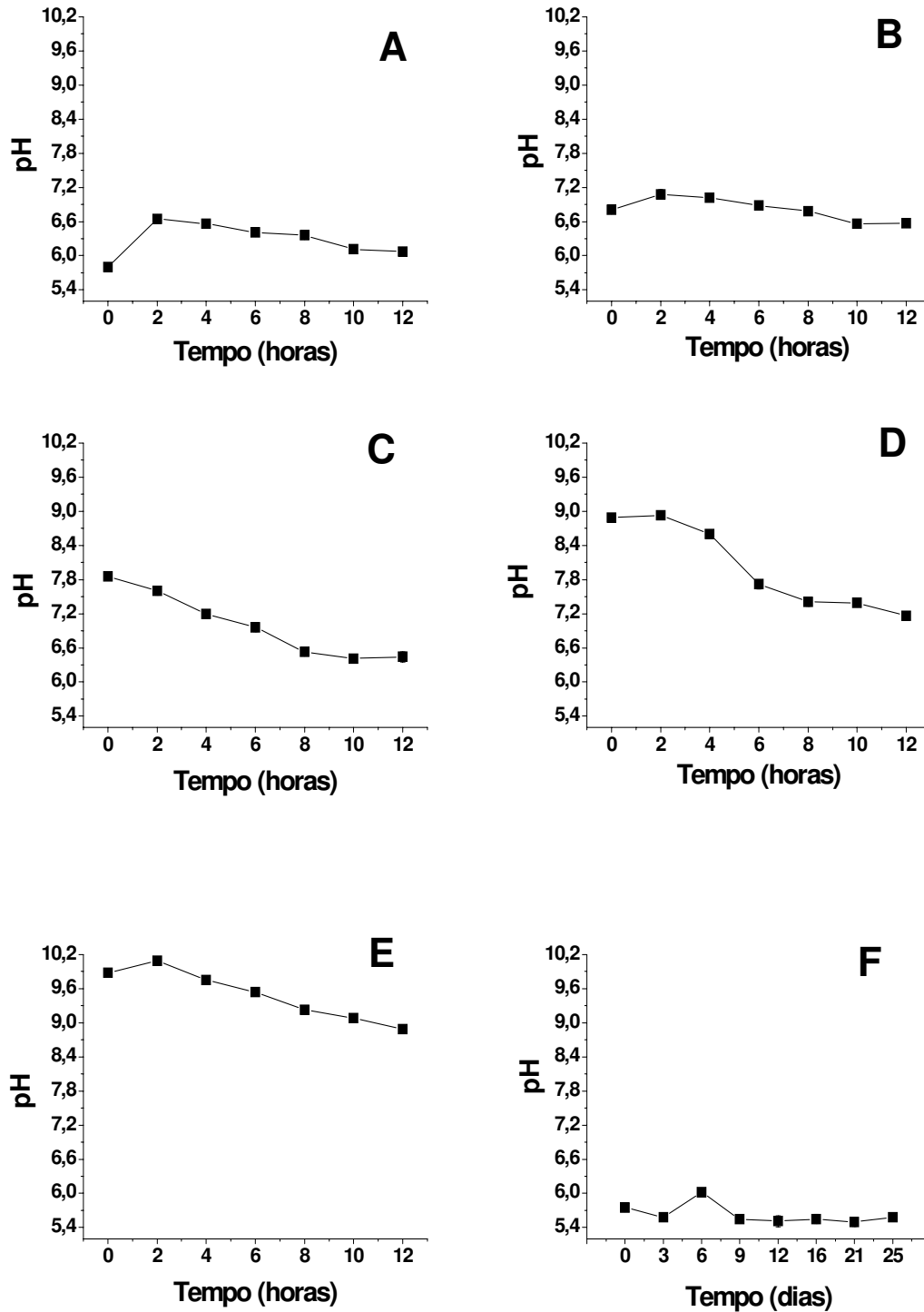


Figura 7. Acompanhamento da variação do valor pH do meio de cultura dos ensaios de absorção com pHs iniciais de 5,8 (A), 6,8 (B), 7,8 (C), 8,8 (D) e 9,8 (E). Em (F), células em pH 5,8 foram acompanhadas até 25 dias de cultivo. Médias de 3 repetições.

Marcha de absorção de pilocarpina

Neste ensaio (figura 8) observou-se que ao longo do tempo as células não absorvem linearmente a pilocarpina adicionada no meio de cultura. Para todos os tratamentos, observou-se que nas primeiras 2 h, a absorção era mais intensa. Em razão disso este período de tempo foi escolhido para compararmos a velocidade de absorção do alcalóide em relação a sua quantidade adicionada no meio de cultura (figura 9). Nota-se que nos tratamentos com 0,05mM e 0,1mM estão posicionados na região exponencial da curva indicando a não saturação do mecanismo de absorção, enquanto que os demais tratamentos localizam-se na região de estabilização da curva, onde há saturação.

Além disso, como já observado no ensaio anterior, nos tratamentos nos quais se adicionou quantidades inferiores a 0,25 mM do alcalóide (figuras 8A, 8B e 8C)), ao final de 12 h praticamente toda a pilocarpina acrescida já tinha sido absorvida pelas células. Nos demais tratamentos, acredita-se que o padrão de absorção seria semelhante se os ensaios fossem estendidos por mais tempo. Apesar das diferentes quantidades adicionadas nos meios de cultura, nota-se que a diminuição no meio de cultura não corresponde quantitativamente ao aumento nas células, sugerindo que existe uma saturação pela quantidade absorvida assim como provável transformação do alcalóide ou na célula ou mesmo no meio de cultura.

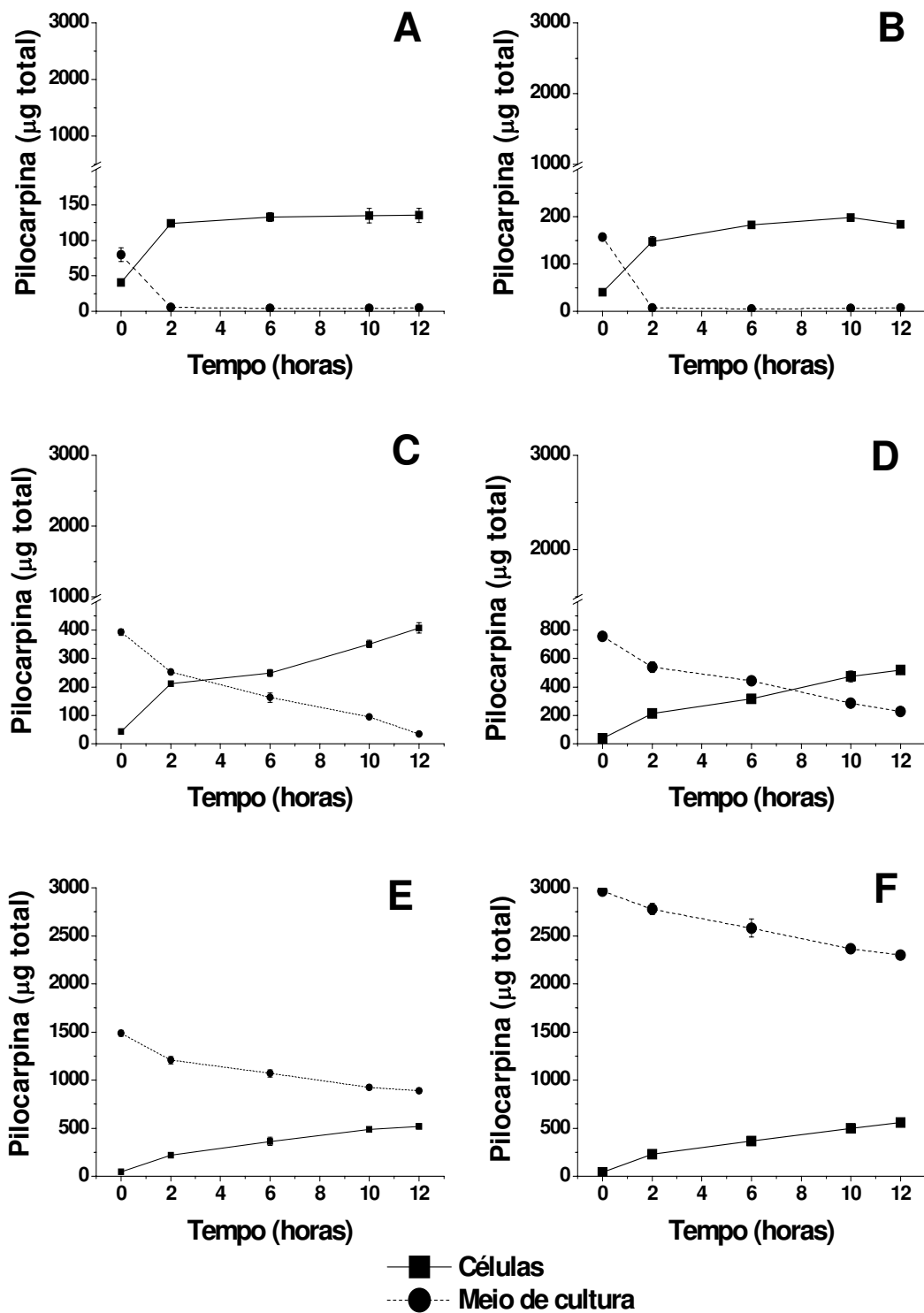


Figura 8. Marcha de absorção de pilocarpina pelas suspensões celulares de *Pilocarpus microphyllus* em pH 5,8. Adicionou-se ao meio de cultura 0,05 mM (A) 0,1 mM (B), 0,25 mM (C) e 0,5 mM (D), 1mM (E) e 2mM (F) do alcalóide. Médias de 3 repetições.

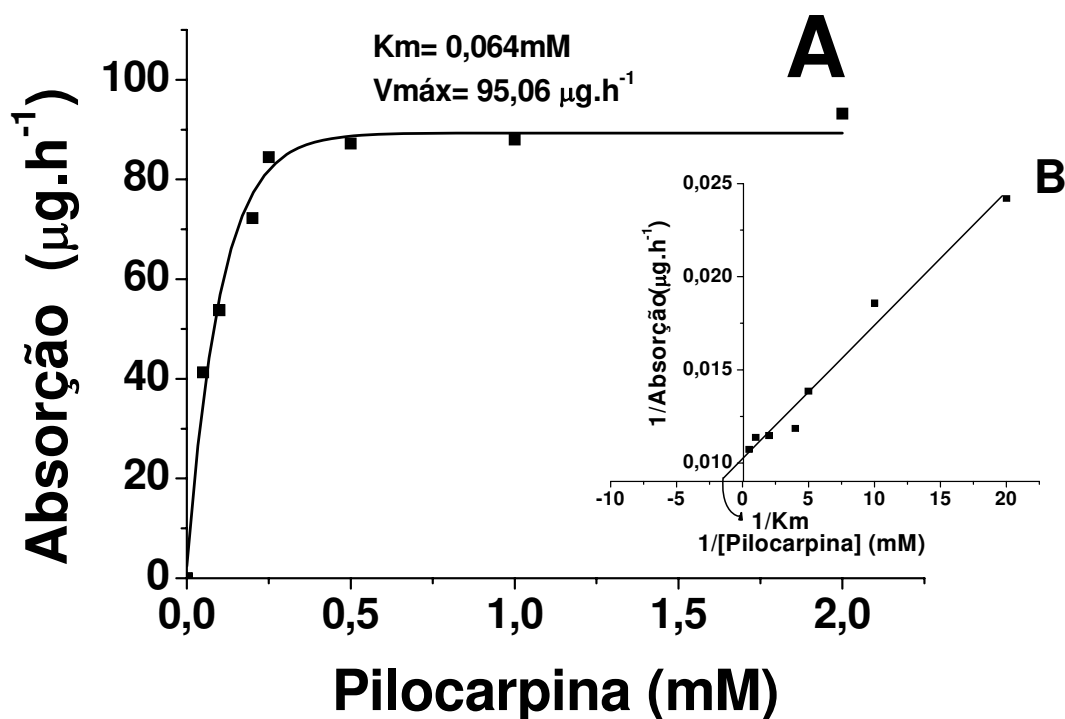


Figura 9. Relação entre a concentração de pilocarpina adicionada ao meio de cultura e velocidade inicial de absorção (após 1 h de tratamento) segundo o modelo de Michaelis e Menten (A) e Lineweaver- Burke (B).

Inibição da absorção e liberação de pilocarpina

O efeito de várias substâncias que inibem a atividade de diferentes transportadores de membrana foi testado na absorção e liberação de pilocarpina, adicionando-os ao meio de cultura em concentrações convencionalmente utilizadas antes de se adicionar ou não pilocarpina (0,25 mM) ao meio de cultura.

Quando pilocarpina foi adicionada ao meio de cultura (figura 10A) pode-se observar que a absorção do alcalóide foi intensa no controle e que, com intensidades variáveis, todos os inibidores específicos para ABC proteínas impediram fortemente a absorção do alcalóide. No tratamento com bafilomicina, um inibidor específico de ATPases, a inibição foi pequena. As maiores inibições ocorreram com típicos inibidores de ABC proteínas, com uma redução de

aproximadamente de 80% na absorção em relação ao controle.

Além disso, quando se comparou a ação de alguns destes inibidores em diferentes concentrações, verificou-se que o vanadato, ciclosporina, azida sódica e a buthionine sulfoximine inibiram a absorção do alcalóide de maneira dose-dependente (figura 11). Esta dose dependência observada também pode estar relacionada com as diferenças de inibição da absorção entre uma mesma classe de inibidores, principalmente aqueles específicos para ATPases (figura 10A). Por exemplo, como já dito a inibição causada pela bafilomicina foi pequena, mas da azida sódica e NH_4Cl , foi alta. Isto também pode estar associado ao mecanismo de ação de cada uma destas substâncias.

Apesar das suspensões celulares utilizadas já não produzirem quantidades muito elevadas de pilocarpina (valores entre 40-60 $\mu\text{g/g}$ MF) e liberar para o meio somente cerca de 10% desta produção, ao submetermos as células à ação destes inibidores observou-se uma inibição da liberação do alcalóide para o meio de cultura (figura 10B). Somente o tratamento com bafilomicina foi estatisticamente semelhante ao tratamento controle (figura 10B).

Contudo, diferentemente do ensaio de absorção, não se observou uma dose-dependência na liberação de pilocarpina para o meio de cultura em variações das concentrações dos inibidores (figura 12). Acredita-se que isso talvez se deva ao fato de que, a concentração mais baixa utilizada de cada um dos inibidores, já foi muito alta e suficiente para comprometer todo o sistema de transporte e por isso somente concentrações abaixo desta poderiam evidenciar uma dose dependência na inibição da liberação da pilocarpina.

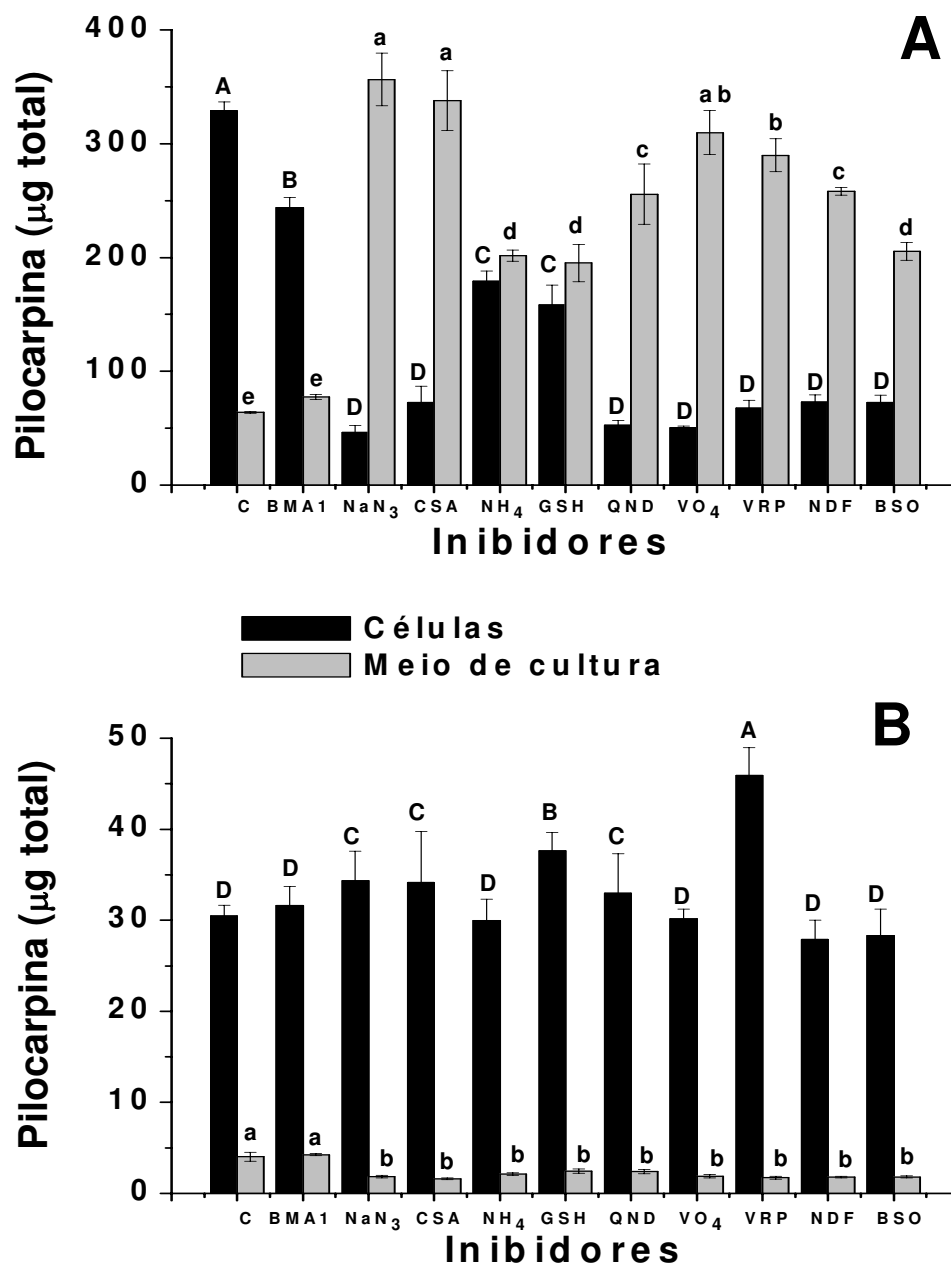


Figura 10. Efeito de vários inibidores na absorção (A) e liberação (B) de pilocarpina por células de *P. microphyllus*. A absorção de pilocarpina foi medida 10 horas após a adição do alcalóide e a sua liberação, 10h após a adição dos inibidores. Controle, BAM1 bafilomicina (1 µM); NaN₃: azida sódica (1 mM), CSA: ciclosporina (100 µM), NH₄Cl: cloreto de amônia (10 mM), GSH: glutathione (100 µM), QND: quinidina (50 µM), VO₄: vanadato de sódio (1 mM), VRP: verapamil (50 µM), NDF: nifedipina (50 µM) e BSO: *buthionine sulfoximine* (5 mM). Letras diferentes indicam diferença estatística com 5% de significância pelo teste Tukey para os teores do alcalóide nas células (maiúsculas) e no meio (minúsculas). Médias de 3 repetições.

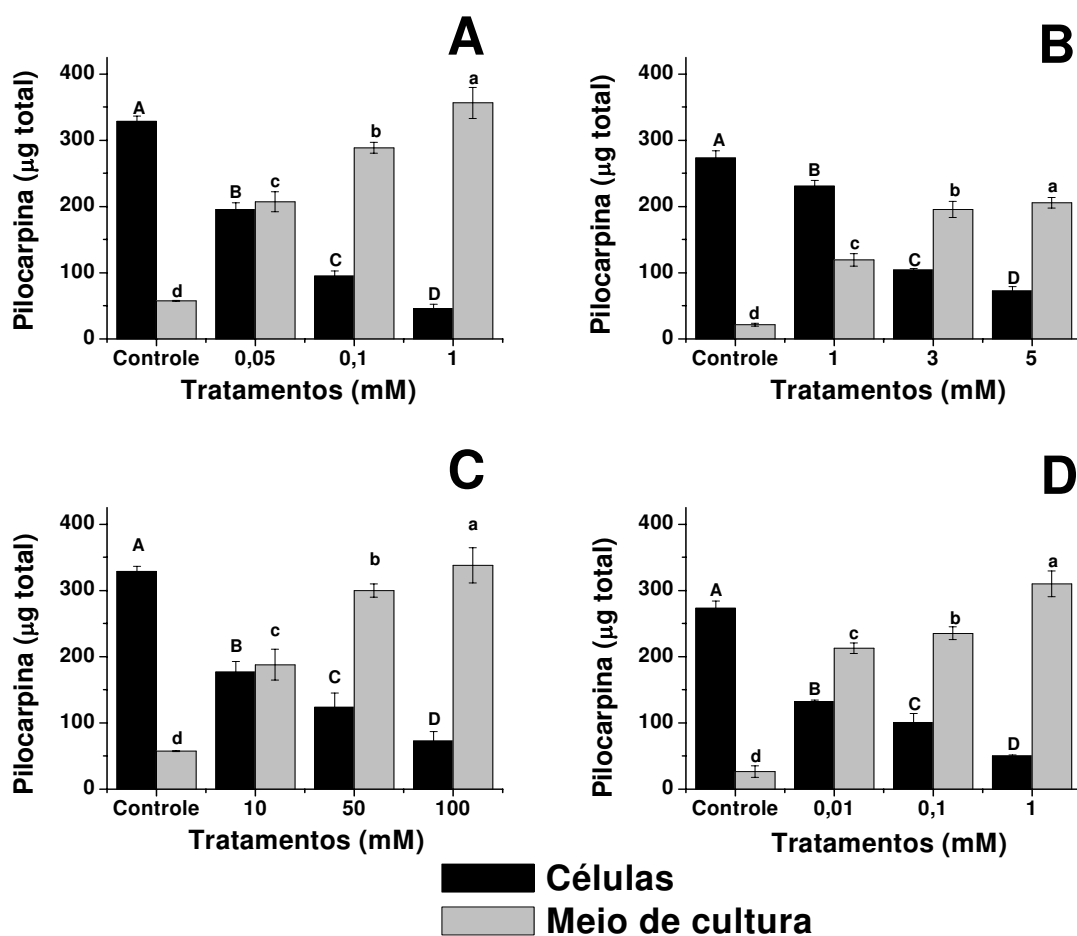


Figura 11. Efeito de diferentes doses de inibidores na absorção de pilocarpina. Azida sódica (A), buthionine sulfoximine (B), ciclosporina (C) e vanadato de sódio (D). A absorção de pilocarpina foi medida 10 horas após a adição do alcalóide. Letras diferentes indicam diferença estatística com 5% de significância pelo teste Tukey para os teores do alcalóide nas células (maiúsculas) e no meio (minúsculas). Média de 3 repetições.

