

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

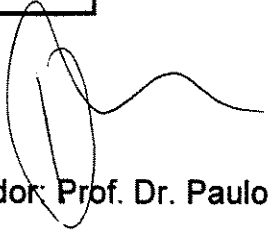


Ilka Nacif de Abreu

**ISOLAMENTO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE
INTERESSE FARMACOLÓGICO DE *Hypericum*
brasiliense Choisy.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ilka Nacif de Abreu
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal.**


Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTR
SEÇÃO CIRCULAN

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	Ab86i
V	EX
TOMBO BC/	54499
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	26/06/03
Nº CPD	

CM00186565-8

BIB ID 295262

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Ab86i

Abreu, Ilka Nacif de

Isolamento e produção de substâncias de
interesse farmacológico de *Hypericum brasiliense* Choisy./ Ilka Nacif
de Abreu. --
Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Paulo Mazzafera

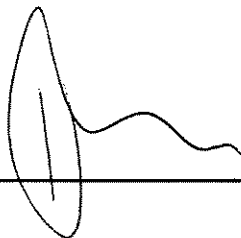
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Metabolismo secundário. 2. Plantas medicinais 3. Fitoquímica.
I. Mazzafera, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 07/11/2002

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador)

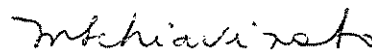


Profa. Dra. Alba Regina Monteiro de Souza Brito

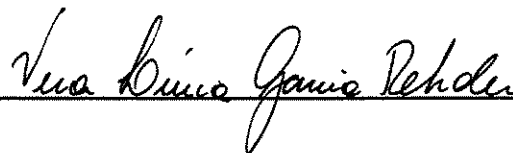


Prof. Dr. Nelson Delú Filho

Profa. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato

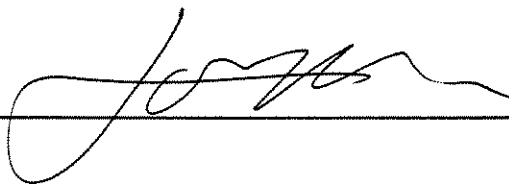


Prof. Dra. Vera Lucia Garcia Rehder



Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Prof. Dr. Jorge Vega



20021692

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

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

À FAEP da Unicamp, pelo financiamento e auxílios fornecidos durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Paulo Mazzafera pela orientação, apoio e amizade.

Às pesquisadoras Anita J. Marsaioli e Vera Solferini, pela orientação em parte dos trabalhos.

Aos amigos Maria Teresa (Genética), Mariza (química) e André (química), pela colaboração na realização de parte dos trabalhos.

Ao CPQBA, pelo fornecimento de material vegetal.

Aos professores Marlene Schiavinato, Vera L.G. Rehder e Alba M.R.S. Brito, pela leitura atenciosa e valiosos comentários.

Aos funcionários do Departamento, pelo apoio e colaboração.

Aos amigos que sempre estão presentes em todas as horas, em especial ao carinho e companheirismo de Clara, Juliana e Milton.

E, aos meus pais, Joaquim e Manira, pelo apoio em todas as horas.

ÍNDICE

	Página
Banca Examinadora	iii
Agradecimentos	iv
Abreviaturas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de Anexos	xii
Resumo	xiii
Summary	xv
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivos gerais	5
3. Referências Bibliográficas	6
4. Conclusões Finais.....	167
Capítulo 1:	
Produção de fenilpropanóides e ácido betulínico em plantas de	
<i>Hypericum brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico e de	
temperatura	
1. Introdução	11
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	32

4. Resultados	48
5. Discussão	79
6. Referências Bibliográficas	98
7. Anexos	117

Capítulo 2:

Variabilidade genética e florescimento *in vitro* de *Hypericum brasiliense*.

1. Introdução	129
2. Objetivos	133
3. Materiais e Métodos	134
4. Resultados e Discussão	140
5. Referências Bibliográficas	148

Capítulo 3:

Composição do óleo essencial de *Hypericum brasiliense*.

1. Introdução	154
2. Objetivo	156
3. Materiais e Métodos	157
4. Resultados e Discussão	160
5. Referências Bibliográficas	164

ABREVIATURAS

ACC	Ácido aminociclopropano-1-carboxílico
ACPH	Fosfatase ácida
AK	Adenilato quinase
BSA	Soroalbumina bovina
CHS	Chalcona sintase
DIECA	Dietilditiocarbamato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EST	Esterase
GOT	Glutamato – oxalacetato transaminase
HK	Hexocinase
IDH	Isocitrato desidrogenase
IPP	Isopentenil pirofosfato
IR	Índice Relativo de retenção
MAO	Monoamina oxidase
MCW	Metanol, clorofórmio, água
MDA	Malondialdeído
MDH	Malato desidrogenase
PAI	Fenilalanina amônia liase
PGI	Fosfogluco isomerase
PGM	Fosfoglucomutase
PSII	Fotossistema II
PVP	Polivinilpirrolidona
RMN	Ressonância Magnética nuclear
Rubisco	Ribulose 1,5-bisfosfato
SKDH	Chiquimato desidrogenase
TR	Tempo de retenção