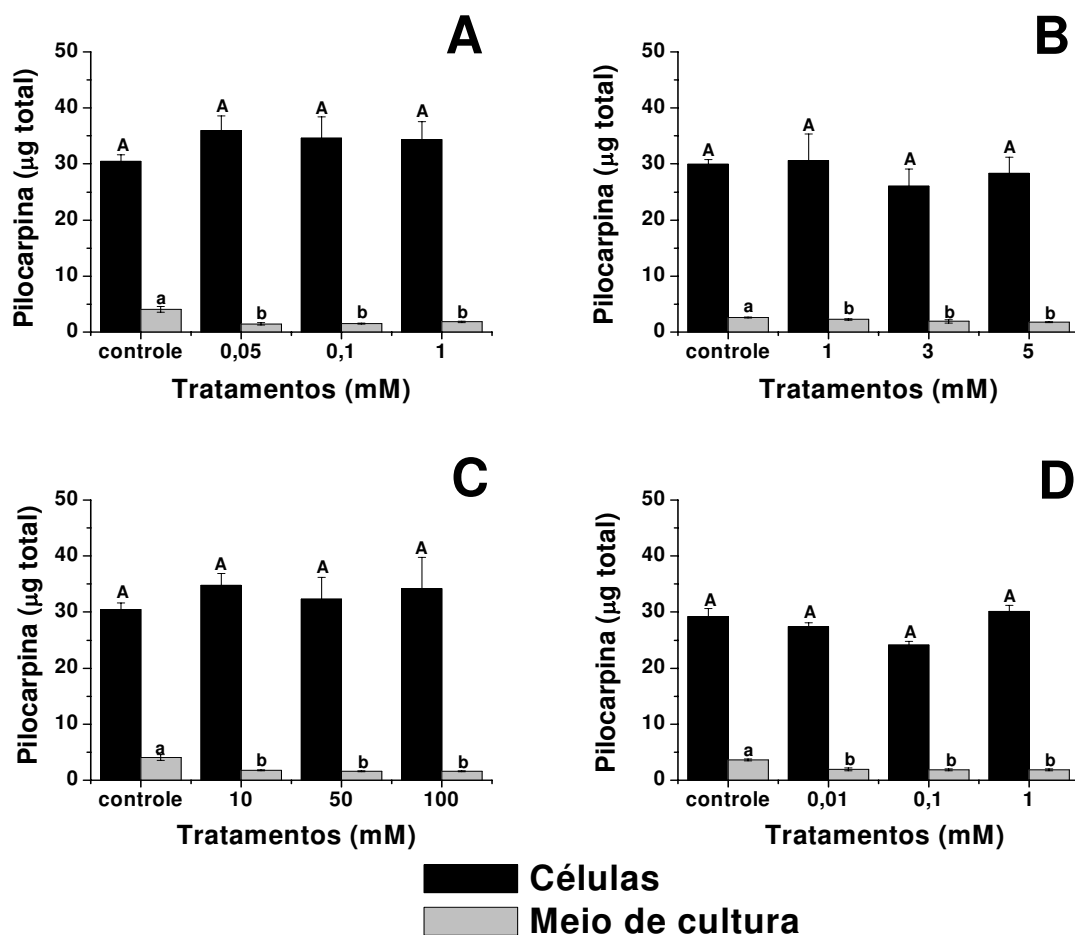


Figura 12. Efeito da dose dependência na inibição de liberação de pilocarpina da azida sódica (A), buthionine sulfoximine (B), ciclosporina A (C) e vanadato de sódio (D). A liberação de pilocarpina foi medida 10 horas após a adição dos inibidores. Letras diferentes indicam diferença estatística com 5% de significância pelo teste Tukey para os teores do alcalóide nas células (maiúsculas) e no meio (minúsculas). Média de 3 repetições.

Inibição da absorção e liberação de pilocarpina em função do pH do meio de cultura

Neste ensaio, no qual testou-se a interação entre os meio de cultura com pHs 5,8 e 9,8 com inibidores, os resultados confirmaram que a absorção de pilocarpina (0,25 mM) é favorecida em valores de pH mais baixos (figura 13), como já observado anteriormente (ver figura 6). Em ambos os valores de pH do meio, também ocorreu a inibição da absorção do alcalóide com os três inibidores utilizados. Em um mesmo pH a ação da quinidina, nifedipina e vanadato foram muito semelhantes, não apresentando diferenças estatisticamente

significativas. Já ao comparar-se a ação de cada inibidor entre os pHs aparentemente pode-se concluir que a ação inibitória de todos eles foi maior no pH 9,8, porém, deve-se levar em conta que o próprio pH (controle) por si só já diminuiu muito a absorção de pilocarpina, podendo ser assim, um efeito aditivo. Portanto, a princípio os inibidores foram eficientes independentes do pH do meio.

Quanto à liberação de pilocarpina para o meio de cultura (figura 14), os resultados dos tratamentos não foram tão evidentes quanto os de absorção. Ao final de 12 h de acompanhamento não se verificou diferenças significativas entre os tratamentos com e sem inibidores em cada pH. Porém, é evidente que as células no pH 5,8, na presença de inibidores, apresentaram uma tendência de maior acúmulo de pilocarpina, sugerindo uma inibição dependente de pH na liberação do alcalóide.

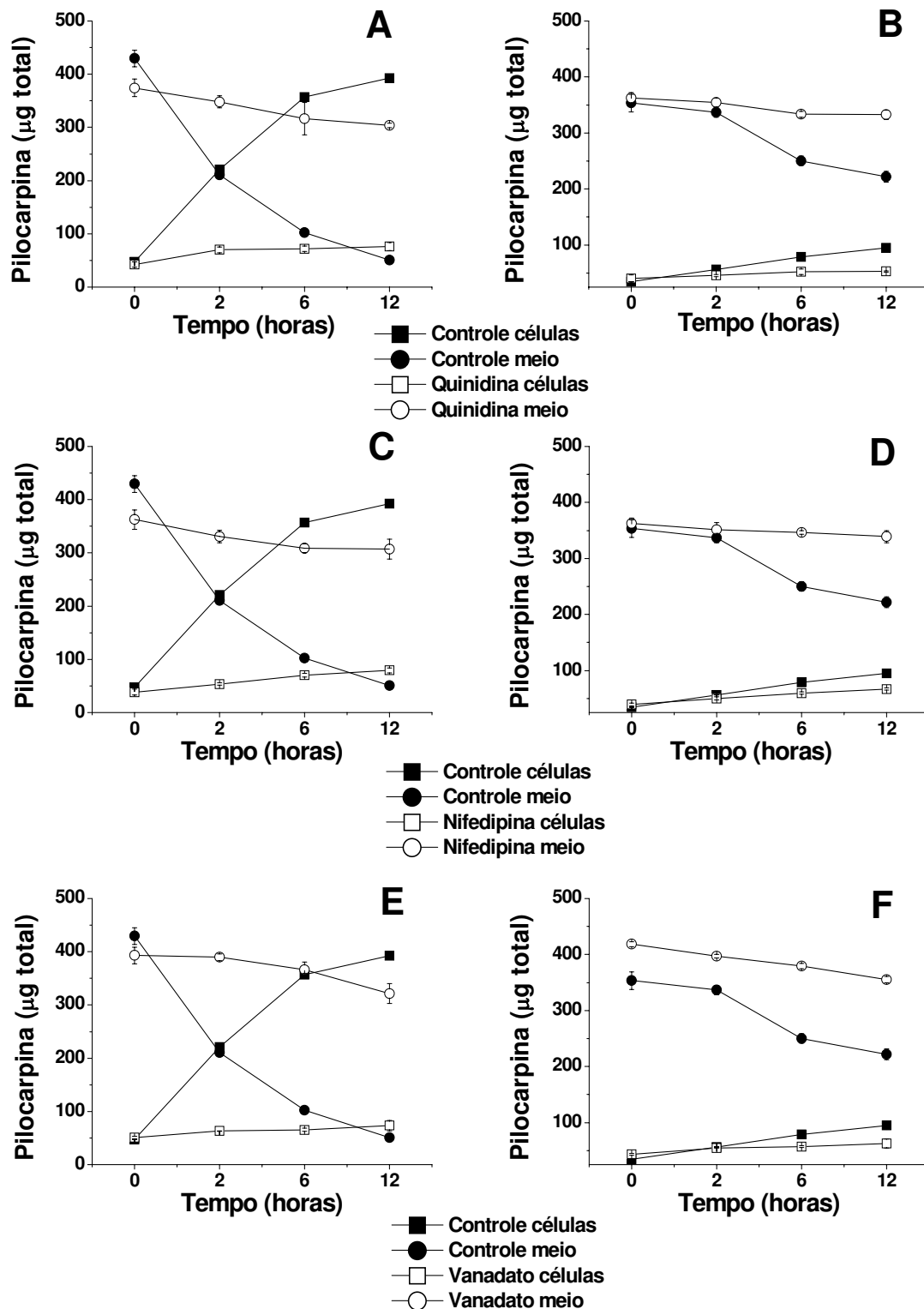


Figura 13. Influência do pH do meio de cultura na absorção de pilocarpina (0,25 mM) submetendo as células a diferentes inibidores. Com e sem quinidina em pH 5,8 (A) e pH 9,8 (B); com e sem nifedipina em pH 5,8 (C) e pH 9,8 (D) e com e sem vanadato em pH 5,8 (E) e pH 9,8 (F). Médias de 3 repetições.

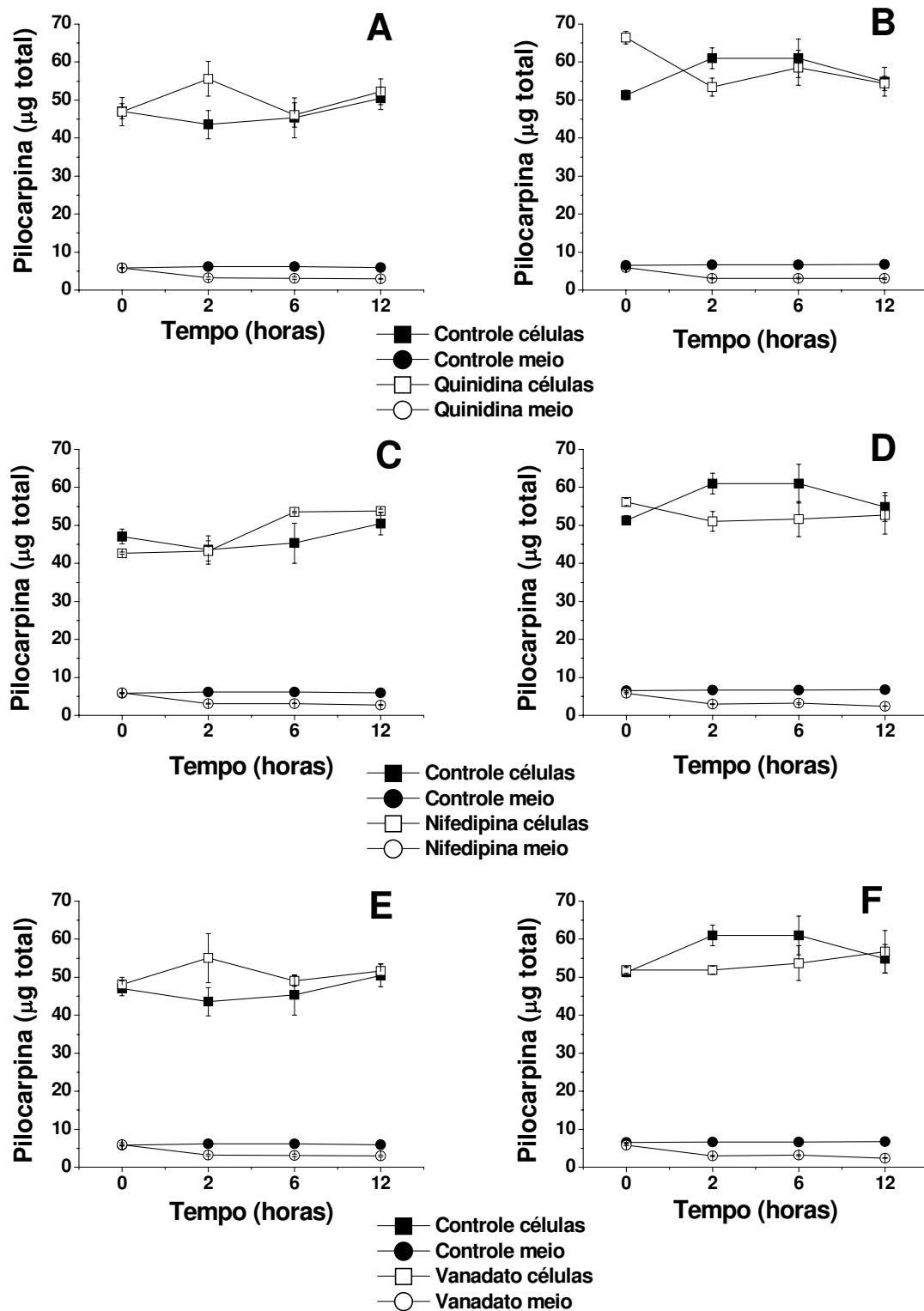


Figura 14. Influência do pH do meio de cultura na liberação de pilocarpina, submetendo as células a diferentes inibidores. Com e sem quinidina em pH 5,8 (A) e pH 9,8 (B); com e sem nifedipina em pH 5,8 (C) e pH 9,8 (D) e com e sem vanadato em pH 5,8 (E) e pH 9,8 (F). Médias de 3 repetições.

Cinética de inibição

Para estes ensaios utilizamos concentrações de pilocarpina baseados nos resultados do ensaio de marcha de absorção, sendo escolhido desde concentrações baixas do alcalóide que não saturassem o mecanismo de absorção, até concentrações mais elevadas. Também foram escolhidos dois inibidores, o vanadato, inibidor tanto de ATPases como de ABC proteínas, e a nifedipina, que inibe proteínas ABC.

O valor do K_m para ambos os tratamentos sem inibidor foi igual a 0,062 mM, muito semelhante ao valor de K_m encontrado para no ensaio de marcha de absorção (0,064 mM). Já o valor desta constante na presença de ambos os inibidores foi alterada (aumenta) e o valor de $V_{m\acute{a}x}$, não, o que indicam a ocorrência de uma inibição do tipo competitiva. Além disso, a partir da inclinação das retas dos gráficos de inibição (figura 15) pode-se perceber uma forte inibição da absorção de pilocarpina por ambos os inibidores, como fica evidente pelos baixos valores de K_i encontrados (figuras 16 A e B). Os valores desta constante para a nifedipina e vanadato foram 2 μ M e 5 μ M, respectivamente.

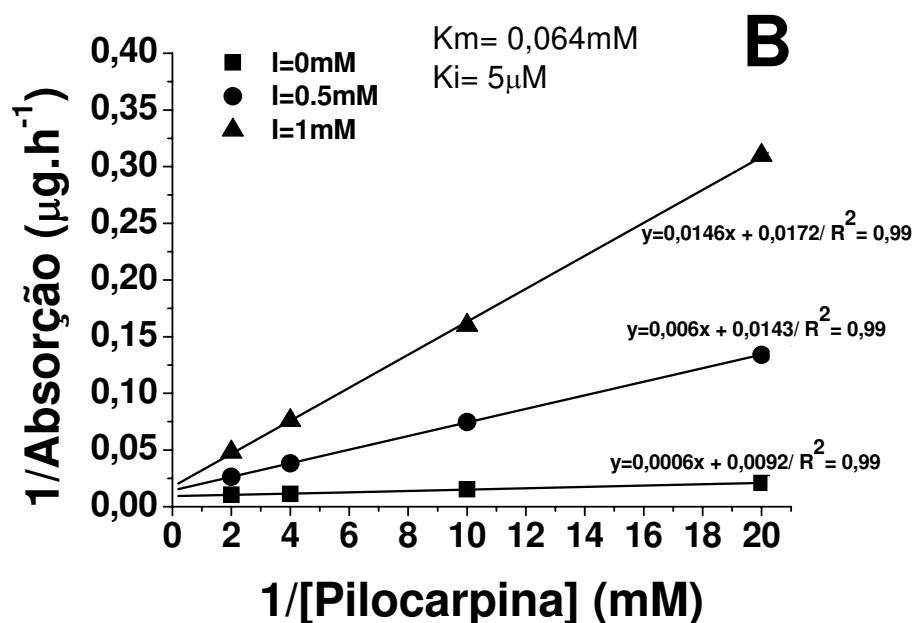
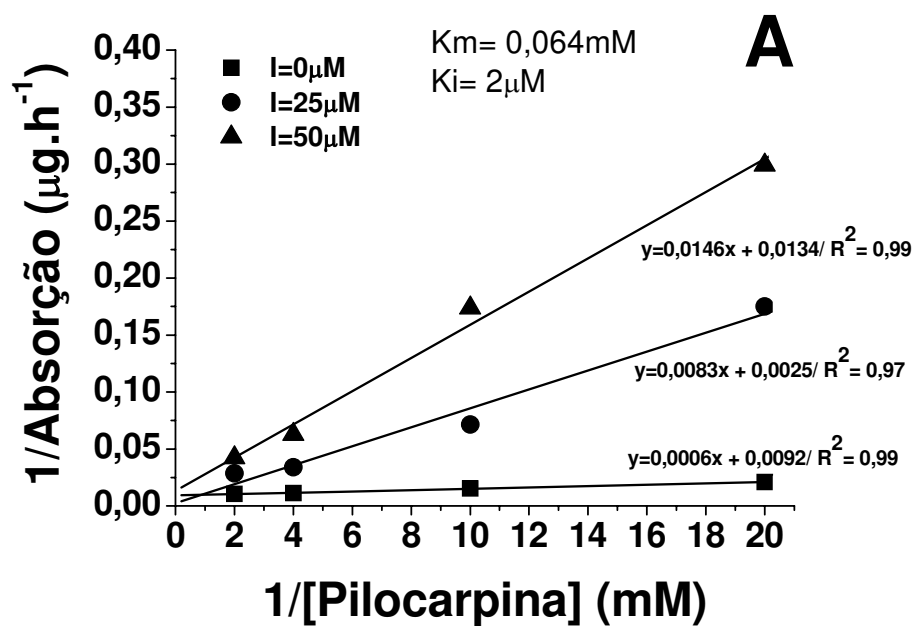


Figura 15. Gráficos primários para obtenção de K_m . Relação entre a concentração de substrato e absorção na presença dos inibidores nifedipina (A) e vanadato de sódio (B) segundo o modelo de Lineweaver-Burke. Média de 3 repetições.

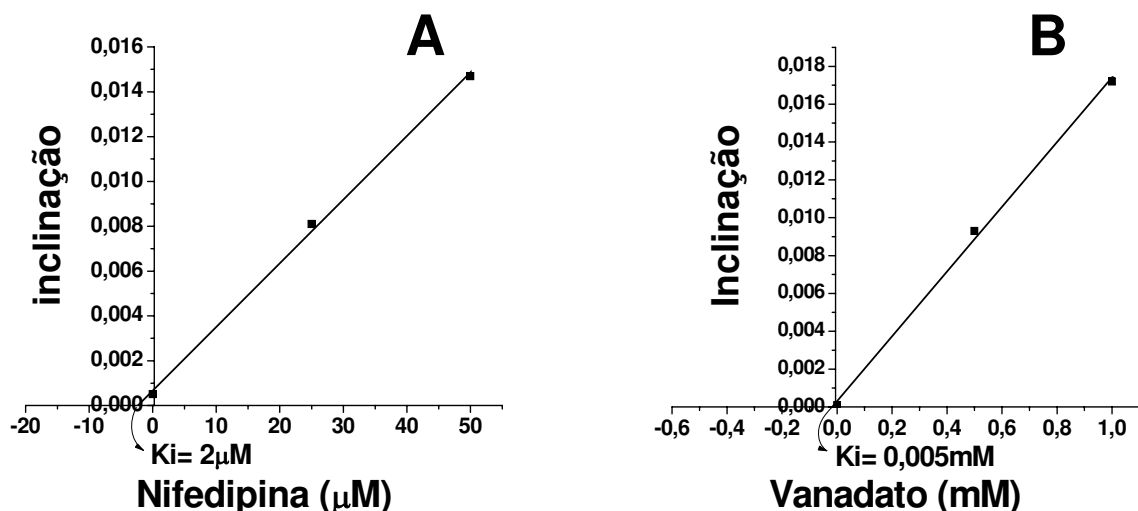


Figura 16. Gráficos secundários para obtenção de K_i através da extrapolação da reta obtida através da plotagem das concentrações de inibidores com suas respectivas inclinações das retas obtidas no gráfico primário. K_i da nifedipina (A) e K_i do vanadato de sódio (B).

Curva de crescimento na presença de inibidores

Nos resultados obtidos (figura 17) foi possível observar que o crescimento das células para todos os tratamentos foi menor nos primeiros 4 dias de cultivo, havendo diferença estatística das massas das células neste dia de subcultivo, em relação ao controle, mas sem diferença estatística ao comparar-se a massa celular dos tratamentos entre si

Contudo, ao final de 20 dias, as células submetidas a cada um dos inibidores e ao DMSO se recuperaram e a massa final de todos os tratamentos, em relação à massa do controle mostrou-se muito semelhante e não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

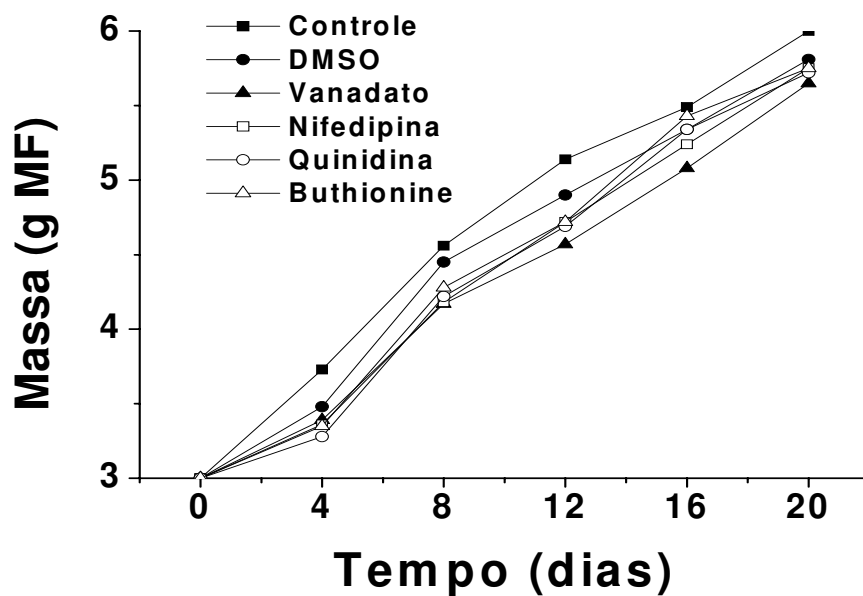


Figura 17. Curva de crescimento de suspensões de *Pilocarpus microphyllus* na presença dos diferentes inibidores. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Médias de três repetições.

DISCUSSÃO

Nos últimos 30 anos vários trabalhos têm mostrado a existência de sistemas específicos de transporte de metabólitos secundários, em particular alcalóides, tanto na membrana plasmática como para o vacúolo. São exemplos: serpentina em vacúolos de *Catharanthus roseus* (Deus-Neuman & Zenk 1984); (S) reticulina e S-escoulerina em vacúolos de *Fumaria capreolata* (Deus-Neuman & Zenk 1984); pyrrolizine N-óxido em células e vacúolos de *Senecio* (Ehmke *et al.*, 1987 e 1988), alcalóides quinolizínicos em células e vacúolo de *Lupinus polyphyllus* (Wink, 1987; Wink & Mende, 1987; Mende & Wink, 1987), berberina em células e vacúolos de *Coptis japonica* (Sato *et al.*, 1992 e 1994; Sakai *et al.*, 2002; Shitan *et al.*, 2003; Otani *et al.*, 2005), berberina em células de *Thalictrum minus* e *T. flavum* (Yamamoto *et al.*, 1987 e 1989; Terasaka *et al.*, 2003), entre outros. Nesta tese procurou-se identificar e caracterizar este sistema de transporte para o alcalóide pilocarpina em suspensões celulares de *P. microphyllus*.

Localização subcelular e citotoxicidade da pilocarpina

Inicialmente buscou-se determinar qual o(s) local(is) de armazenagem de pilocarpina nas células de jaborandi. Em seguida, procurou-se verificar se há um limite de estocagem do alcalóide, gerando toxicidade, tendo em vista que alguns autores discutem que a capacidade de armazenagem do vacúolo talvez seja um fator limitante para produção destes compostos em suspensões celulares (Zenk, 1978)

Apesar de não conclusivos por causa da limitação metodológica, os resultados de localização subcelular com folhas e com os tratamentos com células em suspensão sem e com fornecimento de pilocarpina, sugerem seu acúmulo no vacúolo, ainda que esta fração venha

misturada com o conteúdo do citoplasma. Os resultados dos testes histoquímicos também indicam para esta hipótese.

Diversos trabalhos destacam o vacúolo como uma importante organela das células vegetais, no que se refere à compartimentalização de enzimas (Boller and Kende 1979; Leigh *et al.*, 1979) e íons inorgânicos (Leigh and Deri Tomos, 1983), ao acúmulo de sais, ácidos orgânicos (Martinoia *et al.*, 1985) e açúcares (Komor *et al.*, 1982), assim como de metabólitos secundários, incluindo alcalóides (Matilde, 1978; Neumann *et al.*, 1983; Kreis & Reinhard, 1987; Ehmke *et al.*, 1987). O papel do vacúolo na estocagem dessas substâncias muitas vezes se relaciona a um mecanismo de detoxificação.

As informações sobre a localização subcelular em adição aos dados de toxicidade mostraram que pilocarpina apresenta forte citotoxicidade a cultura de plantas que não apresentam sua via de biossíntese, visto que o crescimento das culturas de *C. arabica* foi fortemente afetado. Culturas de *P. microphyllus* produtoras de pilocarpina apresentaram uma clara tolerância às altas doses do alcalóide (crescimento semelhante ao controle), mesmo que não produzindo o alcalóide em altas quantidades. Isto sugere a existência de um mecanismo de detoxificação específico-específico nas células aqui estudadas, como já sugerido em outros trabalhos com cultura de tecidos (Sakai *et al.*, 2002, Terasaka *et al.*, 2003).

Trabalhos com *C. japonica* (Sato *et al.*, 1992 e 1994; Sakai *et al.*, 2002) e *Thalictrum minus* (Yamamoto, 1987; Terasaka *et al.*, 2003) demonstraram que culturas celulares destas plantas, naturalmente produtoras do alcalóide berberina, apresentaram tolerância a este alcalóide quando adicionado no meio, respectivamente de 10 e 20 vezes maior em relação a culturas controle não produtoras.

No estudo com *Thalictrum minus* os autores sugerem que a célula evita a toxicidade da berberina, excretando o alcalóide para o meio de cultura. Após fornecerem às células, o seu precursor (benziladeína), as células sintetizam a berberina e a excretam para o meio de cultura.

Já no caso de *C. japonica* verificou-se que este alcalóide é absorvido e transportado para o vacúolo (Sato & Yamada 1984; Sato *et al.*, 1992 e 1994; Sakai *et al.*, 2002) e, portanto, sugere-se que o acúmulo vacuolar seja um dos mecanismos de detoxificação para alcalóides endógenos.

Em um outro trabalho, com suspensões celulares de *C. roseus*, Blom *et al.* (1991), observaram que o alcalóide ajmalicina se difunde livremente pela membrana do tonoplasto na sua forma neutra não protonada e acumula no vacúolo através de um mecanismo de *ion-trap* na sua forma carregada protonada. Por fim, alta concentração de ajmalicina no vacúolo estimula a ação de enzimas peroxidases (depende do estado fisiológico da célula) para sua conversão em serpentina. Neste caso a prevenção a citotoxicidade ocorre com a armazenagem e conversão do composto em um menos tóxico.

Outros estudos podem ser citados, como por exemplo, o acúmulo de látex contendo alcalóides isoquinolidínicos no vacúolo de *Chelidonium majus*, do látex contendo morfina no vacúolo de células de *Papaver somniferum* (Fairbairn *et al.*, 1974), de alcalóides pirrolizodínicos em suspensões de *Senecio vulgaris* (Ehmke *et al.*, 1988) e de nicotina em suspensões de *Nicotiana tabacum* (Kurkdjan, 1982). Em todos os casos citados, as células conseguem manter o alcalóide longe do citossol e do núcleo, onde poderia interferir em reações metabólicas fundamentais para manutenção da homeostase celular (De Luca & St. Pierre, 2000).

Assim, para o caso de *P. microphylus* acreditamos que as células evitam a toxicidade de seus alcalóides (pilocarpina e pilosina) armazenando-os no vacúolo. Além disso, os dados do ensaio de toxicidade sugerem que algo semelhante ao encontrado por Blom *et al.* (1991) pode estar ocorrendo em *Pilocarpus*, visto que nos tratamentos com altas concentrações do alcalóide (acima de 1000 μ M), grande parte do alcalóide ainda estava no meio e os teores nas células, entre estes tratamentos, era muito semelhante. Contudo a soma entre os teores

encontrados nas células e no meio foram menores que a quantidade de pilocarpina acrescida no início do ensaio. Sendo assim, as células devem absorver a pilocarpina, armazená-la no vacúolo e aos poucos o alcalóide deve ser degradado ou convertido em um outro composto.

Quanto à localização subcelular de metabólitos secundários, outra proposição bastante difundida a partir dos estudos de elucidação das vias biossintéticas de metabólitos secundários é de que, a um nível celular, a canalização de substratos para suas enzimas de conversão ou de degradação é facilitada pela compartimentalização destas em diferentes organelas e conseqüentemente de seus produtos. Por exemplo, as enzimas envolvidas na biossíntese de vindolina em *C. roseus* têm sido localizadas em cinco compartimentos subcelulares: a conversão de triptofano para triptamina ocorre no citosol, mas esta é transportada até o vacúolo para formar a strictosidina. Após outros intermediários serem produzidos em outros compartimentos, a biossíntese de vindolina ocorre no citossol, mas este alcalóide é então armazenado no vacúolo (De Carolis *et al.*, 1990).

Estudos com suspensões celulares de *C. arabica* mostraram que a compartimentalização de cafeína depende das concentrações de ácidos clorogênicos. Quando esta é baixa a cafeína fica livre no citoplasma, mas quando aumenta, ela se complexa a estes compostos e passa a ser armazenada no vacúolo (Waldhauser e Baumann, 1995).

No caso de *Pilocarpus* ainda não se conhece a via de biossíntese e degradação de seus alcalóides imidazólicos, mas o fato de toda a pilocarpina adicionada no meio ter sido absorvida e aparentemente estocada no vacúolo, com concomitante queda do nível total no sistema, poderia ser uma indicação de que o catabolismo deste alcalóide também possa ser realizado nesta organela.

Caracterização do transporte de pilocarpina nas suspensões de *P. microphyllus*

Verificado o provável local de armazenagem da pilocarpina e a existência de um

mecanismo de prevenção à citotoxicidade, procuramos caracterizar o transporte do alcalóide. Primeiro, procurou-se definir as melhores condições em que ele é absorvido e, em seguida, através do uso de inibidores de proteínas de membranas buscou-se verificar qual seria a classe de transportadores responsável pela translocação de pilocarpina, para dentro e fora da célula.

Absorção de pilocarpina e influência do pH

Células vegetais têm a capacidade de absorver e liberar seus metabólitos secundários (Pareilleux & Vinas, 1984) e estes transportes são governados por dois processos, a difusão (físico) e transporte ativo (bioquímico). A difusão é direcionada por diferenças na concentração, e ocorre sem gasto de energia pela célula. Já o transporte ativo (com gasto de energia) depende de transportadores que podem trabalhar em duas direções (transporte para fora ou dentro da célula) e com diferentes seletividades para diversos compostos e geralmente contra um gradiente de concentração. O acúmulo na célula é o resultado do balanço entre estes processos.

No que se refere ao processo de difusão, partindo-se do conhecimento de que membranas biológicas são altamente permeáveis a pequenas moléculas neutras e pouco permeáveis a aquelas em estado carregado, Matile (1976) e Neumann *et al.* (1983) reportam que estas propriedades das membranas e dos compostos permitem seu armazenamento em células vegetais. Neste sentido, dois modelos de acúmulo passivo (sem gasto de energia) foram propostos. No modelo denominado “mecanismo de *ion-trap*” os alcalóides em seu estado neutro penetram livremente para dentro da célula (difusão simples). No segundo, os alcalóides penetram nas células por um mecanismo de difusão mediada por um carreador de membrana da sua forma neutra. Em ambos os modelos os alcalóides também atravessam a membrana do vacúolo e, devido à acidez, deste compartimento os alcalóides são protonados e em estado carregado não conseguem mais atravessar a membrana, ficando assim “presos”.

Para detecção de ambos estes modelos muitas variáveis têm sido consideradas tais como, cinética de saturação da taxa de absorção dependente de concentração, estimulação do transporte por ATP, pH ótimo do meio, pKa do alcalóide, temperatura do sistema célula/meio, hidrofobicidade do alcalóide e sensibilidade do transportador a inibidores. Além disso, no modelo de transporte via carreador, a capacidade das células de reconhecerem seus alcalóides endógenos, ou seja, a presença de uma proteína que reconheça as substâncias é sempre mencionada como a variável mais importante do sistema (Deus-Neumann & Zenk, 1984, 1986).

Em nosso estudo, optou-se por verificar a influência do pH do meio de cultura nos processos de acúmulo, primeiro por ser uma variável fácil de ser alterada e monitorada e, segundo, para que se pudesse fazer uma comparação entre os pHs em que há altas produções de pilocarpina (Andreazza *et al.*, 2009) e aqueles em que ocorrem maiores taxas de absorção e liberação da substância.

Sendo o pKa da pilocarpina é 7,15, segundo os modelos de difusão simples e de difusão por carreador descritos acima, em pH neutro ou básico do meio de cultura, grande parte deste alcalóide, estaria em sua forma neutra penetrando facilmente pela célula. Já em pH ácido, passaria para um estado protonado e não conseguiria atravessar a membrana plasmática. Entretanto os resultados dos ensaios de absorção não apontam para isso, na medida em que as maiores absorções ocorreram nos pHs mais baixos que o pKa do alcalóide, quando este encontra-se em estado carregado.

Yamamoto (1989) também observou que a velocidade da absorção de berberina (pKa 2,47) em culturas de *Talictum flavum* era afetada pelo pH, contudo, neste estudo a absorção do alcalóide era favorecida em pH inicial do meio de cultura acima de 7,0, muito acima de seu pKa, no qual a porcentagem de moléculas de berberina em estado neutro era maior, o que facilitaria sua entrada por difusão ou carregada para dentro da célula.

No caso de *Pilocarpus* acredita-se que o transporte de pilocarpina deva envolver uma proteína de membrana, pois os resultados obtidos a partir da curva mostrada na figura 9 (Absorção de pilocarpina *versus* Concentração de pilocarpina) mostram uma saturação muito clara e rápida na absorção deste alcalóide, embora não seja possível, através deste resultado dizer se este carreador é passivo ou ativo. Devido à questão do pKa discutida acima e os resultados dos ensaios com inibidores e cinética, supõem-se que o transporte de pilocarpina tanto pela difusão simples como pelo auxílio de uma proteína carreadora possam contribuir para o acúmulo deste alcalóide no interior das células, mas o principal processo de transporte seria ativo

Além disso, comparando-se estes resultados a aqueles encontrados por Andreazza *et al.*, 2009, pode-se concluir que em pHs mais elevados (8,8 e 9,8) a produção do alcalóide é maior, assim como a sua permanência no meio após ser excretado para fora da célula, e por isso estas seriam as condições mais favoráveis para se cultivar as células em biorreatores, pois permitiria a reciclagem do meio, rico em pilocarpina, sem que houvesse grandes perdas devido à reabsorção do alcalóide. Nestes pHs a viabilidade celular também não estaria comprometida, pois o crescimento das culturas mostrou atingir taxas semelhantes à condição controle (pH 5,8).

Inibição das proteínas de transporte transmembrana

O sistema de transporte de metabólitos secundários em células vegetais é frequentemente relatado como sendo dependente de energia, com a participação de ATPases (Yamamoto *et al.*, Deus-Neumann and Zenk, 1986; Mende and Wink, 1987) e nos últimos anos tem sido estudada a participação de proteínas ABC no transporte de alcalóides. Para se estudar a participação destas proteínas em vias de transporte de metabólitos algumas características de seus mecanismos de ação devem ser consideradas.

Em plantas, as ATPases atuam como bombas de prótons (H^+ -ATPase), acoplando a hidrólise do ATP ao transporte de prótons para fora da célula, o que estabelece um gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, que é dissipado pelo transporte secundário, quando um transportador protéico se acopla ao H^+ fora da célula e media a passagem de uma substância para dentro (simporte) ou para fora (antiporte) da célula (Dulby and Boltry, 2009). O transporte primário é o que é feito com a própria ATPase no que se refere ao H^+ .

Três aspectos importantes definem proteínas ABC. Primeiro o fato de seu transporte ser diretamente energizado por MgATP, e não por ATP livre ou por análogos não hidrolizáveis do ATP. Segundo, este mecanismo de transporte é insensível a diferenças de potencial eletroquímico da membrana. E, terceiro, este transporte é bastante sensível ao vanadato (Rea, 2007).

A partir destas características e com o uso de inibidores específicos para cada uma destas famílias de proteínas de transporte, procuramos levantar evidências de qual delas estaria atuando no transporte de pilocarpina em *P. microphyllus*. Os inibidores escolhidos foram aqueles que sob certas concentrações já se verificou a inibição de proteínas ABC ou ATPases (Hu et al., 1996; Klein et al., 1996; Terasaka et al., 2003; Sakai et al., 2002)

A azida sódica é responsável por afetar a atividade da enzima citocromo oxidase, resultando na diminuição do ATP intracelular (Wigler e Patterson, 1994), afetando tanto ATPases como proteínas ABC. A ciclosporina A, quinidina, nifedipina e verapamil são inibidores de transportadores ABC. O verapamil e a nifedipina também bloqueiam a atividade de canais de cálcio. Já NH_4^+ em altas concentrações, como as utilizadas nos ensaios, é responsável por destruir o ΔpH através da membrana, e assim afeta a atividade de ATPases (Shitan *et al.*, 2003). Já a bafilomicina e o vanadato de sódio são substâncias responsáveis por inibir a atividade de diferentes tipos de ATPases, como P-type e V-type (Ambudkar *et al.*, 1992; Droese & Altendorf, 1997). Vários trabalhos também reportam a função inibitória que o

vanadato tem sobre proteínas ABC (Senior *et al.*, 1995; Urbatsch *et al.*, 1995a, 1995b). Como alguns metabólitos secundários são absorvidos como conjugados de glutathione para o vacúolo das células por outra sub-família de ABC proteínas, as MRPs (multi-drug resistance associated proteins) (Zaman *et al.*, 1995), a dependência da absorção de pilocarpina também foi testada usando-se buthionine sulfoximine, um inibidor específico da gamma-glutamylcisteina sintase que causa a depleção da glutathione intracelular (Campbell *et al.*, 1991, Lu *et al.*, 1998).

As menores taxas de inibição na absorção e liberação provocadas pela bafilomicina (< 30% de inibição) e pelo NH₄Cl (< 50% de inibição) não descartam a participação de uma ATPase, mas podem indicar uma menor participação destas proteínas, visto que a inibição provocada pela azida sódica, que afetaria tanto proteínas ABC como ATPases, foi muito intensa (> 75% de inibição). Contudo, os resultados de absorção e liberação de pilocarpina mostraram intensa inibição na presença dos inibidores de ABCs o que aponta para um transporte de pilocarpina mediado por esta família de proteínas, tanto para fora como para dentro da célula.

Já resultados encontrados nos tratamentos com buthionine sulfoximine e glutathione são divergentes. A adição de buthionine provocou uma queda intensa na absorção de pilocarpina, semelhante a aquela encontrada para os outros inibidores de ABC e isso seria uma evidência de que a pilocarpina possa ser armazenada no vacúolo através de conjugados glutathionados. Contudo, a queda na absorção de pilocarpina com a adição de glutathione, que teoricamente deveria ajudar na absorção do alcalóide põe em dúvida esta hipótese.

Sakai *et al.* (2002) procuraram caracterizar o transporte de berberina em suspensões de *C. japonica* e observaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, mas apenas para a absorção do alcalóide. Estes resultados com *C. japonica* foram confirmados por Shitan *et al.* (2003), que mostraram a participação de uma proteína MDR na absorção de berberina.

Entretanto, a variação do pH do meio de cultura não afetava a absorção de berberina pelas células, enquanto que em nosso estudo, de alguma maneira, a absorção foi favorecida na faixa de pH entre 5,8 – 7,2. Também, nos ensaios com inibidores em pHs ácidos e básicos do meio de cultura, no qual, procurou-se avaliar a ação conjunta de pHs bastante divergentes com inibidores, os resultados reforçam a idéia de que há uma faixa de absorção ótima de pilocarpina, na medida em que no pH básico (9,8) a absorção foi menor que nos tratamentos com pH 5,8, na presença dos mesmos inibidores.

A faixa de pH na qual a absorção de pilocarpina é mais intensa é muito semelhante ao pH citoplasmático da célula, próximo a pH 7,0. Desta forma, quando as células são submetidas a estes pHs sua atividade metabólica geral não fica comprometida pela necessidade de ajustar o pH do meio a um valor mais favorável para manutenção da sua homeostase e por isso, processos de transporte pela membrana não seriam afetados, inclusive o responsável pelo transporte dos alcalóides.

Cabe ressaltar que uma das explicações bastante recorrentes na literatura quanto as variações do pH se deve a mudanças no conteúdo de NH_4^+ e NO_3^- resultado de uma absorção diferencial destes nutrientes pelas células. No trabalho aqui apresentado o teor destes nutrientes não foi analisado, mas Andreazza *et al.*, 2009, trabalhando com as mesmas células e com os mesmos pHs, dosaram os teores destes nutrientes. Altas absorções de NO_3^- podem causar quedas no pH devido a liberação de H^+ para o meio de cultura via ATPases, e aqui mais uma vez se destaca a participação indireta destas proteínas no transporte de alcalóides. A absorção de NH_4^+ ocorre em pHs altos, quando o NH_4^+ pode reagir com o OH^- gerando H_2O e NH_3 , o qual é absorvido pelas células (Minocha, 1987; Salisbury & Ross, 1991). Até que isso ocorra de tal forma a diminuir o valor do pH até valores mais baixos, a entrada do alcalóide na célula é pequena, como pudemos observar em ensaios de absorção. Quando atingir valores mais próximos a 6-6,8 é provável que a absorção de pilocarpina aumente.

Cinética de inibição

Diferentes tipos de moléculas são capazes de interferir na atividade de proteínas com atividade enzimática, ou no caso aqui estudado, proteínas de transporte transmembrana. Estes podem ser metabólitos endógenos da célula que inibem a ação de uma proteína em particular como mecanismo normal de controle da via metabólica ou processos de transporte da qual ela participa (Hames *et al.*, 1997). Outros inibidores podem ser substâncias externas como toxinas ou drogas, como é o caso de nossos ensaios nos quais utilizamos substâncias sintéticas e cuja ação foi explicada no item acima.

Tanto para a nifedipina como para o vanadato foi possível afirmar a partir dos valores de K_m que a inibição é do tipo competitiva reversível. Neste tipo de inibição, o inibidor compete com o substrato pelo sítio de ligação na proteína. Assim a proteína pode se ligar a pilocarpina ou ao inibidor, mas não com ambos ao mesmo tempo. Neste tipo de inibição, em altas concentrações do substrato a ação do inibidor competitivo pode ser superada. Isto pode ser observado no ensaio de inibição (figura 15), no qual a absorção de pilocarpina foi semelhante ao controle em altas concentrações do alcalóide e na presença de inibidor. Além disso, neste tipo de inibição, não há alteração da V_{max} , mas a sua afinidade ao substrato decresce na presença do inibidor competitivo e assim o K_m aumenta. Estes fenômenos puderam ser constatados para ambos os inibidores testados.

Em relação à ação de cada inibidor, foram determinados seus K_i 's a partir da construção de gráficos secundários com os valores de inclinação das retas. O K_i obtido para o inibidor nifedipina foi igual a 2 μM enquanto que o valor de K_i para o vanadato de sódio foi igual a 5 μM . Estes valores mostram que as concentrações usadas neste ensaio foram muito superiores que as concentrações de inibidor necessária para causar inibição do transporte de pilocarpina e estão em concordância com os resultados do ensaio de inibição (figura 9). O valor de K_i da nifedipina foi menor que aquele encontrado para o vanadato de sódio, o que nos

permite afirmar que a ação inibitória da nifedipina na absorção de pilocarpina pelas células foi mais intensa que o vanadato.

Pelo fato dela ser um inibidor específico para ABC proteínas, aqui, mais uma vez pode-se relacionar a participação desta família de proteínas no transporte de pilocarpina nas suspensões, como discutido anteriormente. Por fim, cabe ressaltar que o efeito inibitório do vanadato de sódio observado neste ensaio é resultado da inibição que ele causou tanto nas ATPases e ABC proteínas, caso, de fato, ambas participem do transporte de pilocarpina

Considerações finais

Apesar de não conclusivos, os dados obtidos do fracionamento celular e dos testes histoquímicos indicam que o acúmulo de pilocarpina nas células é feito no vacúolo, como forma de prevenção à citotoxicidade deste alcalóide, evitando que este eventualmente interfira em reações no citoplasma e núcleo o que poderia comprometer a viabilidade celular nas culturas.

A pilocarpina pode apresentar forte citotoxicidade a culturas de células que não a produzem naturalmente, como observado em *C. arabica*, mas as células que possuem sua via de biossíntese são tolerantes a altas doses deste alcalóide.

Os resultados de menor absorção de pilocarpina em valores de pH do meio de cultura mais elevados unida aos dados de estudos prévios de que as maiores taxas de produção de pilocarpina pelas células também ocorrer em valores de pH altos, sugere-se que o cultivo de células em biorreatores seja ideal nestes valores de pH na medida em que permitiria a reciclagem do meio, rico em pilocarpina, sem que houvesse grandes perdas devido à reabsorção do alcalóide.