LISTA DE FIGURAS

Página

Introdução Geral

Figura 1	<i>H. brasiliense</i>	4
-----------------	-----------------------	---

Capítulo 1

Figura 1	Estrutura básica das xantonas e flavonóides	11
Figura 2	Estrutura da flavona, quercetina e rutina.	13
Figura 3	Exemplos de acilfloroglucínóis de <i>H. brasiliense</i> .	14
Figura 4	Estrutura do ácido betulínico.	16
Figura 5	Biossíntese de xantona, acilfloroglucinol, quercetina, rutina e antocianinas	18
Figura 6	Esquema biossintético da formação de 1-deoxi-D-xilulose-5P, a partir do Ciclo de Calvin. Reação mediada pela 1-deoxi-D-xilulose-5P-sintase (1).	21
Figura 7	Compartimentalização da biossíntese do isopreno.	22
Figura 8	Resumo da etapa fitoquímica do extrato diclorometânico de <i>H. brasiliense</i>	35
Figura 9	Espectros cromatográficos em HPLC (284 nm) do extrato em diclorometano da raiz (A) de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a déficit hídrico, do padrão de acilfloroglucinol (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).	51
Figura 10	Espectros cromatográficos em HPLC (254 nm) do extrato em diclorometano da raiz de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a déficit hídrico (A), do padrão de xantona (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).	52
Figura 11	Espectros cromatográficos, em HPLC (254 nm) do extrato metanólico da parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> pertencentes ao experimento de estresse hídrico (A), do padrão de quercetina (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).	53
Figura 12	Espectros cromatográficos, em HPLC (254 nm) do extrato metanólico da parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a temperatura constante de 36°C (A), do padrão de rutina (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).	54
Figura 13	Conteúdo de xantona (A), quercetina (B), rutina (C) nas diferentes partes das plantas (A= região apical; MS= região mediana superior; MI= região mediana inferior; R= raiz) e acilfloroglucinol (D) nas raízes de <i>H. brasiliense</i> em diferentes estádios de desenvolvimento.	55
Figura 14	Conteúdo de ácido betulínico nas diferentes partes das plantas (A= região apical; MS= região mediana superior;	57

	MI= região mediana inferior; R= raiz) de <i>H. brasiliense</i> (contendo a massa em g) em diferentes estádios de desenvolvimento.	
Figura 15	Conteúdo total de compostos fenólicos (xantona, rutina, quercetina e acilfloroglucinol) (A) e ácido betulínico (B) em plantas de <i>H. brasiliense</i> em diferentes estádios de desenvolvimento.	58
Figura 16	Massa fresca da parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial).	59
Figura 17	Eficiência quântica do PSII (A), conteúdo de MDA (B) e prolina (C) na parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial).	61
Figura 18	Conteúdo de fenóis totais (A) e antocianinas (B) na parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial).	62
Figura 19	Conteúdo de xantona (A), quercetina (B) e rutina (C) na parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial).	64
Figura 20	Teor (mg/g) e conteúdo (mg/parte aérea) de compostos fenólicos totais (xantona, quercetina e rutina) e massa	66

	fresca da parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial).	
Figura 21	Produção de ácido betulínico na parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial).	67
Figura 22	Teor (mg/g) e conteúdo (mg/parte aérea) de ácido betulínico (mg/g) e massa fresca (g) na parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial).	68
Figura 23	Massa fresca (g) da parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> mantidas sob estresse hídrico, durante 15 dias.	69
Figura 24	Potencial hídrico (A), teor de MDA na parte aérea e raiz (B) e teor de prolina (C) na parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico durante 15 dias.	70
Figura 25	Teores de fenóis totais na parte aérea e raiz (A) e antocianinas (B) em plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico durante 15 dias.	71
Figura 26	Espectro no UV e estrutura da cianidina de <i>H. brasiliense</i> .	72
Figura 27	Conteúdo de acilfloroglucinol, em extratos obtidos a partir de éter de petróleo e diclorometano, em raízes de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico durante 15 dias.	73
Figura 28	Teores de xantonas na parte aérea e raiz de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico durante 15 dias.	74
Figura 29	Produção de quercetina e rutina na parte aérea de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico durante 15	75