Acredita-se que a absorção de pilocarpina pelas células de jaborandi ocorra principalmente devido a processo ativo, através de uma proteína transmembranar da família

dos transportadores ABC, subfamília MDR, com uma possível participação secundária de proteínas ATPases. Tal conclusão foi de certa forma confirmada pelos dados de cinética, nos quais se utilizou os inibidores nifedipina e vanadato, ambos inibidores de ABCs e o vanadato de sódio, também inibidor de ATPases.

LITERATURA CITADA

- Abreu I.N., Sawaya A.C.H.F., Eberlin M.N., Mazzafera P., 2005. Production of pilocarpine in callus of Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 41(6): 806-811.
- Abreu, I.N., Andreazza, N. L., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Mazzafera, P., 2007a. Cell suspension as a tool to study the biosynthesis of pilocarpine in Jaborandi. Plant Biology, 9(6):793-799.
- Abreu, I.N., Mazzafera, P., Eberlin, M.N., Zullo, M.A.T., Sawaya, A.C.H.F., 2007b. Characterization of the variation of the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21(7):1205-1213.
- Ambudkar, S.V. Lelong, I.H., Zhang, J., Cardarelli, C.O., Gottesman, M.M., Pastan, I., 1992. Partial purification and reconstitution of the human multi-drug resistance pump: characterization of the drug stimutable ATP hydrolysis. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 89:8472-8476.
- Andrade-Netto, M. Mendes, P.H., Silveira, E.R., 1992. An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachyllopus*. Phytochemistry, 42: 231-237.
- Andreazza, N. L., Abreu, I.N., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Mazzafera, 2009. Production of imidazole alkaloids in cell cultures of jaborandi as affected by the medium pH. Biotechnology Letters, 31:607-614
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature, 408:796-815.
- Arango, M., Gevaudant, F., Oufattole, M., Boutry, M., 2003. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. Planta, 216:355-365.
- Arondee, Chantana, Fawcett, J. P., Ferguson, M.M., Ledger, R., 1996. Serum pilocarpine Esterase activity and response to oral Pilocarpine. Biochemical and Molecular Medicine, 59:57-61.
- Avancine, G., Abreu, I.N., Saldana, M.D.A., Mohamed, R.S., Mazzafera, P., 2003. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. Phytochemistry, 63:171-175.

- Balestri E, Cinelli F., 2001. Isolation and cell wall regeneration of protoplasts from *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*. *Aquatic Botany*, 70:237-242
- Baricevic, D.; Umek, A.; Kreft, S.; Maticic, B.; Zupancic, A., 1999. Effect of water stress and nitrogen fertilization on the content of hyoscyamine and scopolamine in the roots of deadly nightshade (*Atropa belladonna*). *Environmental and Experimental Botany*., 42:17-24.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov. M., Harper, J.F., Axelsen, K. B., 2003. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 132:618–628
- Beasley and Fraunfelder, 1991. In: Gilman, A.G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Editora Guanabara Koogan, p.1232.
- Boller, T., Kende, H., 1979. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiology*, 63, 112-1132.
- Campbell, E.B. Hayward M.L., Griffith, O.W., 1991. Analytical and preparative separation of the diastereomers of L-bhutionine (SR)-sulfoximine, a potent inhibitor of glutathione biosynthesis. *Analytical Biochemistry*, 194:268-277.
- Carvalho, L. M., 2004. Merck explora a brasileira fava d’anta. “O estado de São Paulo”.
- Chen, C. J., Chin, J.E., Ueda, K., 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug- resistance human cells. *Cell*, 47:381-389.
- Corrêa, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*, Vol. 4, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. p.360-369, 1969.
- Davies, A.N., Broadley, K.; Beighton, D., 2001. Xerostomia in patients with advanced cancer. *Journal of Pain and Symptom Management*., 22:820-825.
- Dassa, E., Bouige, P., 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and function classification of ABC systems in living organisms. *Research in Microbiology*, 152:211-229.
- Decarolis, E., Chan, F., Balsevich, J., 1990. Isolation and characterization of a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase involved in the 2nd-to-last step in vindoline biosynthesis. *Plant Physiology*, 94(3):1323-1329.
- De Luca, V., St-Pierre, B., 2000. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Science*, 5:168-173.
- Deus-Neumann, B., Zenk, M.H., 1984. A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta*, 162:250-260.

- Deus-Neumann, B., Zenk, M.H., 1986. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism. *Planta*, 167:44-53.
- Dewick, P.M., 1997. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic approach*, John Wiley & Sons, New York, p.352-353.
- Dixon, R.A. , 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon RA, Eds. *Plant Cell Culture. A Practical Approach*. Irl Press: Oxford, Washington, Dc, p.1-20.
- Drose, S., Altendorf, K., 1997. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *The Journal of Experimental Biology*, 200:1–8.
- Dulby, G & Boltry, M. 2009. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.*, 457(3):645-655.
- Ehmke, A., von Borstel, K.Hartmann, T., 1987. Specific uptake of N-oxides pyrrolizidine alkaloids by cells, protoplasts and vacuoles from *Senecio* cell cultures. In: *Plant vacuoles their importance in solute compartmentalization in cell and their application in plant biotechnology*, pp. 301-304, Marin, B., ed. Plenum Press, New York.
- Ehmke, A., von Borstel, K.Hartmann, T., 1988. Alkaloid N-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 176:83-90.
- Fairbairn, J.W., Hakim, F., ElKheir, Y., 1974. Alkaloidal storage, metabolism and translocation in the vesicles of *P. sornniferum* latex. *Phytochemistry*, 13:1133-1139.
- Felter, H.W., Lloyd, J.U., 1898. *Kings American Dispensatory in 1898*, Apud Harnack and Meyer (Chem. Centralblatt 1880).
- Filippi, S.B., Azevedo R.A., Sodek L., Mazzafera, P., 2007. Allantoin has a limited role as nitrogen source in cultured coffee cells. *Journal of Plant Physiology*, 164(5):544-552.
- Furr, M. & Mahberg, P.G., 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 49:153-159.
- George, E.F., Sherrington, P.D., 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd., Eversley, England, pp.39-71.
- Gevaudant, F., Duby, G., von Stedingk, E., Zhao, R., Morsomme, P., Boutry, M., 2007. Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiology*, 144:1763-1776.

- Godoy-Hernandez, G. C., Vazquez-Flota, F. A., Loyola-Vargas, V. M., 2000. The exposure to trans-cinnamic acid of osmotically stressed *Catharanthus roseus* cells cultured in a 14-1 bioreactor increases alkaloid accumulation. *Biotechnology Letters*., 22:921-925.
- Goodno, C.C., 1979. Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 76:2620-2624,
- Gottesman, M. and Pastan, I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry*., 62:85–427.
- Hames, B.D., Hooper, N.M. Houghton, J.D., 1997. *Instant Notes in Biochemistry*.
- Hardy, E. B., 1875. *Societe Chimique de France*, [2], 24, 497.
- Hemscheidt, T., Spenser, I.D., 1991. Biosynthesis of an osmine, an imidazolic alkaloid of the orchid *Dendrobium parishii*. *Journal of Chemical Society- Chemical Communications*, 7:494-497.
- Higgins, C.F., 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8:67–113.
- Higgins, C.F., Linton, K.J., 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structure and Molecular Biology*. 11:918-926.
- Hill, R.K. & Barcza, S., 1966. Stereochemistry of the jaborandi alkaloids. *Tetrahedron*, 22:2889-2893.
- Hu, Y.P., Chapey, C., Robert, J., 1996. Relationship between the inhibition of azidopine binding to P-glycoprotein by MDR modulators and their efficiency in restoring doxorubicin intracellular accumulation. *Cancer Letters*, 109:203-209.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis). Portaria nº 06N, *Diário Oficial, Brasília*, p. 870- 872, janeiro 15, 1992.
- Jin, H., Liu, D., Zuo, K., Gong, Y., Miao, Z., Chen, Y., Ren, W., Sun, X., Tang, K., 2007. Molecular cloning and characterization of Crmdr1, a novel MDR-type ABC transporter gene from *Catharanthus roseus*. *DNA Sequence, The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 18(4):316-325.
- Joseph, C. J., 1967. Revisão sistemática do gênero *Pilocarpus* (ssp. brasileiras). *Mecânica Popular, Rio de Janeiro*, Outubro, p.1-9.
- Juliano, R.L., Ling, V., 1967 A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutant. *Biochimica and Biophysica Acta*, 457:152-162.
- Kaastra, R. C. 1982. *Pilocarpinae (Rutaceae)*. *Flora Neotropica, Monograph # 33*. New York Botanical Garden; New York. 1982.

- Kass, M.A., Heuer, D.K., Higginbotham, E.J., 2002. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Archives of Ophthalmology.*, 120:701-713.
- Klein, M., Weissenböck, G., Dufaud, A., Gaillard, C., Kreuz, K., Martinoia, E., 1996. Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucosid and herbicide glucoside. *Journal of Biological Chemistry*, 271:29666-29671.
- Komor, E., Thom, M., Maretzki, A., 1982. Vacuoles from sugarcane suspension cultures. III. Protonmotive potential difference. *Plant Physiology*, 69:1326-1330.
- Kreis, W., Reinhard, E. 1987. Selective uptake and vacuolar storage of primary cardiac glycosides by suspension cultures *Digitalis lanata* cells. *Journal of Plant Physiology.*, 129:311-318.
- Kurkdjian, A., 1982. Absorbtion and accumulation of nicotine in *Acer pseudoplatanus* and *Nicotiana tabacum* cells. *Physiologie Vegetale*, 20:73-83
- Kushnick, R.T., Liebmann, J.M., Ritch, R., 1996. Systemic pilocarpine toxicity from ocusert leakage. *Archives Ophthalmology.*, 114:1432-1433.
- Laibovitz, R., Boyle, J., Snyder, E., Strohmaier, K., Adamsons, I., 1996. Dorzolamine versus pilocarpine as adjunctive therapies to timolol: A comparison of patient preferences and impact on daily life. *Clinical Therapeutics*, 18(5):821-832.
- Leigh, R.A., Deri Tomos, A., 1983. An attempt to use isolated vacuoles to determine the distribution of sodium and potassium in cells of storage roots of red beet (*Beta vulgaris*). *Planta*, 159:469-475
- Leigh, R.A., ap Rees, T., Fuller, W.A., Banfield, J., 1979. The location of acid invertase activity and sucrose in the vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*). *Biochemical Journal*, 178:539-547.
- Li, Z. H., Liu, Z. J., 2003. Effect of NaCl on growth, morphology, and camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* seedlings. *Canadian Journal of Plant Science*, 83:931-938.
- Link, H.; Bernauer, K., 1972. Über die synthese der Pilocarpus – alkaloide isopilosin und pilocarpin, sowie die absolute konfiguration des (+) isopilosins. *Helvetica Chimica Acta*, 55: 1053-1062.
- Link, H.; Bernauer, K.; Oberhans, W.E., 1974. Configuration of Pilocarpus alkaloids. *Helvetica Chimica Acta*, 57:2199-2200.

- Lu, Y.P., Li, Z.S., Drozdowicz, Y.M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., Rea, P.A., 1998. *Atmrp2*, an Arabidopsis ATP-binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with *Atmrp1*. *Plant Cell*, 10:267-282.
- Marques, M.E.T., Costa, J.P.C. 1994. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). Recomendações Básicas, 27. EMBRAPACPATU, Belém, 4 p.
- Martinoia, E., Flugge, U.F., Kaiser, G., Heber, U., Heldt, H.W., 1985. Energy dependent uptake of malate into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts. *Biochimica and Biophysica Acta.*, 806:311-319.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, Ü., Müller-Röber, B., Schulz, B., 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters- more than just detoxifiers. *Planta*, 214:345-355.
- Matile, P., 1976. Localization of alkaloids and mechanism of their accumulation in vacuoles of *Chelidonium majus* laticifers. *Nova Acta Leopoldina Supplement.*, 7, 139-156
- Matile, P., 1978. Biochemistry and function of vacuoles. *Annual Review of Plant Physiology*, 29:193-213.
- MERCK. Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck & Co. Rahway, New Jersey, 1983
- Merlot, S., Leonhardt, N., Fenzi, F., Valon, C., Costa, M., Piette, L., Vavasseur, A., Genty, B., Boivin, K., Muller, A., Giraudat, J., Leung, J., 2007. Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *EMBO Journal*, 26:3216-3226.
- Mende, P., Wink, M., 1987. Uptake of the quinolizidine alkaloid lupanine by protoplasts and isolated vacuoles of suspension-cultured *Lupinus polyphyllus* cells. Diffusion or carrier-mediated transport? *J. Plant Physiol.*, 129: 229-242.
- Migdal, C., 2000. Glaucoma Medical Treatment: Philosophy, Principles and practice. *Eye*, 14:515-518.
- Minocha, S.C., 1987. pH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture. In: J.M. Bonga, D.J. Durzan (eds). *Cell and tissue culture in forestry vol. 1: general principles and biotechnology*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 125-141
- Murashige, T.; Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15:473-497.

- Neumann, D., Krauss, G., Hieke, M., Greger, D., 1983. Indole alkaloid formation and storage in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.*, 48:20-23.
- Oliveira, F., Akisue, G., 1991. Fundamentos da farmacologia. Editora Atheneu, São Paulo-Brasil, 216p.
- Oksman-Caldentey, K.M., Inze, D., 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Science*, 9:433–440.
- Otani, M., Shitan, N., Sakai, K., Martinoia, E., Sato, F., Yazaki, K., 2005. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloids berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology*, 138:1939-1946.
- Pareilleux, A., Vinas, R., 1984. A study of the alkaloid production by resting cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a continuous flow reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 316-320.
- Pedersen, H., Cho, G. H., Hamilton, R., 1987. Bioreactors operating strategies for plant-cell cultures. *Annals of New York Academy Of Sciency*, 506:163-170.
- Pinheiro, C.U.B., 1997. Jaborandi (pilocarpus sp., Rutaceae): A wild species and its transformation into a crop. *Economic Botany*, 51(1):49-58.
- Rea, P. A., 2007. Plant ATP-Binding Cassete Transporters. *Annual Review of Plant Biology*, 58:347-75.
- Rieke, J. W., Hafermann, M. D., Johnson, J. T., Leveque, F. G., Iwamoto, R., Steiger, B. W., Muscoplat, C., Gallagher, S. C. Oral pilocarpine for radiation- induced xerostomia: Integrated efficacy, 1995.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P., 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18:91-129.
- Routien, J.B. Nickell, L.G. U.S. Patent 2,747,334, 29-05-1956.
- Saad, W., Simões, S., Silveira, J.E.N., Camargo, L.A.A., Saad, R. Pereira, A.F., 2000. Interaction between isoproterenol and pilocarpine in the salivary flow. *Journal of Dental Research*, 79(5):1132-1132.
- Sakai, K., Shitan, N., Sato, F., Ueda, K. Yazaki, K., 2002 Characterization of berberine transport into *Coptis Japonica* cells and the involvement of ABC protein. *J. Exp. Bot.*, 53:1879-1886.
- Salisbury, F.B., Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont

- Sánchez-Fernández, R., Davis, T.G.E., Coleman, J.O.D., Rea, P.A., 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry*, 276:30231-30244.
- Sandhu, S.S., Abreu, I.N., Colombo, C., Mazzafera, P., 2005. Pilocarpine content and molecular diversity in *Jaborandi*. *Scientia Agricola*, 63(5):478-482.
- Sasaki, T., Ezaki, B., Matsumoto, H., 2002. A gene encoding multidrug resistance (MDR)-like protein is induced in aluminum and inhibitors of calcium flux in wheat. *Plant Cell Physiol.*, 43:177-85.
- Sato, H., Tagushi, G., Fukui, H., Tabata, M., 1992. Role of malic acid in solubilizing excess berberine accumulation in vacuoles of *Coptis japonica*. *Phytochemistry*, 31:3451-3254.
- Sato, F., Takeshita, N., Fujiwara, H., Katagiri, Y., Huan, L., Yamada, Y., 1994. Characterization of *Coptis japonica* cells with different alkaloid productivities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38:249-256.
- Saurin, W., Hofnung, M., Dassa, E., 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J. Mol. Evol.*, 48: 22-41.
- Sawaya, A.C.H.F., Abreu, I.N., Andreazza, N. L., Eberlin, M.N., Mazzafera, 2008. HPLC-ESI-MS/MS of imidazole alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules*, 13:1518-1529.
- Schulz, B., Kolukisaoglu, H.U., 2006. Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Letters*, 580:1010-1016.
- Senior, A.E., Al-Shawi, M.K., Urbatsch, I.L. 1995. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Letters*, 377:285-89.
- Shitan, N., Bazin, I., Dan, K., Obata, K., Kigawa, K., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C., Yazaki, K., 2003. Involvement of CjMDR1, a plant MDR-type ABC protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *The Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 100:751-756.
- Shimomura, K., 1997. Traditional medicinal plant genetic resources and biotechnology applications. *Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity*. (Series: Biotechnology Intelligence unit). pp. 209-225.
- Souza M.P., Matos M.E.O., Matos F.J.A., Machado M.I.L., Craveiro A.A., 1991. *Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras*. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, 416p.

- Stafford, A., Morris, P. Fowler, M.W., 1986. Plant cell biotechnology: a perspective. *Enzyme Microb Technol*, 8:578-87.
- Svedsen, A.B. & Verpoort, R., 1983. *Chromatography of alkaloids*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
- Swan, G.A., 1967. An Introduction to the alkaloids. In: Blackwell Scientific Publications, Great Britain, pp.188-192.
- SUDEMA (Superintendência do Desenvolvimento do Maranhão). Novo Zoneamento do Estado do Maranhão. São Luis, MA, 1970
- Taylor, P., 1991 Agonistas Colinérgicos, Capítulo 6, 8ª edição, p. 70-84, In: Gilman A.G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Editora Guanabara Koogan, p. 1232
- Tedeschi, E., Kamionsky, J., Zeider, D., Fackler, S., 1974. Isolation, Characterization and synthesis of trans-pilosine stereoisomers occurring in nature. Circular dichroism and mass spectral studies. *Journal of Organic Chemistry*, 39:1864-1870.
- Terasaka, K., Sakai, K., Sato, F., Yamamoto, H., Yasaki, K., 2003. *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry*, 62:483-489.
- Theodoulou, F.L., 2000. Plant ABC transporters. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1465:79–103.
- Ueda K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., 1986. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochemica and Biophysical Research Communications*., 141:956-962.
- Ueda K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., Pastan I., 1987. Expression of a full-length cDNA for the human ‘MDR1’ gene confers resistance to colchicines doxorubicin and vinblastine. *The Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 84:3004-3008.
- Urbatsch I, Sankaran B, Bhagat S, Senior AE. 1995a. Both P-glycoprotein nucleotide binding sites are catalytically active. *J. Biol. Chem.*, 270:26956–61.
- Urbatsch, I., Sankaran, B., Weber, J, Senior A.E., 1995b. P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at single catalytic site. *J. Biol. Chem.*, 270:19383-90.
- Van der Fits, L.; Zhang, H.; Menke, F. L. H.; Deneka, M.; Memelink, J., 2000. A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a JA-independent signal transduction pathway. *Plant Mol. Biol.*, 44:675-685.

- Verpoorte, R, Memelink, J., 2002. Engineering secondary metabolite in plant. *Curr Opin Biotechnol*, 13:181-187.
- Verpoorte R, van der Heijden R, Schripsema J, Hoge JHC, ten Hoopen HJG., 1993. Plant biotechnology for the production of alkaloids: Present status and prospects. *Journal of Natural Products*, 56:186-207.
- Verpoorte, R, van der Heijden R, ten Hoopen, H.J.G., Memelink, J., 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21: 467-479.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestiers, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuel, L., Schulz, B., Spalding, E.J., Yazaki, K., Theodoulou, F.L., 2008. Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* , 13(4):151-159.
- Vieira, R.F., 1999. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: *Perspective on new crops and news uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 152-159.
- Vitart, V., Baxter, I., Doerner, P., Harper, J.F., 2001. Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. *Plant J.* 7:191-201.
- Voigtlander, H.W.; Balsam, G.; Engelhardt, M.; Pohl, L., 1978 Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. *Arch Pharm.*, 311:927-935.
- Waldhauser, S.S.M., Baumann, T., 1996. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry*, 42(4): 985-996.
- Wang, W., Takezawa, D., Pooviah, B.W. 1997. A potato cDNA encodes a homologue of mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Plant Mol. Biol.*, 31:683–87.
- Webster, A.R, Luff, A.J., Canning, C.R., Elkington, A.R., 1993. The effect of Pilocarpine on the glaucomatous visual field. *British Journal of Ophthalmology*, 77(11):721-725.
- Wigler, P.W., Patterson, F. K., 1994. Reversal agent inhibition of the multidrug resistance protein pump in human leukemic lymphoblasts. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1189:1-6.
- Wingsle, G., Gardestrom, P., Hallgren, J., Karpinski, S., 1991. Isolation, Purification, and subcellular localization of isoenzymes of superoxide dismutase from Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Needles. *Plant Physiol.*, 95:21-28.
- Wink, M (1987) In: *Matin A (ed.) Plant Vacuoles*, Plenum Press, New York and London, pp 477-484.

- Wink, M., Mende, P., 1987. Uptake of lupanine by alkaloid-storing epidermal cells of *Lupinus polyphyllus*. *Planta Medica*, 52, 465-469.
- Wynn, R.L., 1996. Oral pilocarpine (Salagen): A recently approved salivary stimulant. *General Dentistry*, 44(1): 29-30.
- Yasaki, K., 2005. Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion of Plant Biology*, 8:301-307, 2005.
- Yamamoto, H., Suzuki, M., Suga, Y., Fukui, H., Tabata, M. 1987. Participation of an active transport system in berberine-secreting culture cells of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Rep.* 6:356-359.
- Yamamoto, H., Suzuki, M., Kitamura, T., Fukui, H., Tabata, M., 1989. Energy-requiring uptake of protoberberine alkaloids by cultured cells of *Thalictrum flavum*. *Plant Cell Reports*, 8:361-364.
- Zaman, G. J., Lankelma, J., van Tellingen, O., Beijnen, J., Dekker, H., Paulusma, C., Oude Elferink, R.P., Baas, F., Borst, P., 1995. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 92:7690-7692.
- Zenk, M.H., 1978. The impact of plant cell culture on industry. In: *Frontiers of plant tissue culture*. Thorpe, T.A., ed. Int. Assoc. Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá, pp. 1-13,
- Zhao, R., Dielen, V., Kinet, J.M., Boutry, M., 2000. Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. *Plant Cell* 12:535-546.

ANEXOS

Artigos publicados relacionados com a dissertação apresentada

Article

HPLC-ESI-MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*

Alexandra CH F Sawaya^{1,2,*}, Ilka Nacif Abreu^{3,4}, Nathalia Luiza Andreazza³, Marcos N. Eberlin¹ and Paulo Mazzafera³

¹ Tho.MSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

² Bandeirante University of São Paulo, UNIBAN, São Paulo, SP, Brazil

³ Department of Plant Physiology, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

⁴ Umeå Plant Science Centre – Umeå – Sweden

* Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: franksawaya@terra.com.br; UNIBAN, Rua Maria Cândida 1813, Vila Guilheme, São Paulo, CEP 02071-013, SP, Brazil, Phone: +55-11-2967-9147; Fax: +55-11-4412-5871.

Received: 28 May 2008; in revised form: 22 June 2008 / Accepted: 18 July 2008 / Published: 30 July 2008

Abstract: Pilocarpine, an important imidazole alkaloid, is extracted from the leaves of *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae), known in Brazil as *jaborandi* and used mainly for the treatment of glaucoma. *Jaborandi* leaves also contain other imidazole alkaloids, whose pharmacological and physiological properties are unknown, and whose biosynthetic pathways are under investigation. In the present study, a HPLC method coupled with ESI-MSⁿ was developed for their qualitative and quantitative analysis. This method permits the chromatographic separation of the imidazole alkaloids found in extracts of *jaborandi*, as well as the MS/MS analysis of the individual compounds. Thus two samples: leaves of *P. microphyllus* and a paste that is left over after the industrial extraction of pilocarpine, were compared. The paste was found to contain significant amounts of pilocarpine and other imidazole alkaloids, but had a slightly different alkaloid profile than the leaf extract. The method is suitable for the routine analysis of samples containing these alkaloids, as well as for the separation and identification of known and novel alkaloids from this family, and may be applied to further studies of the biosynthetic pathway of pilocarpine in *P. microphyllus*.

Keywords: *Jaborandi*, *Pilocarpus microphyllus*, imidazole alkaloids, pilocarpine, HPLC-ESI-MS/MS.

Introduction

P. microphyllus (Rutaceae) is originally from the Amazon region in Brazil where it is known as *jaborandi* [1]. This plant is a rich source of imidazole alkaloids, of which pilocarpine is the best known and the only one being economically exploited. Pilocarpine has been well studied as it is used not only for the treatment of glaucoma [2] but also as a stimulant of sweat and lachrymal glands [3,4].

The possibility of production of pilocarpine by callus cell lines in bioreactors has been evaluated, with the objective of protecting the *jaborandi* plant from uncontrolled exploitation [5]. Studies using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) to investigate the regulation of pilocarpine biosynthesis in *P. microphyllus* callus showed that pilosine (another imidazole alkaloid) was also produced depending on the cell line and treatment [6]. Due to the lack of standards of other imidazole alkaloids produced in *jaborandi*, posterior studies were conducted using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). These studies resulted in the characterization, by direct insertion tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS and ESI-MS/MS/MS), of five known imidazole alkaloids, as well as three new alkaloids, suggesting the existence of three different biosynthetic pathways for imidazole alkaloids in the *jaborandi* plant [7]. Although the presence of pilocarpine has been reported in 10 species of the *Pilocarpus* genus [1], there is no information as to the presence and concentration of the other imidazole alkaloids, whose pharmacological properties are still unknown.

Diverse chromatographic methods exist for the analysis of pilocarpine, mainly for the purpose of quality control of eye drops. Most of the analytical methods applied to the quantification of pilocarpine employ HPLC with either octadecyl [8,9], phenyl [10,11] or cyclodextrin [12] columns and UV detection. More recently, monolithic HPLC columns have also been tested [13]. As pilocarpine and related compounds lack chromophoric groups, UV detection must be carried out at low wavelengths (210–214 nm) where several other compounds may interfere [14], particularly when plant extracts are analyzed. Lower detection limits and richer structural information could be achieved by HPLC-ESI-MS analysis. However triethylamine, which is commonly used in buffer solutions to prevent tailing [13] is incompatible with ESI-MS detection. Merbel *et al.* [14] tested several stationary phases and eluents, determining that a combination of an Inertsil octadecyl column with an eluent using an ammonium acetate buffer and acetonitrile organic modifier was compatible for the LC-APCI-MS separation of pilocarpine, isopilocarpine and their respective acids extracted from plasma. It has also been our experience also that not all brands of octadecyl columns are capable of adequately separating imidazole alkaloids because of tailing.

Herein we describe a HPLC-ESI-MS/MS method developed for the analysis of imidazole alkaloids in the extracts of *P. microphyllus* samples. The method used is based on concepts used in previous papers, but has been modified and improved, in order to separate over a dozen imidazole alkaloids in a single 22 minute chromatographic run. The soft ionization technique used (ESI) permits the observation of protonated ($[M + H]^+$) molecules, rather than fragment ions. Therefore analysis in the full scan mode (TIC) instead of selected ion mode (SIM), permits the detection and quantification of both known and novel alkaloids in the sample. Two different types of samples were analyzed: *P. microphyllus* leaves and a paste that is left over after the industrial extraction of pilocarpine. The composition of the two samples could be qualitatively compared based on the results of the analysis. A

calibration curve based on pilocarpine reference standard was built and used to compare the concentration of imidazole alkaloids in the samples.

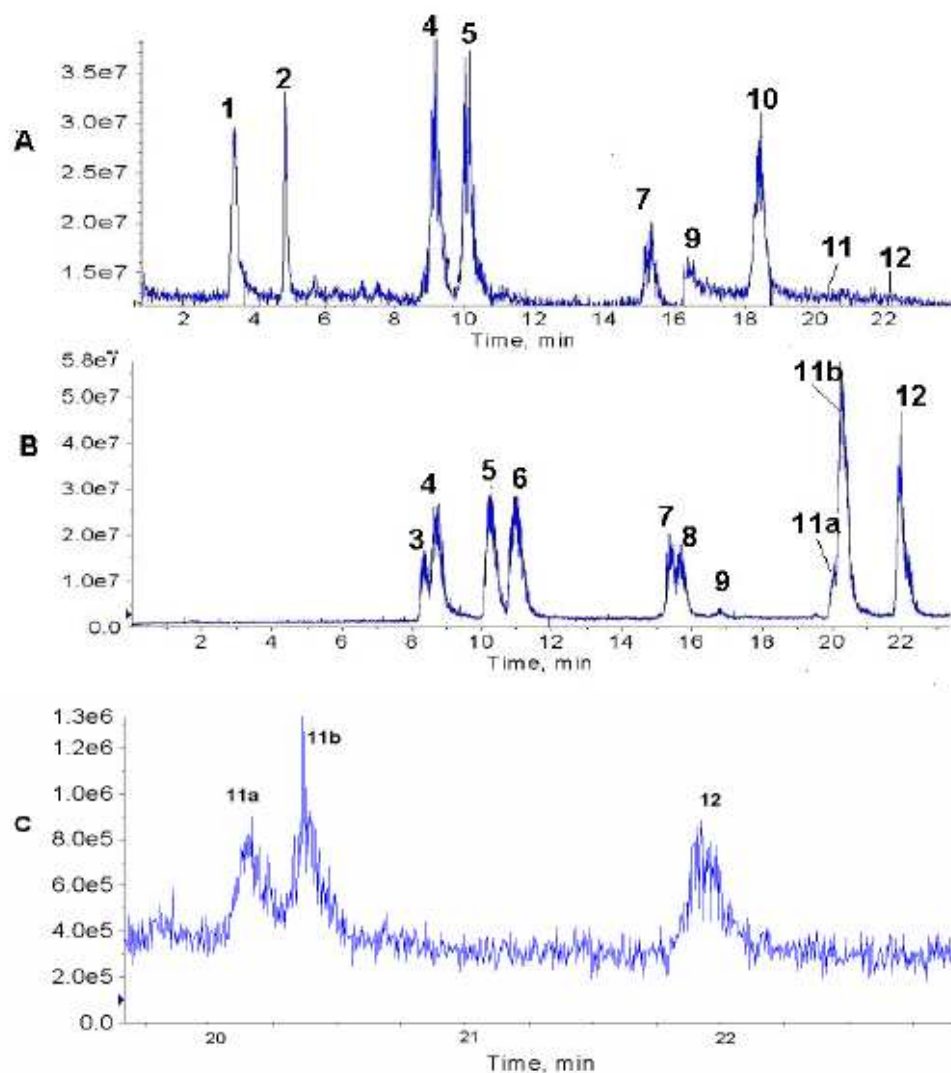
Results and Discussion

In previous studies of the imidazole alkaloids in *jaborandi*, ESI-MS fingerprinting was used as a fast and simple technique for the comparison of samples [6,7]. However, using direct infusion ESI-MS it was not possible to distinguish between isomers in the plant extracts. The present method was developed and applied in order to chromatographically separate and quantify the alkaloids in the *jaborandi* samples, including the isomers. This method has modified and substantially improved previous methods, such as that proposed by Merbel *et al.* [14], which was isocratic, and separated only four alkaloids in 20 minutes. By using a gradient, we achieved the separation of 13 compounds in 22 minutes. Several of these compounds have only been reported once before in a previous study by our group [7].

Figure 1 compares the chromatogram of a leaf extract (A) with that of the paste (B) that is left over after the industrial extraction of pilocarpine. The presence of the epimeric isopilocarpine (3) and pilocarpine (4) are clearly observed in the paste (Figure 1B), but in the leaf extract only pilocarpine (4) is detected. The ESI-MS/MS of the protonated molecules of these isomers of m/z 209 are very similar (Figures 2A and B); therefore, they can only be distinguished by their retention times. Both samples were spiked with standard pilocarpine, peak 4 increased in both samples and no new peak appeared in the leaf sample. This confirmed that peak 4 in both chromatograms was pilocarpine. This is in accordance with the results of Merbel *et al.* [14], who reported that isopilocarpine eluted slightly before its isomer, pilocarpine. No other isomers of this molecule have been reported.

A series of peaks corresponding to ions of m/z 287 elute (5, 6, 7, 8 and 9) in sequence in the paste (Figure 1B), whereas in the leaf extract only 5, 7 and 9 were observed (Figure 1 A). These compounds have slightly different ESI-MS/MS allowing them to be distinguished, and are presented for the first time in literature in Figure 2 (F, G, H, I and J). We have found references to five isomers of molecular formula $C_{16}H_{18}N_2O_3$ found in species *P. microphyllum* and *P. jaborandi*: pilosine (2*R*,3*R*,6*S*), isopilosine (2*S*,3*R*,6*R*) and epiisopilosine (2*S*,3*R*,6*S*) [15], as well as piloturin and epiisopiloturin [16] in which the imidazole ring is linked at the C₄ (rather than at the C₅ as in pilosine). At the present moment we are able to identify just one of these isomers, that is, pilosine (5). Both extracts were spiked with the standard of pilosine to confirm that peak 5 is in fact pilosine, in spite of slight differences in the retention time between samples. Further analysis using a semi-preparative HPLC column should allow us to isolate and identify the other isomers. Isomers were not present in leaves in the same proportion as they were found in the industrial paste. This may be the result of the industrial extraction procedure, as it is known that a long time in the presence of acids (normally used in the extraction of alkaloids) can cause the opening and closing of the lactone ring and formation of isomers.

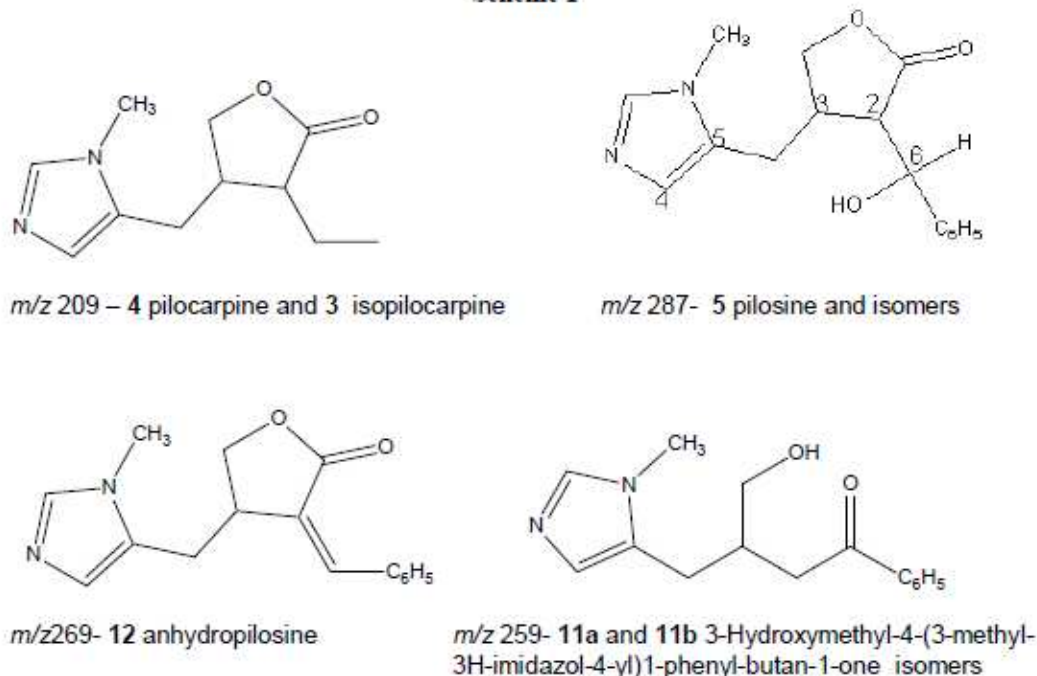
Figure 1. HPLC-MS TIC chromatograms of (A) jaborandi leaf extract and (B) paste extract. Numbered peaks correspond to: 1 m/z 202, 2 m/z 248, 3 isopilocarpine m/z 209, 4 pilocarpine m/z 209, 5, pilosine m/z 287, 6 m/z 287, 7 m/z 287, 8 m/z 287, 9 m/z 287, 10 m/z 316, 11 3-hydroxymethyl-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)1-phenyl-butan-1-one m/z 259, and 12 anhydropilosine m/z 269. (C) XIC of ions m/z 259 (11a and 11b) and m/z 269 (12) from the leaf extract chromatogram.



Compounds corresponding to peaks 1 (m/z 202), 2 (m/z 248) and 10 (m/z 316) in the leaf extract (Figure 1A) have not been identified yet. These ions but have been observed previously in fingerprints of extracts of leaves and callus of *P. microphyllus* [6]. Peaks 11a and 11b (m/z 259) correspond to a protonated compound identified for the first time in leaves of *P. microphyllus* in a previous study [7], whose suggested structure corresponds to 3-hydroxymethyl-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)1-phenyl-butan-1-one, based on its ESI-MS/MS. The chromatograms suggest that two isomers are present

(Figures 1B and C), although the ESI-MS/MS for both were identical (Figures 2C and D). The observation that the compound of m/z 259 is, in fact, a mixture of two isomers, is presented for the first time in this study as a result of the chromatographic method used. Peak 12 (m/z 269) corresponds to protonated anhydropilosine, by comparison of its ESI-MS/MS (Figure 2 E) to the compound identified in a previous study [7].

Scheme 1



In the present study, chromatograms were obtained using full scan mode (TIC) instead of the selective ion mode (SIM), as the purpose of this study was to observe whichever compounds were present in the extracts rather than observe low concentrations of specific compounds. By using TIC, in a single chromatographic run, several new alkaloids from *Pilocarpus microphyllus*, as well as some previously identified alkaloids could be detected (Figures 1A and B). However, extracting specific ions (XIC) from the chromatogram allows us to observe low concentrations that cannot be seen in the TIC, as exemplified here for m/z 259 and 269 in the leaf extract (Figure 1C). Therefore, for the exploratory analysis of samples of alkaloids from *jaborandi*, the TIC mode is the most adequate. However, for the routine analysis of these extracts, using the same chromatographic method in SIM could permit a manifold gain in sensitivity, if such were the need.

Figure 2. ESI-MS/MS of selected ions from the chromatograms presented in Figure 1: A) m/z 209, peak 3, isopilocarpine; B) m/z 209, peak 4, pilocarpine; C) m/z 259, peak 11a, D) m/z 259, peak 11b; E) m/z 269, peak 12, anhydropilosine; F) m/z 287, peak 5, pilosine, G) m/z 287, peak 6, H) m/z 287, peak 7; I) m/z 287, peak 8 and J) m/z 287, peak 9

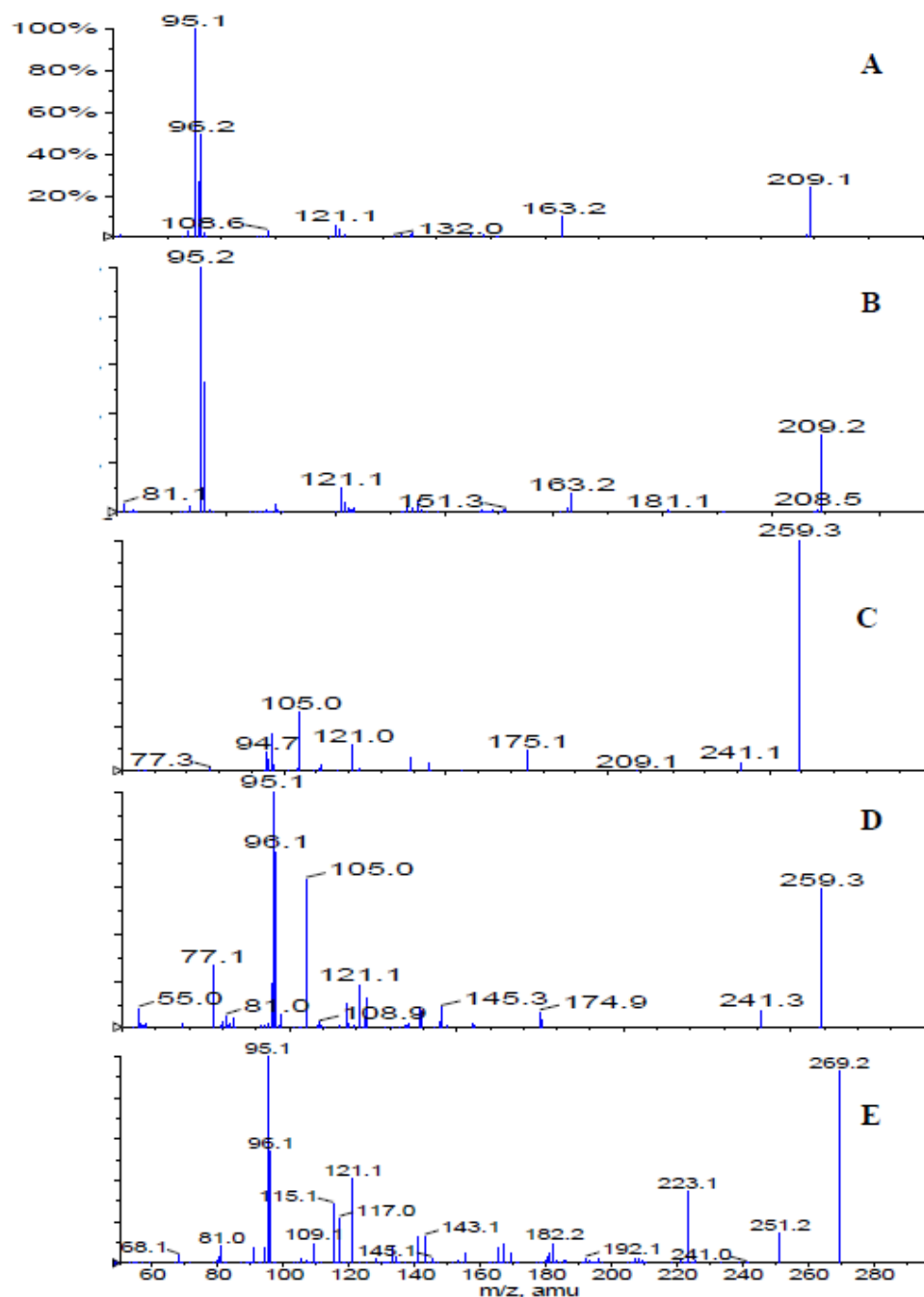
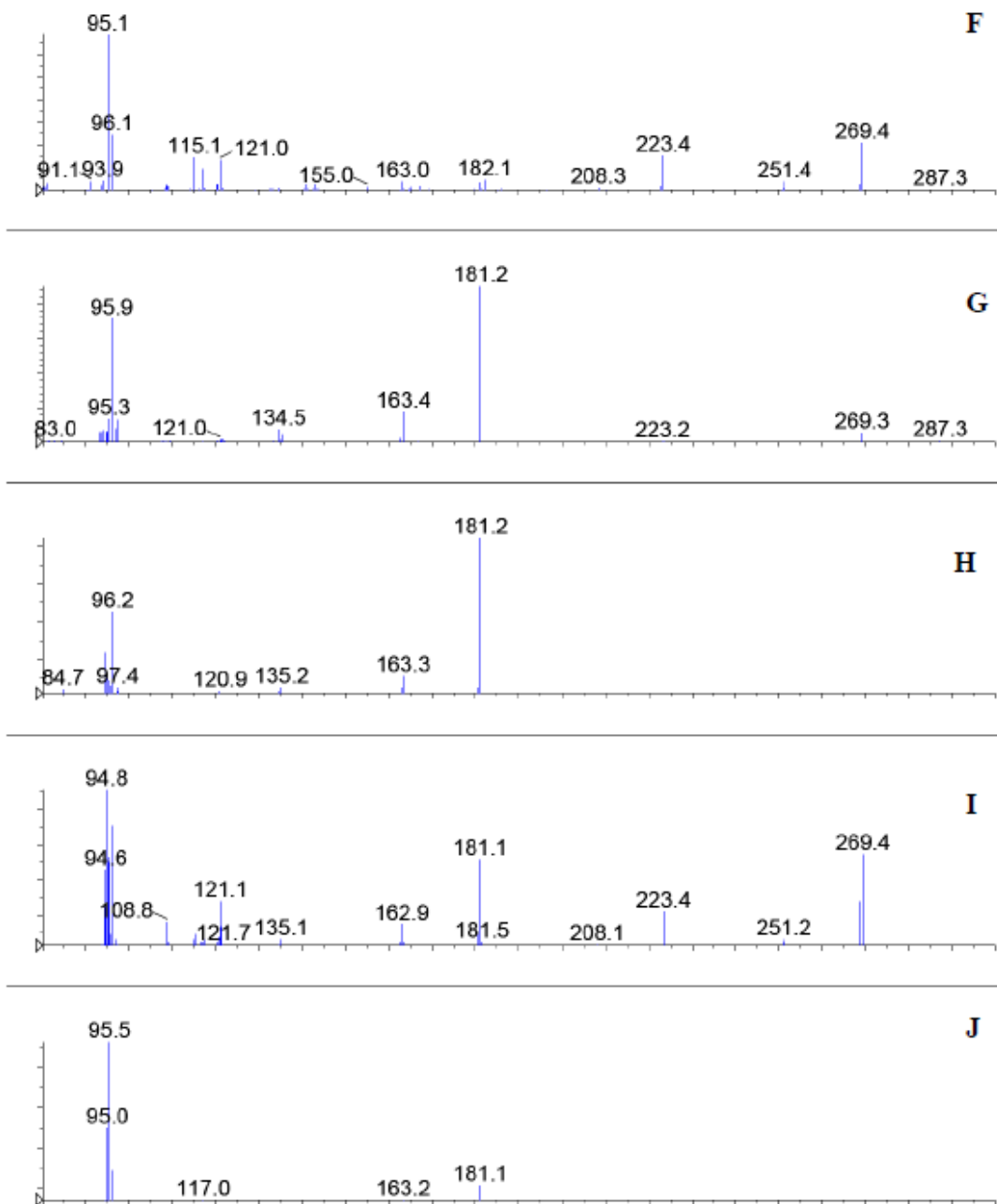


Figure 2. Cont.



The ionization method used by Merbel *et al.* [14] was APCI, which is more energetic and causes in-source fragmentation, therefore neither pilocarpic nor isopilocarpic acid could be quantified as parent ions (m/z 227), but only as their fragments (m/z 209). The use of a much softer ionization (ESI) permitted the observation of all the compounds based on the mass of the protonated $[M + H]^+$ molecules, not of fragment ions, which is essential for bio-prospection of new compounds.

A calibration curve with a linear regression coefficient of 0.9949 for values between 0.5 and 20 µg/mL was built using pilocarpine, a value comparable to that obtained by Merbel *et al.* [14]. This calibration curve enabled us to calculate the concentrations of pilocarpine and isopilocarpine in both extracts (Table 1). It was also possible to obtain an estimate of the concentrations of the other alkaloids based on the area of their peaks in the chromatogram as their areas and concentration fell within the range of the calibration curve, except for compounds 11a, 11b and 12 in the leaf extract whose concentrations fell below these values.

Table 1. HPLC-ESI-MS analysis of leaf and paste extract (10 µL injections). Areas of peaks and quantification are based on a calibration curve using a pure pilocarpine standard. Compounds are numbered as in Figure 1.

Compound as $[M + H]^+$ (m/z)	Leaves concentration (µg/ mL)	Paste concentration (µg/ mL)
1 (202)	1.6	
2 (248)	0.9	
3 (209)		1.5
4 (209)	3.0	3.9
5 (287)	2.8	4.1
6 (287)		4.6
7 (287)	1.2	1.9
8 (287)		1.9
9 (287)	0.7	0.2
10 (316)	2.1	
11a (259)		1.2
11b (259)		7.6
12 (269)		4.6

It is noteworthy that the concentration of pilocarpine seems higher in the paste than in the leaf extract. However, one must bear in mind that the paste is enriched of alkaloids since the industrial process removed other leaf components. The relation between the concentrations of pilocarpine in the leaf extract in comparison to the other peaks (24%) is higher than in the paste (12%). Pilocarpine makes up 22% of the leaf alkaloids but only 14% of the paste. A series of compounds which are found in the paste, but not in the leaf extract, could be degradation products. For example, compounds of m/z 259 and 269, whose concentration was below the quantification limit in the leaf extract, made up 42% of the paste. Compounds of m/z 202, 248 and 316, observed in the leaf extract, were absent in the paste. These variables could also be linked to the time of the year in which the samples were obtained, as the production of each of these imidazole alkaloids varies, depending on the season [7]. Further studies will be necessary to clarify all these points. However, the estimated concentration obtained using the HPLC-ESI-MS method proposed is sufficient to compare samples from different parts of the plant, of different plants, of plants or callus submitted to different treatments in order to study the production of imidazole alkaloids in this species.

Conclusions

The HPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous detection and quantification of imidazole alkaloids extracted from *jaborandi* was developed and applied to the comparison of two samples; fresh leaves and the paste left over after industrial pilocarpine extraction. Both samples analyzed contain significant amounts of pilocarpine, as well as a number of other imidazole alkaloids. The alkaloid composition differs between samples qualitatively and quantitatively. Some of the compounds observed in the paste may have been artifacts of the extraction procedure, as they were absent or found in much lower concentrations in the leaf extract. ESI ionization permitted the detection of known and novel alkaloids as their $[M + H]^+$ ions, while gradient HPLC permitted the separation of several alkaloids (including isomers). The alkaloid [3-hydroxymethyl-4-(3methyl-3H-imidazol-4-yl)1-phenylbutan-1-one], observed in a previous study [7], was shown to be a mixture of two isomers of m/z 259 through chromatographic separation. On the other hand, three ions (m/z 202, 248 and 316) observed previously in ESI-MS fingerprints of leaves and callus of *P. microphyllus* [6] formed individual peaks in the chromatogram. The MS/MS spectra of five isomers of m/z 287, pilocarpine, isopilocarpine and three other imidazole alkaloids are reported.

This method is suitable for the routine analysis of samples containing these alkaloids, as well as for the separation and identification of other alkaloids from this family (bio-prospection) with potential biological and/or pharmacological activity. Several new compounds, which have not been fully characterized yet, may be isolated by preparative HPLC and further investigated by other techniques able to perform detailed structural investigation. The HPLC-ESI-MS/MS method described herein should permit additional studies of the biosynthetic pathway of pilocarpine in *P. microphyllus*.

Experimental

Sample preparation

Leaves of *P. microphyllus* maintained in greenhouse conditions were collected and extracted according to the method of Avancini *et al.* [17], which consists of the following steps: the sample is moistened with 10% NaOH; after 15 min. extraction is carried out three times with CHCl_3 ; the pooled organic extracts are re-extracted twice with 2% H_2SO_4 ; the pooled acid extracts are adjusted to pH 12 with NH_4OH and extracted twice with CHCl_3 . Extraction was carried out immediately prior to analysis from 1 g of the sample. The organic extract was dried in a speed-vac and dissolved in 10 mL of solvent A prior to injection. Solvent A is composed of 0.05 M ammonium acetate buffer adjusted to pH 4 with trifluoroacetic acid [14].

The second material used in this study was the industrial residue (a paste) obtained after leaves of *P. microphyllus* have been used for pilocarpine extraction. This paste was a gift from Centroflora Group (Botucatu, SP, Brazil - <http://www.centroflora.com.br>) and contains significant levels of pilosine. One g of paste was also extracted as above directly before analysis, dried and dissolved in 10 mL of solvent A prior to injection.

Standards and solvents

Pure pilocarpine was purchased from Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA). Solvents used for the extraction of the leaves of *P. microphyllus* were of analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany). Pilosine was a gift from Merck Pharmaceutical Company (Rio de Janeiro, Brazil). For the HPLC-ESI-MS/MS analyses the following solvents and chemicals were used: HPLC grade acetonitrile (Tedia, Fairfield, OH, USA), analytical grade trifluoroacetic acid and ammonium acetate (Merck, Darmstadt, Germany) and Milli-Q water (Millipore S.A.S., Molsheim, France).

HPLC-ESI-MS/MS equipment and conditions

HPLC separation was achieved at ambient temperature (approximately 22–24°C) using a Waters Alliance 2695 pump with a 5 µm Inertsil ODS-2 column (250 x 4.6 mm I.D.) obtained from Varian (Middleburg, The Netherlands). A binary gradient was performed starting with 97:3, v/v (solvent A : solvent B) for 8 min (Solvent A - 0.05 M ammonium acetate buffer adjusted to pH 4 with trifluoroacetic acid; Solvent B – acetonitrile) and then ramping to 85:15, v/v (A:B) at 20 min, and held until 23 min. The flow rate was 1 mL/min and a post-column splitter was used to reduce the flow entering the ESI source to approximately 100 µL/min. All ESI-MS and ESI-MS/MS were acquired in the positive ion mode on an Applied Biosystems Q-trap mass spectrometer (Foster City, CA, USA) with a hybrid triple quadrupole/ linear ion trap system, ranging between 100 and 400 *m/z*. The operational parameters used were: capillary 5000 V, temperature 350°C, declustering potential 70 V and entrance potential 6 V. For the ESI-MS/MS experiments the above conditions were maintained and collision energy was set at 30 V. Nitrogen was used as curtain gas (20 psi), nebulizing gas (20 psi) and collision gas (medium). Injections of 10 µL were used for the samples and standard solutions. The calibration curve was prepared using a stock solution of pilocarpine in water, diluted to concentrations ranging from 0.5 to 20 µg/mL in solvent A prior to injection, as none of the other alkaloids could be found as certified pure standards. Identification of the compounds, when possible, was based on their elution order and MS/MS data in comparison with those from literature.

Acknowledgements

This work has been partially supported by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and the Brazilian National Research Council (CNPq).

References

1. Pinheiro, C.U.B. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): A wild species and its rapid transformation into a crop. *Econ. Bot.* **1997**, *51*, 49–58.
2. Migdal, C. Glaucoma medical treatment: philosophy, principles and practice. *Eye* **2000**, *14*, 515–518.
3. Wynn, R.L. Oral pilocarpine (Salagen): a recently approved salivary stimulant. *Gen. Dent.* **1996**, *44*, 29–30.

4. Davies, A.N.; Broadley, K.; Beighton, D. Xerostomia in patients with advanced cancer. *J. Pain Symp. Manag.* **2001**, *22*, 820–825.
5. Abreu, I. N.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N.; Mazzafera, P.. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Staph.). *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* **2005**, *41*, 806–811.
6. Abreu, I.N.; Andreazza, N.L.; Sawaya, A.C.H.F.; Eberlin, M.N.; Mazzafera, P. Cell suspension as a tool to study the biosynthesis of pilocarpine in jaborandi. *Plant Biology.* **2007**, *9*, 793–799.
7. Abreu, I.N.; Mazzafera, P.; Eberlin, M.N.; Zullo, M.A.T.; Sawaya, A.C.H.F. Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1205–1213.
8. Fan, T.Y.; Wall, G.M.; Sternizke, K.; Bass, L.; Morton, A.B.; Muegge, E. Improved high-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine and its degradation products in ophthalmic solutions importance of octadecylsilane column choice. *J Chromatogr. A*, **1996**, *740*, 289–295.
9. Noordam, A.; Maat, L.; Beyerman, H.C. Quantitative determination of pilocarpine, isopilocarpine, pilocarpic acid, and isopilocarpic acid in clinical ophthalmic pilocarpine formulations by reversed-phase liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 96–97.
10. Kennedy, J.M.; McNamara, P.E. High-performance liquid chromatographic analysis of pilocarpine hydrochloride, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid in eye-drop preparations. *J. Chromatogr.* **1981**, *212*, 331–338.
11. Gomez-Gomar, A.; Gonzales-Aubert, M.; Costa-Segarra, J. HPLC method for the simultaneous determination of pilocarpine, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid. *J. Pharm Biomed. Anal.* **1989**, *7*, 1729–1734.
12. Sternizke, K.D.; Fan, T.Y.; Dunn, D.L. High-performance liquid chromatographic determination of pilocarpine hydrochloride and its degradation products using a β -cyclodextrin column. *J Chromatogr.* **1992**, *589*, 159–164.
13. Deeb, S.; Preu, L.; Wätzig, H. Evaluation of monolithic HPLC columns for various pharmaceutical separations: Method transfer from conventional phases and batch to batch repeatability. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 85–95.
14. Merbel, N.C.V.; Tinke, A.P.; Oosterhuis, B.; Jonkman, J.H.G.; Bohle, J.F. Determination of pilocarpine, isopilocarpine, pilocarpic acid and isopilocarpic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B* **1998**, *708*, 103–112.
15. Tedeschi, E.; Kamionsky, J.; Zeider, D.; Fackler, S. Isolation, characterization, and synthesis of trans-pilosine stereoisomers occurring in nature. Circular dichroism and mass spectral studies. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1864–1870.
16. Voigtlander, H.W.; Balsam, G.; Engelhardt, M. Epiisopiloturin, ein Neues *Pilocarpus*-Alkaloid. *Arch. Pharm.* **1978**, *311*, 927–935.

17. Avancini, G.; Abreu, I.N.; Saldanha, M.D.A.; Mohamed, R.S.; Mazzafera, P.. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 171-175.

© 2008 by the authors; licensee Molecular Diversity Preservation International, Basel, Switzerland. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Cell Suspension as a Tool to Study the Biosynthesis of Pilocarpine in Jaborandi

I. N. Abreu¹, N. L. Andreazza¹, A. C. H. F. Sawaya², M. N. Eberlin², and P. Mazzafera¹

¹ Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, C.P. 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brasil

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brasil

Received: January 18, 2007; Accepted: March 20, 2007

Abstract: Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) is a species that naturally occurs in the North and Northeast of Brazil, whose leaves produce pilocarpine (an imidazole alkaloid that has been used to treat glaucoma and xerostomy), the biosynthesis of which is still uncertain. The aim of this work was to establish cell lineages and select them according to an alkaloid profile similar to the one from Jaborandi leaves. The induction of callus was done in different culture media and growth regulators. Calluses from primary cultures or those subcultured several times were used as explants for the obtainment of six cell lineages. Alkaloids content analyses and growth curves showed that lines obtained from primary cultures produced more alkaloids and a better development. Cell lines from 12 subcultures presented a decrease in pilocarpine and pilosine production. After 24 subcultures, the production of alkaloids remained constant. ESI-MS analysis showed that cell culture extracts have the same alkaloid composition as extracts made from leaves. The results indicate that cell suspensions can be used as a model to study the biosynthesis of the imidazole alkaloid in *P. microphyllus*.

Key words: *P. microphyllus*, pilosine, pilocarpine, alkaloids.

Introduction

Pilocarpine is an imidazole alkaloid used to treat glaucoma, xerostomia and to stimulate lachrymal and sweat glands (Abreu et al., 2005). This alkaloid is obtained exclusively from the leaves of species known as Jaborandi (Rutaceae). *Pilocarpus microphyllus* is the species of the genus which accumulates the largest amount of pilocarpine in leaves and is found mainly in the Amazon region of Brazil (Pinheiro, 1997). In addition to pilocarpine, leaf extracts from this species also contain other alkaloids, such as 3-nor-8(11)-dihydropilocarpine, anhydropilosine and pilosine, pharmacological activity of which is still unknown (Andrade Neto et al., 1996; Link and Bernauer, 1972; Voigtlander, 1978). Similar to other species from this region, it has been extensively exploited and, as a result, it was included a few years ago in the list of Brazilian endangered plant spe-

cies (Pinheiro, 1997). Therefore, cell cultures may represent an alternative for the production of these valuable substances.

Recent advances in biochemistry, molecular, cellular and genomic methodologies have pushed the study of secondary metabolite biosynthesis to a level in which very detailed information can be obtained, enabling better understanding of the fine control of these compounds and how structural and chemical diversity are created (Facchini, 2001). In this sense, model plants and model plant systems have proved to be valuable tools. Both techniques are keys to the study of alkaloids, considering that, unlike other categories of secondary metabolites, many alkaloids are biosynthetically unrelated. They form groups which are unique in structure. So far, perhaps the most studied and more versatile model system is *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle), which accumulates monoterpenoid indole alkaloids (Vazquez-Flota et al., 2002).

In recent years, plant cell suspension cultures have been studied as an economic alternative to produce alkaloids with potential medical applications. The possibility to control all the cultivation conditions, alter medium components and simulate stresses has the potential to turn plant cell cultures into a "pot of gold" to study the biosynthesis of alkaloids from the biochemical, chemical, physiological and molecular biology point of view (Collin, 2001). Many factors can affect the production of alkaloids in callus and cell suspension cultures, since these can be produced through several biosynthetic routes, according to the class to which they belong (Facchini, 2001). Plant cell cultures also offer the advantage of producing compounds not found in the intact plant, once alternative metabolic routes become active (Dias et al., 1998). Abreu et al. (2005) observed that the production of pilocarpine in calluses from Jaborandi leaves was strongly influenced by media composition. Simola et al. (1988) reported that the tissue used to originate the calluses and the callus age were important factors for the production of tropine alkaloids in *Atropa belladonna*. However, independent of the factors affecting alkaloid production in cell cultures, the main objective herein is to obtain plant cell lines presenting a high metabolite yield and exhibiting a high degree of biochemical and physiological stability (Morris et al., 1989).

Although some alkaloids have been isolated and identified in Jaborandi, there is no information about the biosynthesis of pilocarpine in this plant. In a previous study, we analyzed the

use of callus culture as a model system to understand the regulation of this alkaloid (Abreu et al., 2005). In the present study, we report on the establishment of stable cell lines for production of pilocarpine and show that these cell lines accumulate pilocarpine and other imidazole alkaloids ordinarily found in leaves.

Materials and Methods

Callus induction

Stems, petioles, petiolules and leaves of Jaborandi plants growing in greenhouses were used as explants for callus induction. The explants were treated according to Abreu et al. (2005) and inoculated in solid SH medium (Schenk and Hildebrandt, 1972) containing combinations of 2,4-D (2.88, 5.77 and 11.54 μM) and NAA (0, 2.7 and 5.4 μM), and in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 5.77 μM 2,4-D, and maintained in the dark. The inoculated explants were kept at a constant temperature of $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, under a 16-h photoperiod provided by cold white lamps ($25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Each treatment was replicated 30 times.

Callus maintenance

The callus cultures obtained from the MS culture medium containing 5.77 μM 2,4-D and kept in the dark for 20 days, were transferred to media containing: a) 5.77 μM 2,4-D; b) 21.5 μM NAA, in the dark for 20 days; and c) light for 24, 48 and 120 h.

Establishment of cell suspensions

Friable calluses (3 g) were used to establish cell suspensions. These calluses were obtained from petioles through direct induction or from subcultured callus (in MS with 5.77 μM 2,4-D). The calluses were subcultured every 20 days. The cell suspensions were obtained from: A – callus induced during primary culture of 20 days; B – callus obtained after two subcultures of 20 days; C – callus obtained from primary culture for 40 days; D – callus obtained after three subcultures of 20 days; E – callus obtained after four subcultures of 20 days; and F – callus obtained after five subcultures of 20 days. The cell cultures were placed in 30 mL of liquid MS medium supplemented with 5.77 μM 2,4-D and kept on a shaker at 100 rpm, in the dark at 25°C . The cell suspensions were subcultured every 20 days.

Growth curves were determined from 5 g of inoculum in 30 mL of MS medium (with 5.77 μM 2,4-D) that were harvested in triplicate at intervals of 5 days, over a period of 45 days. The cells were separated from the medium by filtration under reduced pressure. The cell fresh weight and medium pH were determined and stored for alkaloid determination.

Extraction and quantification of alkaloids

The procedure of Avancini et al. (2003) was used for the extraction and quantification of alkaloids from a) callus induced in medium containing 2,4-D and transferred to media containing 2,4-D or NAA; b) callus transferred to the light for 24, 48 and 120 h; c) callus after secondary and tertiary subcultures; d) cell and medium from six lines, after four subcultures; and e) cell

and medium from A and C lines, after 12 subcultures. Liquid medium was filtered through 0.22 μm filters prior to alkaloid determination. Pilocarpine was extracted from 15 replicates of each treatment. Pilocarpine (Sigma) and pilosine (Merck) were identified by co-injection of the sample with a pure standard.

Alkaloid fingerprinting

After 12 and 24 subcultures, the extracts (cell and medium) from line A were analyzed by mass spectrometry using the Q-TOF – Micromass, positive ion detection mode. The scan range for this experiment was m/z 100–600 and the scan range for MS/MS was m/z 50–600. The interface conditions were held constant and are as follows: capillary voltage = 300 V; cone voltage = 30 V; solvation temperature = 120°C .

Analysis of results

The data were statistically analyzed by ANOVA using the F (5%) test. The means were compared using the Tukey Test, $p > 5\%$.

Results and Discussion

Bourgaud et al. (2001) considered that, for the establishment of a cell suspension culture, the critical step is to obtain the callus, since this depends on a series of optimization procedures, from salt sources/concentrations to hormones. Therefore, to obtain callus of *P. microphyllus*, we used several types of explants, two media (MS and SH) and two hormones (2,4-D and NAA). Petioles were found to be the most efficient source to produce friable and non-oxidized callus using MS medium and darkness (data not shown).

The pilocarpine content decreased significantly in 20-day cultured friable callus transferred from darkness to light (Fig. 1A). The decrease was observed 24 h after transfer, remaining constant for the rest of the light periods. Similar results were observed when callus of *P. microphyllus* was kept in the light for 4 and 8 days (Abreu et al., 2005), and in callus of *Nicotiana glauca* transferred from dark to light (Hobbs and Yeoman, 1991). The pilocarpine content was not only reduced in NAA medium but also in secondary culture in 2,4-D (Fig. 1B). This effect of subculture was confirmed when friable callus obtained from primary culture in 2,4-D in the dark was transferred to the same media and had pilocarpine analyzed 20 days later (Fig. 1C). There was a threefold reduction, after which the alkaloid level remained stable from the second to the third subculture. It is possible that the initially high concentration of pilocarpine was a result of the high pilocarpine production in the explants. Secondary metabolite contents may need some time to stabilize, when culture factors become less critical and genetic background starts to be the controlling factor (Bourgaud et al., 2001). This may vary from months to years. Unlike our results, NAA has been shown to be favorable for the production of secondary metabolites, such as nicotine (Tabata et al., 1971), shikonin derivatives (Tabata et al., 1974) or anthraquinones (Zenk et al., 1975).

After detecting the effects of subculturing on pilocarpine production, the next step was to use calluses from primary cultures (lines A and C) and, after several subcultures (lines B, D, E and F), to establish cell suspension cultures. The cell cultures

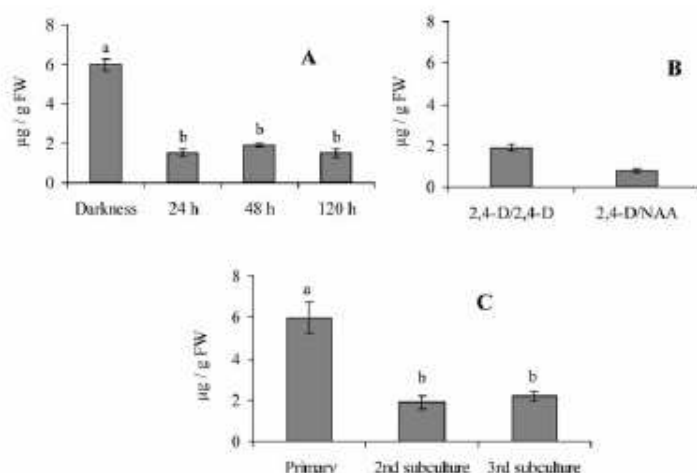


Fig. 1 Pilocarpine content in (A) callus of *P. microphyllus* induced in the dark and later transferred to the light for 24, 48 and 120 h; (B) in callus established in MS medium containing 2,4-D and later transferred to 2,4-D or NAA in the dark; (C) in callus formed from primary culture and after two and three subcultures. Different letters indicate differences, using the Tukey test 5%.

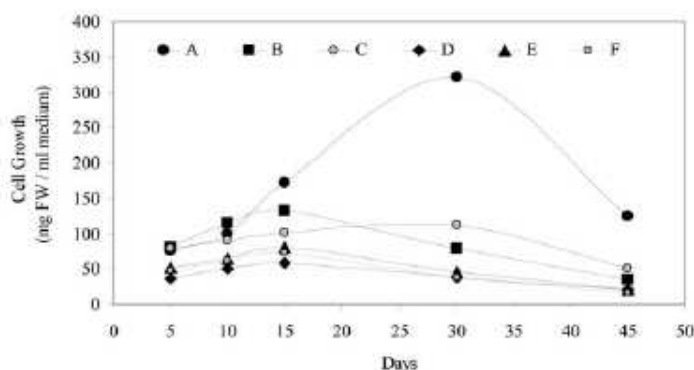


Fig. 2 Growth of six lines of *P. microphyllus* cell suspension cultures, after four subcultures.

obtained from the fourth subculture were then used to evaluate cell growth for 45 days (Fig. 2). Lines B, D, E and F showed the same growth pattern, where maximum mass accumulation occurred within 15 days of growth. On the other hand, lines A and C showed maximum mass accumulation on the 30th day.

Among several imidazole alkaloids detected in leaf extracts from *P. microphyllus* (Fig. 5D), we only have pure standards of pilocarpine and pilosine (Fig. 5D). HPLC analyses of these two alkaloids were carried in the cell lines after 15, 30 and 45 days of subculture (Fig. 3). The content of pilosine was high in cells of line A on the 15th day, and similar values were observed for pilocarpine in lines A and C (Fig. 3A).

In lines A and C, a relationship was found between Jaborandi cell growth and alkaloid production (cells + medium), since the highest alkaloid content was observed on the 15th day, during the exponential growth phase. Opposite results were found in cell cultures of *Tabernaemontana divaricata*, in which

higher alkaloid production was detected when cell growth had decreased (Sierra et al., 1992). In cell cultures of solanaceous species, alkaloid production has been related to the beginning of cytodifferentiation that occurs when cells have a slow growth rate, generally in the stationary phase (Lindsey and Yeoman, 1983). On the other hand, in cell cultures of *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), an increase of camptothecin occurs in the stationary phase, whereas isocamptothecin A and B accumulate when growth rate is maximal (Vanhengel et al., 1992; Yu et al., 2005), indicating that there is not a direct relationship between growth rate and alkaloid accumulation. Such variations might be a consequence of the fact that each alkaloid group has specific precursors that may be directly integrated with biosynthetic pathways of primary or secondary metabolism, which, in turn, may vary according to the series of culture conditions.

Considering the medium volume (30 mL) used to grow cell suspensions, significant amounts of pilocarpine and pilosine were released into the medium (Fig. 3B). It seems that there

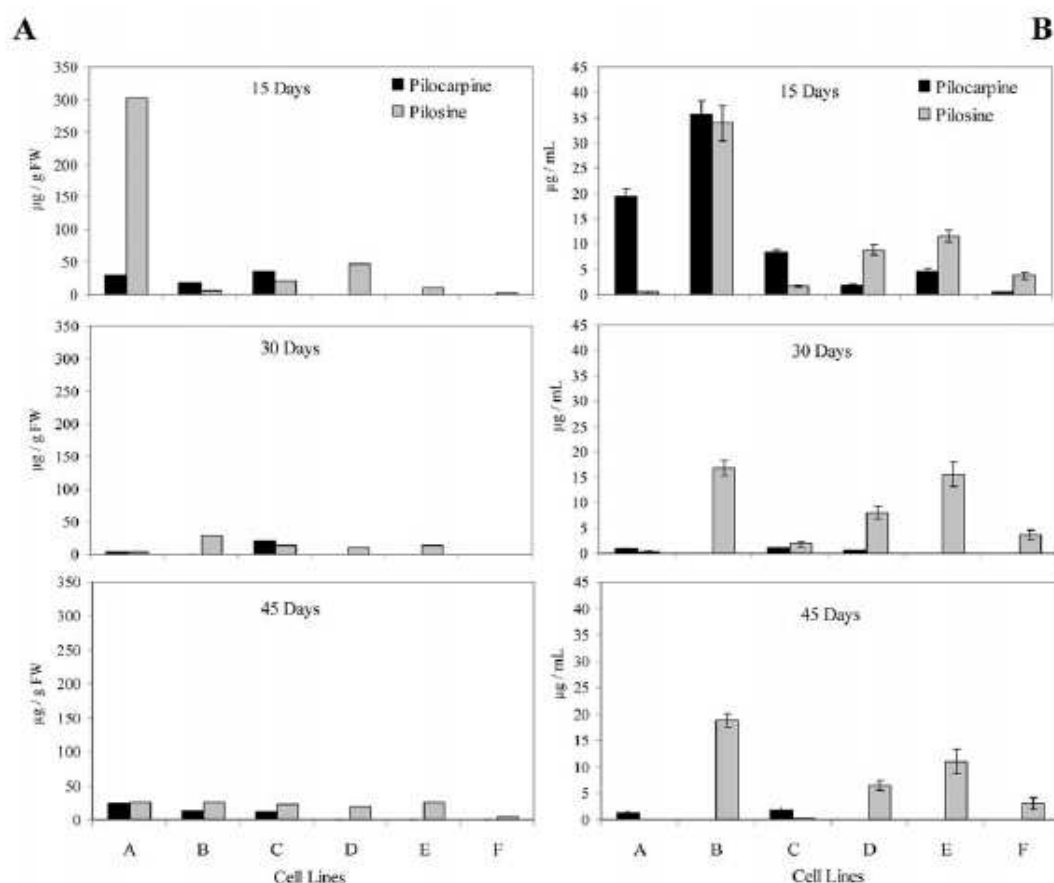


Fig. 3 Alkaloid production in (A) cells and (B) medium from six cell lines (A, B, C, D, E and F) of *P. microphyllus* after four subcultures for 15, 30 and 45 days.

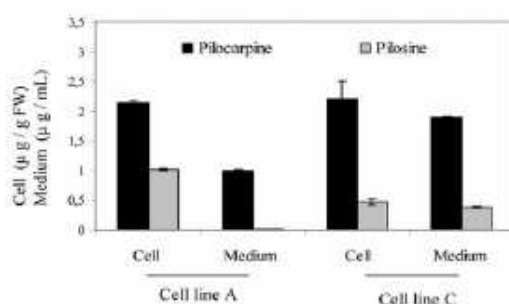


Fig. 4 Alkaloid production in cell and medium from cell lines A and C of *P. microphyllus*, after 12 subcultures. The alkaloid content was determined on the 20th day of growth.

is a relationship between the main alkaloid found in the cells and in the medium. Cell lines A, B and C accumulated more pilocarpine in the cells and also released more of this alkaloid to the medium. On the other hand, pilosine was the main alkaloid in the cells and in the medium of lines D, E and F (Fig. 3B). Although cell lines A and B released more alkaloids into the medium, similar amounts of pilocarpine and pilosine were found in the latter, while more pilocarpine were detected in the former. Pilocarpine was also released into the medium in other cell lines, but in lower amounts. Curiously, while lines A, B and C showed a decrease in alkaloids after 30 and 45 days of culture, lines D, E and F showed an increase of pilosine.

The decrease in alkaloids in medium of A, B and C cell lines might be due to degradation, conversion to other compounds (derivative alkaloids) or even reabsorption by the cells and further metabolism, since a parallel increase was not observed in these cells. It has been shown that cells are able to reabsorb alkaloids released in the medium, although the transport mech-

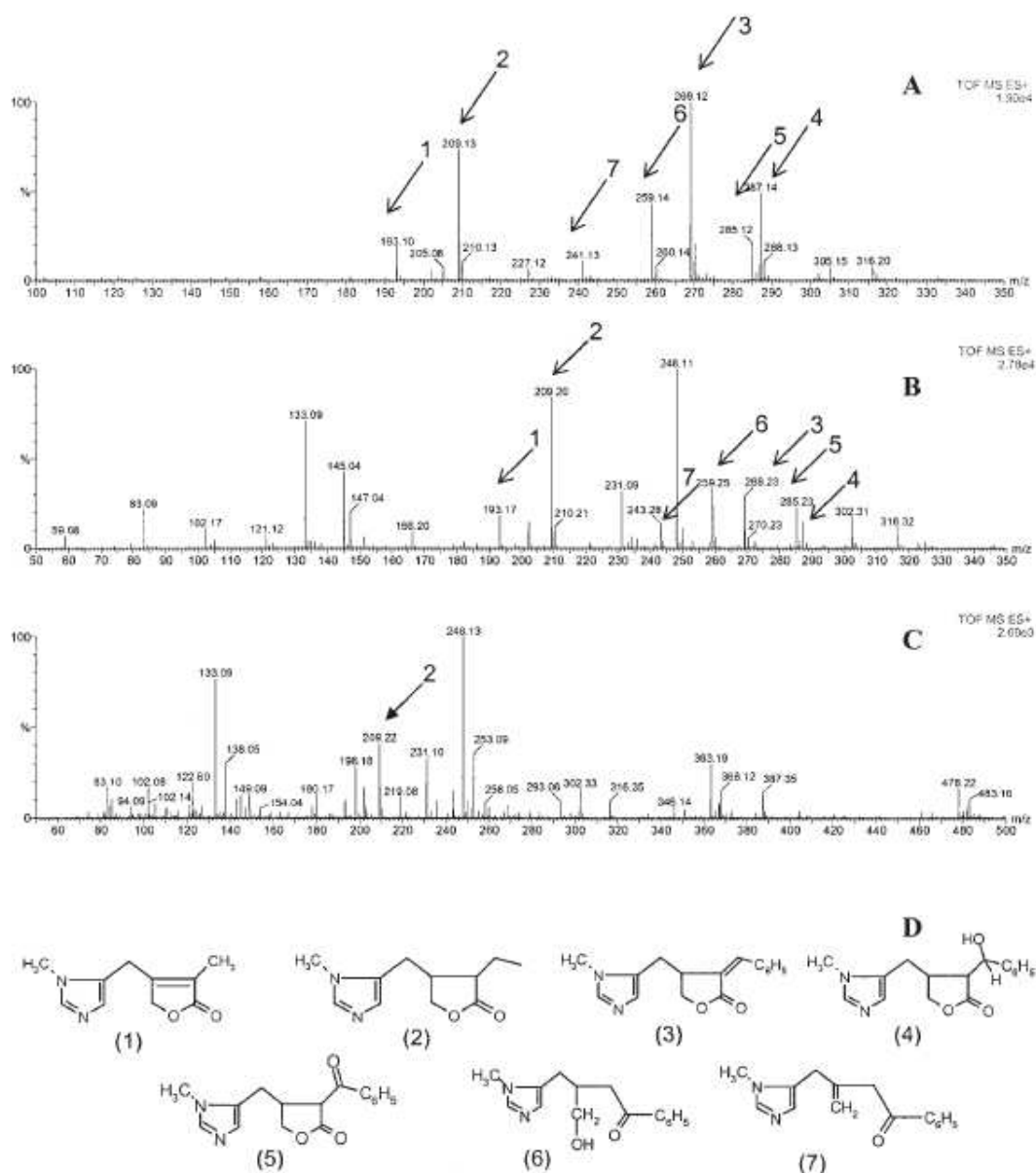


Fig. 5 Fingerprint [ESI(+)-MS] of alkaloid extracts from (A) leaves of *P. microphyllum*, (B) cells, and (C) culture medium from cell line A, after 12 subculture; and structures (D) of: (1) 13-nor-8(11)-dihydropilocar-

pine, (2) pilocarpine, (3) anhydropilosine, (4) pilosine, (5), (6) and (7) new alkaloids.

anism is still unknown (Val, 1993). Tabata (1991) showed that, in cells of *Thalictrum flavum*, an active transport system was involved in the uptake of berberine from the medium, while papaverine was passively absorbed. Release of alkaloids to the medium might be related to the pH of the medium (Vieh-

weiger et al., 2002; Val, 1993). Interestingly, after 45 days, we observed that the media used to grow lines A and C were more basic than in the other cell lines (data not shown). This seems to be in agreement with previous results in which we showed that higher pH favored the release of pilocarpine to

the medium used to grow calluses of *P. microphyllus* (Abreu et al., 2005).

The chemical structure of pilosine differs from that of pilocarpine by the presence of a benzene ring (Fig. 5D), which confers more hydrophobicity. This may possibly explain why pilosine, the main alkaloid in cells of line A, was partially released to the medium on the 15th day. Roberts et al. (2003) observed that taxol, a hydrophobic molecule, was bound to the cell wall of *Taxus canadensis* in cell suspension cultures. Rupture of the cells caused an increase in taxol in the medium. On the other hand, hydrophilic alkaloids may also be stored in the vacuole, and other mechanisms might also be controlling traffic between the tonoplast and cytoplasm.

Lines A and C were chosen for further studies because of their growth habit and alkaloid production mode. Calluses from primary culture were used to establish cell cultures, which were then subcultured 12 times, and the alkaloid production analyzed (Fig. 4). Compared with data from Fig. 3 (four subcultures), a drastic reduction in alkaloid production was observed (Fig. 4) in these cultures. Several other reports have shown a decrease in metabolite yield following long term culture. Deus-Neumann and Zenk (1984) observed this for alkaloids produced in cell suspension cultures of *C. roseus* and considered that such a decrease was due to chromosome variation. Morris et al. (1989) suggested that the loss of productivity was related to the velocity of mass accumulation, that is, fast-growing cells accumulated less alkaloid. Additionally, and as expected, several reports have indicated that medium composition and plant species have a marked influence on the alkaloid productivity, apart from just the culture time.

Extracts from leaves were analyzed for pilocarpine-derived alkaloids using ESI(+)-MS (Fig. 5A). These analyses showed the presence of ions with characteristics of well-known imidazole alkaloids: *m/z* 193 (13-nor-8[11]-dihydropilocarpine), *m/z* 209 (pilocarpine), *m/z* 269 (anhydropilosine) and *m/z* 287 (pilosine). Besides these, three new alkaloids (*m/z* 241, *m/z* 259 and *m/z* 285) were also identified. Among the six Jaborandi cell lines, line A was selected to compare alkaloid composition with alkaloids found in leaves. All alkaloids from leaves were also found in cells after 12 subcultures, as shown in an ESI(+)-MS spectrum (Fig. 5B). The ion *m/z* 209 (pilocarpine) was found in higher amounts than the other alkaloids. The alkaloid composition did not change even after 24 subcultures (data not shown). Therefore, at least qualitatively, it seems that the imidazole alkaloid metabolism in Jaborandi cells is similar to that found in leaves. Nevertheless, pilocarpine was the most abundant alkaloid in cell extracts and was also the only alkaloid detected in culture media, as revealed by the ESI(+)-MS spectra (Fig. 5C), confirming the selective membrane transport system (Fig. 3), as observed after 24 subcultures (data not shown).

Our data showed that cell cultures cultivated for long periods can be used to study the biosynthetic pathway of pilocarpine in Jaborandi, since they present the same alkaloid profile as that found in leaves. The advantage of these cell cultures is that they can be easily manipulated using different biotic and abiotic treatments, which influence the biosynthesis of the alkaloids, and thus provide an excellent study model.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP and CNPq for financial support and research fellowships and Dulce Regina Joaquim for technical assistance.

References

- Abreu, I. N., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., and Mazzafera, P. (2005) Production of pilocarpine in callus of Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 41, 806–811.
- Andrade Neto, M., Mendes, P. H., and Silveira, E. R. (1996) An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachylophus*. *Phytochemistry* 42, 885–887.
- Avancini, G., Abreu, I. N., Saldana, M. D. A., and Mazzafera, P. (2003) Induction of pilocarpine formation in Jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. *Phytochemistry* 63, 171–175.
- Bourgaud, F., Gravot, A., and Milesi, S. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 16, 839–851.
- Collin, H. A. (2001) Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 34, 119–134.
- Deus-Neumann, B. and Zenk, M. H. (1984) Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Medica* 50, 427–431.
- Dias, A. C. P., Tomas-Barberan, F. A., Fernandes-Ferreira, M., and Ferreres, F. (1998) Unusual flavonoids produced by Callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry* 48, 1165–1168.
- Facchini, P. J. (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 29–66.
- Hobbs, M. C. and Yeoman, M. M. (1991) Effect of light on alkaloid accumulation in cell – cultures of *Nicotiana* species. *Journal of Experimental Botany* 42, 1371–1378.
- Lindsey, K. and Yeoman, M. M. (1983) The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 34, 1055–1065.
- Link, H. and Bernauer, K. (1972) Über die Synthese der *Pilocarpus*-Alkaloide Isopilosin und Pilocarpin, sowie die absolute Konfiguration des (+)Isopilosins. *Helvetica Chimica Acta* 55, 1053–1062.
- Morris, P., Rudge, K., Cresswell, R., and Fowler, M. W. (1989) Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. V. Long-term maintenance of cells on a production medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 17, 79–90.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497.
- Pinheiro, C. U. B. (1997) Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop. *Economic Botany* 51, 49–58.
- Roberts, S. C., Nail, M., Gibson, D., and Shuler, M. L. (2003) A simple method for enhancing paclitaxel release from *Taxus canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes. *Plant Cell Reports* 21, 1217–1220.
- Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant-cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50, 199–204.
- Sierra, M. L., Van der Heijden, R., Ven der Leer, T., and Verpoorte, R. (1992) Stability of alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* during long term subculture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28, 59–68.
- Simola, L. K., Nieminen, S., Huhtikangas, A., Ylinen, M., Naaranlahti, T., and Lounasmaa, M. (1988) Tropic alkaloids from *Atropa-Elia-donna*. 2. Interaction of origin, age, and environment in alkaloid

- production of callus-cultures. *Journal of Natural Products* 51, 234–242.
- Tabata, M. (1991) Transport and secretion of natural products in plant cell cultures. *Planta Medica* 57, S21–S27.
- Tabata, M., Mizukami, H., Hirakoa, H., and Konoshim, M. (1974) Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 13, 927–932.
- Tabata, M., Yamamoto, H., Hirakoa, H., Marumoto, Y., and Konoshim, M. (1971) Regulation of nicotina production in *Tabacco* tissue culture by plant growth regulators. *Phytochemistry* 10, 723–729.
- Val, J. (1993) Modelling the physiology of plant cells in suspension culture. Thesis, University of Leiden.
- Vanhengel, A. J., Harkes, M. P., Wichers, H. J., Hesselink, P. C. M., and Buitelaar, R. M. (1992) Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28, 11–18.
- Vazquez-Flota, F., De Luca, V., Carrillo-Pech, M., Canto-Flick, A., and Miranda-Ham, M. D. (2002) Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Molecular Biotechnology* 22, 1–8.
- Viehweger, K., Dordschbal, B., and Roos, W. (2002) Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signaling via the activation of Na⁺-dependent proton fluxes. *Plant Cell* 14, 1509–1525.
- Voigtlander, H. W., Balsam, G., and Engelhardt, M. (1978) Epiisopiloturin, ein neues *Pilocarpus*-Alkaloid. *Archiv der Pharmazie* 311, 927–935.
- Yu, F., Zhang, D. Y., Bai, F. W., and An, L. J. (2005) The accumulation of isocamptothecin A and B in suspension cell culture of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81, 159–163.
- Zenk, M. H., El-Shagi, H., and Schulte, U. (1975) Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica* 79–101.

I. N. de Abreu

Departamento de Fisiologia Vegetal
Instituto de Biologia
C.P. 6109
13083-970 Campinas, SP
Brasil

E-mail: inabreu@yahoo.com.br

Editor: E. Pichersky

Production of imidazole alkaloids in cell cultures of jaborandi as affected by the medium pH

N. L. Andreazza · I. N. Abreu ·
A. C. H. F. Sawaya · M. N. Eberlin ·
P. Mazzafera

Received: 24 September 2008 / Revised: 13 November 2008 / Accepted: 18 November 2008 / Published online: 9 December 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract The effect of pH (from 4.8 to 9.8) on the production of pilosine and pilocarpine and on their partition between cell and medium was studied in two lineages (P and PP) of *Pilocarpus microphyllus* cell suspension cultures. Highest mass accumulation was observed at high pHs and both lineages produced pilocarpine while only lineage PP produced pilosine. Both alkaloids were released in the medium but higher accumulation occurred in the cells. The highest production of pilocarpine was at pH 8.8–9.8 in both cell lineages. Other imidazole alkaloids were also identified in both lineages. At all pHs tested, the pH in the media cultures tended to stabilize around 6 after 10–15 days of cultivation. NO_3^- and NH_4^+ variation in the media might partially explain the pH stabilization.

Keywords Medium pH · Membrane transporters · Pilocarpine · *Pilocarpus microphyllus* · Pilosine

Introduction

Pilocarpine is an imidazole alkaloid used in the treatment of glaucoma, as a stimulant of sweat and lachrymal glands, and in the context of xerostomia (Wynn 1996; Migdal 2000; Davies et al. 2001). Although more efficient synthetic substances have been produced, such as beta-blockers, pilocarpine is still the standard substance for the treatment of glaucoma.

Plants of the genus *Pilocarpus* (Rutaceae) are the only source of pilocarpine in nature and jaborandi (*P. microphyllus*) is the species accumulating the highest concentration of this alkaloid in its leaves (0.5–1%) (Pinheiro 1997). Although information on the content of pilocarpine in jaborandi is available (Pinheiro 1997; Andrade-Neto et al. 1996), very little is known about its biosynthesis (Avancini et al. 2003; Abreu et al. 2005, 2007a, b; Sandhu et al. 2006; Sawaya et al. 2008).

Because several secondary metabolites have physiological effects on animals, many of them are commercially exploited as components of medicines, insecticides, colorants and aromatizers (Verpoorte et al. 1999). Cell cultures have been intensively studied as an alternative to produce secondary

N. L. Andreazza · I. N. Abreu · P. Mazzafera (✉)
Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, CP 6109,
Campinas 13083-970, SP, Brazil
e-mail: pmazza@unicamp.br

I. N. Abreu
Plant Physiology Department, Umeå University, Umeå,
Sweden

A. C. H. F. Sawaya · M. N. Eberlin
Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas,
CP 6109, Campinas 13083-970, SP, Brazil

metabolites in a profitable manner by using large bioreactors (Verpoorte and Memelink 2002) and variations in the temperature, oxygen availability, light, medium composition and exposure to elicitors are usually evaluated in these studies (Dong and Zhong 2001; Biondi et al. 2004).

Previously, we have observed a strong influence of medium pH on the production of pilocarpine and the related alkaloid pilosine in calluses obtained from jaborandi leaf petioles (Abreu et al. 2005) and, later, we validated cell suspensions as a model to study the biosynthesis of imidazole alkaloids in jaborandi (Abreu et al. 2007a). In this work, two jaborandi cell lineages were studied regarding their ability to produce and release pilocarpine and pilosine in the medium, as well as the effects of pH on the partition of these alkaloids between cell and medium. Our long-term aim is to understand how pH affects the transport of the alkaloids through the membrane in order to get clues about the mechanisms governing the process.

Materials and methods

Cell cultures

Calluses obtained from jaborandi leaf petioles were used to establish cell suspension cultures (Abreu et al. 2007a). Two cell lineages (P and PP) were selected for this work due to their rapid growth rate and visual aspects, but mainly because they differed in the production and release of pilocarpine and pilosine in the culture medium, as shown by preliminary analyses (data not shown). These cell cultures were grown in 125 ml Erlenmeyer flasks with 30 ml MS culture medium (Murashige and Skoog 1962), containing 5.77 μM 2,4-D, and 3% sucrose (pH 5.8) and kept in the dark in an orbital shaker (110 rpm). Sub-culturing was carried out each 15 days.

Cell growth curve

Approx. 2 g cells from 15-day-old cell cultures were transferred to flasks containing media at varying pHs: 4.8, 5.8, 6.8, 7.8, 8.8 and 9.8. The cultures were maintained in darkness at 110 rpm agitation. A growth curve was obtained sampling 3 cultures

flasks and determining the cell dry weight every 5th day starting at day 10. This experiment was repeated three times and, although some variations have been observed in terms of final cell mass, the final position of each treatment was the same. Therefore, only the results of the first experiment are presented.

Biochemical determinations

Cell cultures were established as above and allowed to grow for 30 days. They were used for two proposes: (1) During 12 days, on every second day, 300 μl of medium were collected from each flask and the pH was determined with a narrow pH electrode and then NO_3^- and NH_4^+ concentrations were determined in the medium according to Cataldo et al. (1975); McCullough (1967), respectively; (2) From the same flasks, 2 ml aliquots were collected every 5th day, starting at day 10, until the culture had completed 30 days. The cells were recovered by filtration, freeze-dried and then analysed for alkaloids. The pH of these 2 ml aliquots were also determined, and then the aliquots were freeze-dried for alkaloid analysis. We did not observe any salt precipitation in the media at any pH. This experiment was repeated twice with similar results regarding pH and alkaloid determinations. In the first experiment, however, we did not measure NO_3^- and NH_4^+ and therefore only the data of the second experiment is presented. Three replicates were set up for each pH treatment.

Extraction and analysis of pilocarpine and pilosine

Freeze-dried cells were extracted and quantified by HPLC according to Avancini et al. (2003). The media cultures were extracted by adding the solvents, following the same sequence as for freeze-dried cells. Injections with pure standards of pilocarpine (Sigma) and pilosine (a gift from the Centroflora Group—<http://www.centroflora.com.br>) were used to calculate the alkaloid concentration in the samples. Retention time, UV spectra and co-injection with pure standards were used to identify the substances in the chromatography runs. The concentrations were expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ cell dry mass and or $\mu\text{g ml}^{-1}$ culture medium.

Identification of alkaloids by mass spectrometry

Imidazole alkaloids in the cells or media were identified according with Abreu et al. (2005).

Results

Lineages P and PP differed markedly in terms of morphology. Lineage P formed friable and small cell clusters, while lineage PP formed bigger and compact cell clusters.

Both lineages showed the best cell growth at pHs 6.8 and 8.8 (Fig. 1) and a similar trend regarding pH variation. However, lineage P (Fig. 2a) stabilized at a lower pH than lineage PP (Fig. 2b).

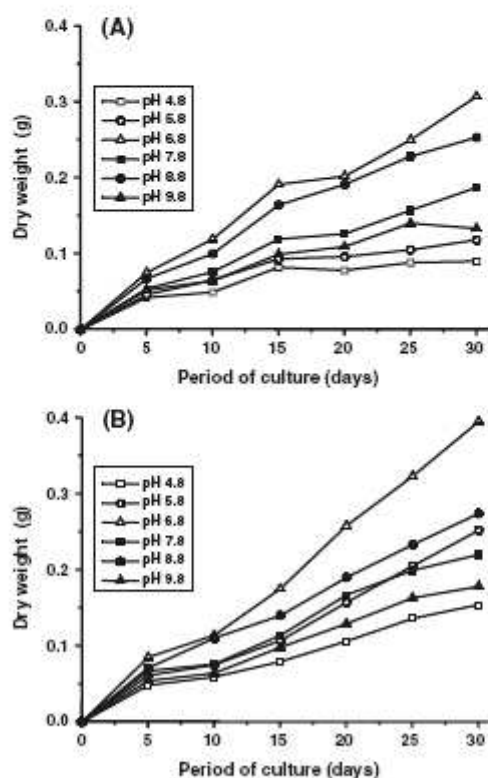


Fig. 1 Cell mass accumulation in cell suspension cultures of lineages P (a) and PP (b) of *Pilocarpus microphyllus*, with different initial medium pHs, during 30 days of cultivation

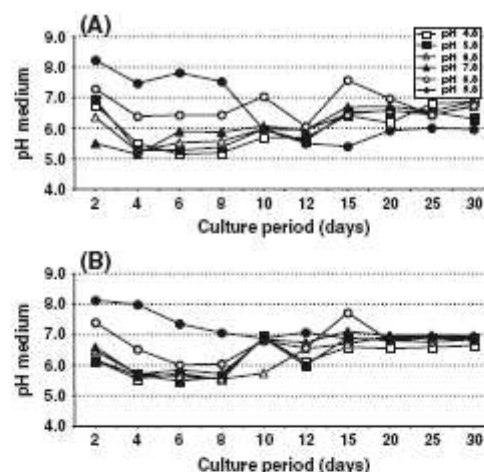


Fig. 2 pH variation in the culture medium of lineage P (a) and PP (b) of *P. microphyllus*, with different initial medium pHs, during 30 days of cultivation

Nitrate content decreased in the media during cell culturing (Fig. 3a, b). The content in lineage PP was lower than lineage P on the 2nd day, but remained higher on the 12th day. The content of NH_4^+ varied very similarly in both lineages at the various pHs (Fig. 3c, d). It is noteworthy that for both lineages at pH 9.8, the NH_4^+ content was very low beginning on the 2nd day.

Lineage P and PP produced significant amounts of pilocarpine, while lineage PP produced pilosine as well. Alkaloid production was always higher in the cells. These results are presented separately in the following sections.

Lineage P

Cells of this lineage produced and released pilocarpine into the medium. Unexpectedly, the highest pilocarpine production occurred at high pHs, mainly after the 20th day. At pHs 8.8 and 9.8 (Fig. 4a), the cells were still viable after 30 days, as shown by viability testing carried out with fluorescein diacetate (Balestri and Cinelli 2001). At all pHs, the pilocarpine concentration in the cells was strongly reduced on the 30th day (Fig. 4a). Pilocarpine was also highest at high media pHs and at all pHs there was a marked decrease of alkaloid concentration on the 30th day (Fig. 4b).

Fig. 3 Nitrate (a, b) and ammonium (c, d) contents in the culture media of lineages P (a, c) and PP (b, d) of *P. microphyllus*, with different initial medium pHs, during 12 days of cultivation

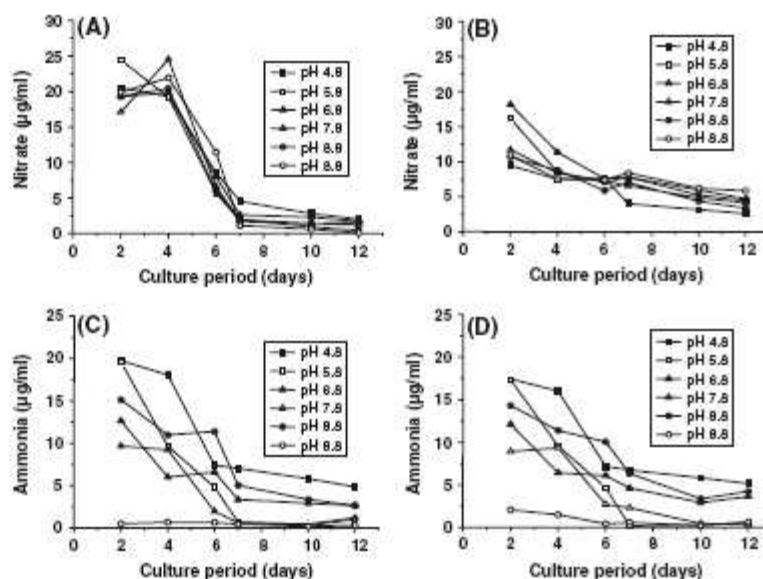
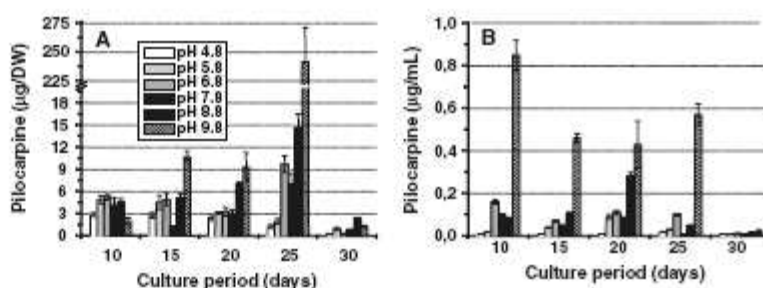


Fig. 4 Pilocarpine contents in the cells (a) and in the medium (b) of cell culture lineage P (*P. microphyllus*), with different initial medium pHs, during 30 days of cultivation



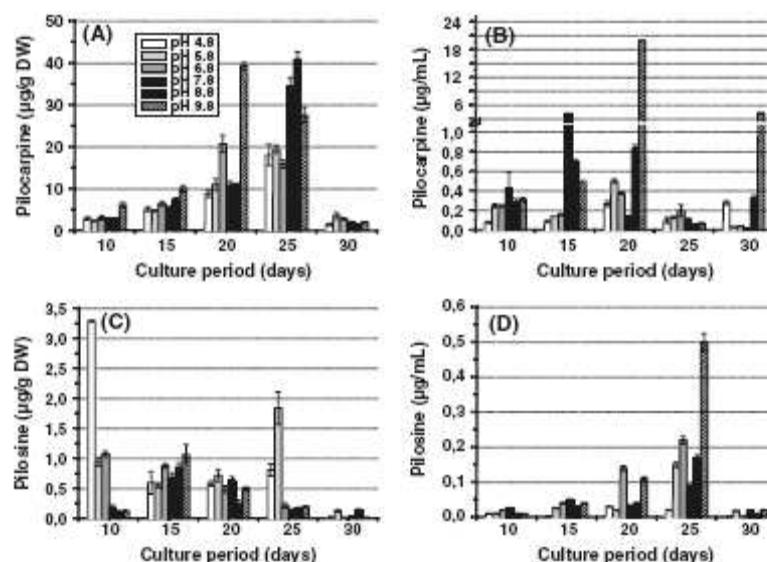
Lineage PP

In general, the quantities of pilocarpine in the cells and media of lineage PP were higher than the values found in lineage P (Fig. 5a, b). The highest production of pilocarpine in lineage PP occurred after the 20th day, at high pHs (Fig. 5a). At low pHs there was an increase of pilocarpine production during the cultivation period, a phenomenon that was not observed with lineage P. There was also a marked decrease of pilocarpine on the 30th day at all pH treatments. Pilocarpine also accumulated in the medium at high pHs and a decrease of content occurred on the 25th day, 5 days before the decrease observed in the cells (Fig. 5b). Much less of the pilosine alkaloid was

produced by lineage PP (Fig. 5c). Except 25th day/pH 5.8, pilosine accumulated in the cells at high concentrations on the 10th or 15th days (Fig. 5c). On the 30th day, there was a marked decrease of pilosine in the cells. In the media, the greatest accumulation of pilosine was always on the 25th day, being highest at pH 9.8 (Fig. 5d). On the 30th day, the pilosine content in the media was also reduced.

In addition to the lack of pilosine in lineage P, there were other variations in the composition of other alkaloids. Mass spectrometry analysis allowed the identification of 6 alkaloids in cells of lineage P and PP, and in the media culture: pilocarpine (m/z 209), pilosine (m/z 287), anhydropilosine (m/z 269), 13-nor-8(11)-dihydropilocarpine (m/z 193), 3-hydroxymethyl-

Fig. 5 Pilocarpine (a, b) and pilosine (c, d) contents in the cells (a, c) and in the medium (b, d) of lineage PP (*P. microphyllus*), with different initial medium pHs, during 30 days of cultivation



4-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)-1-phenyl-butan-1-one (m/z 259) and 3-benzoyl-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-ylmethyl)-dihydro-furan-2-one (m/z 285) (Table 1).

Discussion

The cell suspensions of jaborandi were established from callus cultures produced from petioles from the same *P. microphyllus* plant. Nevertheless, lineages P and PP presented very distinct morphological and physiological characteristics, in terms of cluster formation, growth rate, and alkaloid production. Such variations have been reported in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (El-Sayed et al. 2004) and *Ocimum basilicum* (Kintzios et al. 2003).

Cell organization may be necessary for the production of some secondary metabolites (Brodelius et al. 1979; Haldimann and Brodelius 1987; Charlet et al. 2000), however, histological preparations made with typical clusters of each jaborandi lineage had no perceptible differences in terms of cell organization. Therefore, it seems that differential alkaloid production in jaborandi cells is not related to cell differentiation.

Pilocarpine which is sold throughout the world comes exclusively from jaborandi plants grown in South America, particularly from the region of the Brazilian Amazon forest (Pinheiro 1997) and, until

recently, the leaves used for extraction were collected from native plants growing in the wild, resulting in the addition of jaborandi to the list of Brazilian endangered species.

The industrial extraction of pilocarpine from the jaborandi leaves uses organic solvents. Since pilosine has no commercial use, it is considered a contaminant, and additional steps are necessary for its separation from pilocarpine (Centroflora Group, personal communication). Therefore, lineage P would be interesting for commercial exploration using bioreactors, since it is friable and produces and excretes exclusively pilocarpine. In contrast, although lineage PP produces pilosine and pilocarpine, it is an interesting model to study the biosynthesis of imidazole alkaloids in jaborandi since the biosynthesis routes of pilocarpine and pilosine seem to be related (Abreu et al. 2007b; Sawaya et al. 2008).

Growth of the cell suspension cultures of jaborandi showed highest mass accumulation at high pHs. However, there was no relationship between cell proliferation and alkaloid production in the cells or released in the medium, nor with the total alkaloid production per flask. The lack of a correlational between growth and alkaloid production was also observed in *Camptotheca acuminata*, where the increase of camptothecine occurred in the stationary phase of the cell culture, while the increase of

Table 1 Alkaloid composition in cells and media of cell suspension cultures of *P. microphyllus* at different initial medium pHs on the 30th day of cultivation

Alkaloid	Cell/ medium	Media pH					
		4.8	5.8	6.8	7.8	8.8	9.8
<i>m/z</i> 209 (pilocarpine)	Cell P	x	x	x	x	x	x
	Medium P	x	x	x	x	x	x
	Cell PP	x	x	x	x	x	x
	Medium PP	x	x	x	x	x	x
<i>m/z</i> 287 (pilosine)	Cell P						
	Medium P						
	Cell PP	x	x	x	x	x	x
	Medium PP	x	x	x	x	x	x
<i>m/z</i> 269	Cell P		x	x	x	x	x
	Medium P		x	x	x	x	x
	Cell PP	x	x	x	x	x	x
	Medium PP	x	x	x	x	x	x
<i>m/z</i> 193	Cell P		x	x			
	Medium P					x	
	Cell PP		x	x		x	
	Medium PP		x				
<i>m/z</i> 241	Cell P					x	
	Medium P						
	Cell PP						
	Medium PP						
<i>m/z</i> 259	Cell P		x	x		x	x
	Medium P		x	x		x	x
	Cell PP		x	x	x	x	x
	Medium PP						
<i>m/z</i> 285	Cell P		x				
	Medium P						
	Cell PP		x	x	x	x	
	Medium PP		x	x	x	x	

m/z 269 = anhydropilosine; *m/z* 193 = 13-nor-8(11)-dihydro-pilocarpine; *m/z* 241 = 3-(3-methyl-3H-imidazol-4-ylmethyl)-1-phenylbut-3-en-1-one; *m/z* 259 = 3-hydroxymethyl-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-yl)-1-phenylbutan-1-one; *m/z* 285 = 3-benzoyl-4-(3-methyl-3H-imidazol-4-ylmethyl)-dihydro-furan-2-one

isocampthecines A and B occurred when growth was highest (Van Hengel et al. 1992; Yu et al. 2005). Nevertheless, the data in the literature eludes consensus, since caffeine accumulation occurred in coffee cell cultures during the senescing phase (Buckland and Townsley 1975; Baumann and Rohrig 1989).

Here, the concentrations of the imidazole alkaloids were always higher in the cells and, in general, the

greatest accumulation of pilocarpine in the medium and cells occurred on the same day (but not for pilosine in lineage PP). The high production on a specific day and the release of alkaloids to the medium might be an attempt of the cells to buffer the pH of the medium. In aqueous solution, pilocarpine may epimerize to isopilocarpine which, in turn, hydrolyzes to isopilocarpic acid (Abreu et al. 2007b). Unfortunately, diastereoisomers cannot be distinguished from their original structures by the ESI-MS method used here (Abreu et al. 2007a; Sawaya et al. 2008). Together with the other alkaloids detected in the cell and in the media, the pH might be controlled by alkaloid production, release and/or modification of the acidic form.

Curiously, while the pH of all treatments stabilized around 6 after the 15th day in both lineages, the highest pilocarpine production was observed on the 25th day, particularly at pHs 8.8 and 9.8. Therefore, it seems that the medium pH did not affect the production of this alkaloid at the beginning of cell culture, but in some way, there was a long-term effect. It is difficult to consider that pHs 8.8 and 9.8 caused a long-term stress since cells of these treatments grew well until the end of the experiment. Regarding pilosine, the opposite seems to happen, as the highest production of this alkaloid was observed at pH 4.8 and on the 10th day.

Stabilization of the pH in media cultures with initially high pHs has been reported (Takayama et al. 1977; Minocha 1987) and a common explanation for such variations has been the changes in the NH_4^+ and NO_3^- content due to a differential absorption of these nutrients by the cells (Minocha 1987; Salisbury and Ross 1992).

In both lineages the NH_4^+ content was already low on the 2nd day at pHs 6.8–8.8. On the same day, the NH_4^+ content of cells of pH 9.8 flasks was even lower, indicating an intense absorption. However, the medium pH stabilized only at the 10th day for lineage P and at the 15th day for lineage PP. This lack of a relationship between NH_4^+ content and pH stabilization might result from slow absorption of NO_3^- , with a consequent lower release of H^+ into the medium.

Pilocarpine production per flask (cells + culture medium) varied during the experiment. Therefore, either the alkaloids were degraded (intra- and extracellularly) or, after release, they were re-absorbed and degraded inside the cells. Some plant cell suspension

cultures can absorb alkaloids previously released into the medium (Sakai et al. 2002; Terasaka et al. 2003; Goodman et al. 2004) but the control of such re-absorption and the transport of this class of compounds through membranes is still largely unexplored.

Two mechanisms are known for the transport of secondary metabolites across membranes of plant cells: a system involving a H^+ gradient, mediated by a H^+ -antiporter, and a second system called the ATP-Binding Cassette (ABC) (Martinoia et al. 2002; Yazaki 2006). Control by protein membrane transporters might explain the variation in pilocarpine and pilosine levels in the cells and in the culture medium in all pH treatments. To our knowledge, no study had thus far focused on the effect of medium pH as opposed to membrane transporters in the control of plant cell secondary metabolite content. Pilocarpine accumulated in the cells in acidic medium in the first days of the experiments, while the opposite was observed for pilocarpine, which accumulated when the pH had stabilized to around 6.

Therefore, an important next step it is to investigate the proteins mediating the transport of pilocarpine and pilosine in the jaborandi cells, using specific inhibitors. Further research is necessary to determine how the effect of medium pH can change the response of these proteins, in order to increase the release of alkaloids to the medium as a way of making their economical exploitation possible using bioreactors.

Acknowledgements N.L.A., I.N.A. and A.C.H.F.S. thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico do Brasil (CNPq-Brasil) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for student fellowships. M.N.E. and P.M. thank CNPq-Brasil for research fellowships. This work was partially supported by FAPESP.

References

- Abreu IN, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Mazzafera P et al (2005) Production of pilocarpine in callus of Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). In Vitro Cell Dev Biol Plant 41:806–811
- Abreu IN, Andreazza NL, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Mazzafera P (2007a) Cell suspension as a tool to study the biosynthesis of pilocarpine in Jaborandi. Plant Biol 9: 793–799
- Abreu IN, Mazzafera P, Eberlin MN, Zullo MAT, Sawaya ACHF (2007b) Characterization of the variation of the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 21:1205–1213
- Andrade-Neto M, Mendes PH, Silveira ER (1996) An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachylophus*. Phytochemistry 42:885–887
- Avancini G, Abreu IN, Saldana MDA, Mohamed RS, Mazzafera P (2003) Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methylasmonate. Phytochemistry 63:171–175
- Balestri E, Cinelli F (2001) Isolation and cell wall regeneration of protoplasts from *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*. Aquat Bot 70:237–242
- Baumann T, Rohrig L (1989) Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. Phytochemistry 28:2667–2669
- Biondi S, Antognoni F, Perellino NC, Sacchetti G, Minghetti A, Poli F (2004) Medium composition and methyl jasmonate influence the amount and spectrum of secondary metabolites in callus cultures of *Zanthoxylum stenophyllum* Hemsl. Plant Biosyst 138:117–124
- Brodellius P, Deus B, Mosbach K, Zenk MH (1979) Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. FEBS Lett 103:93–97
- Buckland E, Townsley PM (1975) Coffee cell suspension cultures: caffeine and chlorogenic acid content. J Inst Can Sci Technol 8:164–165
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun Soil Sci Plant Anal 6:71–80
- Charlet S, Gillet F, Villarreal ML, Barbotin JN, Fliniaux MA, Nava-Saucedod JE (2000) Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells within Ca-alginate gel beads to produce an antimycotic spirostanol saponin. Plant Physiol Biochem 38:875–880
- Davies AN, Bradley K, Beighton D (2001) Xerostomia in patients with advanced cancer. J Pain Symp Manag 22: 820–825
- Dong H, Zhong J (2001) Significant improvement of taxane cell production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. Biotechnol Eng J 8:145–150
- El-Sayed M, Choi YH, Frédrich M, Roytrakul S, Verpoorte R (2004) Alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cell suspension fed with stemmadenine. Biotechnol Lett 26:793–798
- Goodman CD, Casati P, Walbot V (2004) A multidrug resistance associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. Plant Cell 16:1812–1826
- Haldimann D, Brodellius P (1987) Redirecting cellular metabolism by immobilization of cultured plant cells: a model study with *Coffea arabica*. Phytochemistry 26:1431–1434
- Kintzios S, Makri O, Panagiotopoulos E, Scapeti M (2003) In vitro rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Biotechnol Lett 25:405–408
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu Ü, Müller-Röber B, Schulz B (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. Planta 214:345–355

- McCullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta* 17:297–304
- Migdal C (2000) Glaucoma medical treatment: philosophy, principles and practice. *Eye* 14:515–518
- Minocha SC (1987) pH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds) *Cell and tissue culture in forestry vol. 1: general principles and biotechnology*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 125–141
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with *tobacco* tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Pinheiro CUB (1997) Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its transformation into a crop. *Econ Bot* 51:49–58
- Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K (2002) Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *J Exp Bot* 53: 1879–1886
- Salisbury FB, Ross CW (1992) *Plant physiology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont
- Sandhu SS, Abreu IN, Colombo C, Mazzafera P (2006) Pilocarpine content and molecular diversity in Jaborandi. *Sci Agric* 63:478–482
- Sawaya ACHF, Abreu IN, Andreazza NL, Eberlin M, Mazzafera P (2008) HPLC-ESI-MS/MS of imidazole alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules* 13:1518–1529
- Takayama S, Misawa M, Ko K, Misato T (1977) Effect of cultural conditions on the growth of *Agrostemma githago* cell in suspension culture and concomitant production of an anti-plant virus substance. *Physiol Plant* 41:313–320
- Terasaka K, Sakai K, Sato F, Yamamoto H, Yasaki K (2003) *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry* 62:483–489
- Van Hengel AJ, Harkes MP, Wichers HJ, Hesselink PGM, Buitelaar RM (1992) Characterization of callus and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28:11–18
- Verpoorte R, Memelink J (2002) Engineering secondary metabolite in plant. *Curr Opin Biotechnol* 13:181–187
- Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG, Memelink J (1999) Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol Lett* 21:467–479
- Wynn RL (1996) Oral pilocarpine (Salagen): a recently approved salivary stimulant. *Gen Dent* 44:29–30
- Yazaki K (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett* 580:1183–1191
- Yu F, Zhang D, Bai F, An L (2005) The accumulation of isocamptothecin A and B in suspension cell culture of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 81: 159–163