	dias.	
Figura 30	Teor (mg/g) e conteúdo (mg/planta) de compostos fenólicos totais (xantonas, acilfloroglucinol, quercetinas e rutina) e massa fresca da planta inteira (parte aérea e raiz) de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico.	76
Figura 31	Produção de ácido betulínico na parte aérea e raiz de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico, durante 15 dias.	77
Figura 32	Teor (mg/g) e conteúdo (mg/planta) de ácido betulínico total e massa fresca (parte aérea e raiz) de plantas de <i>H. brasiliense</i> submetidas a estresse hídrico durante 15 dias.	77
Figura 33	Atribuição do deslocamento de C ¹³ na molécula de Isouliginosina de <i>H. brasiliense</i> .	79
Figura 34	Atribuição dos deslocamentos de C ¹³ na molécula de ácido betulínico de <i>H. brasiliense</i> .	80
Figura 35	Estrutura da 1,5-Diidroxixantona de <i>H. brasiliense</i> , com possíveis radicais adicionais não identificados.	81

Capítulo 2

Figura 1	Zimogramas de diferentes isozimas de plantas adultas de <i>H. brasiliense</i> , com os respectivos números de locus, realizados nos sistemas 1, 2 e 3.	140
Figura 2	Zimogramas das isozimas de MDH (A) e PGI (B) analisadas em plântulas germinadas a partir de sementes do mesmo fruto (indivíduo número 10) de <i>H. brasiliense</i> .	141
Figura 3	Número de gemas e altura de plântulas de <i>H. brasiliense</i> , cultivadas em meio sólido e líquido <i>in vitro</i> durante 20 dias, oriundas de gemas apicais de plantas em estágio de desenvolvimento juvenil e adulto.	144
Figura 4	Desenvolvimento de plântulas de <i>H. brasiliense in vitro</i> , aos 20 dias: (A) plântulas formadas a partir de gemas apicais provenientes de matrizes juvenis; (B) florescimento de plântulas formadas a partir de gemas apicais oriundas de matrizes adultas.	145

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1 Espectro de Massas do acilfloroglucinol de <i>H. brasiliense</i> .	116
Anexo 2 Espectro no UV (Abs) do acilfloroglucinol de <i>H. brasiliense</i> .	117
Anexo 3 Espectro no Infravermelho (filme) do acilfloroglucinol de <i>H. brasiliense</i> .	118
Anexo 4 Espectro de RMN de H^1 do acilfloroglucinol de <i>H. brasiliense</i> .	119
Anexo 5 Espectro de RMN de C^{13} do acilfloroglucinol de <i>H. brasiliense</i> .	120
Anexo 6 Espectro de massas do ácido betulínico de <i>H. brasiliense</i> .	121
Anexo 7 Espectro no UV (Abs) do ácido betulínico de <i>H. brasiliense</i> .	122
Anexo 8 Espectro no Infravermelho (filme) do ácido betulínico de <i>H. brasiliense</i> .	123
Anexo 9 Espectro de RMN de H^1 do ácido betulínico de <i>H. brasiliense</i> .	124
Anexo 10 Espectro de RMN de C^{13} do ácido betulínico de <i>H. brasiliense</i> .	125
Anexo 11 Espectro de Massas da xantona de <i>H. brasiliense</i> .	126

RESUMO

O crescente interesse no estudo de espécies do gênero *Hypericum*, em decorrência das publicações sobre os efeitos farmacológicos de extratos de *H. perforatum*, fez com que surgissem nos últimos anos estudos fitoquímicos e farmacológicos com *H. brasiliense*, demonstrando que a espécie apresenta grande potencial farmacológico. Neste trabalho, a partir de análises fitoquímicas em raízes de *H. brasiliense* foram isoladas as substâncias acilfloroglucinol, xantona e ácido betulínico, que tiveram suas estruturas elucidadas através de técnicas de RMN de H^1 e C^{13} , EM, UV e IV. Tais substâncias, juntamente com quercetina e rutina, também identificadas nos extratos, foram quantificadas em diferentes partes das plantas (apical, mediana superior, mediana inferior e raiz), quando em diferentes estádios de desenvolvimento (vegetativo, florescimento e frutificação) e em plantas com 2 e 3 meses, após serem submetidas a estresse hídrico (hipoxia e déficit hídrico) e térmico (10, 30, 17 e 36°C sob baixa e alta intensidade luminosa). A variabilidade genética do material utilizado nos experimentos foi avaliada através da técnica de isozimas, utilizando dez sistemas enzimáticos. Também foi estudado o potencial morfogênético *in vitro* de gemas apicais provenientes de plantas em estágio de desenvolvimento juvenil e adulto. Completando o trabalho foi realizada a análise da composição do óleo essencial através de CG-EM, por co-injeção com hidrocarbonetos de cadeia longa e comparação do índice de Kovats, dos compostos identificados, com os da literatura. A maior produção de compostos fenólicos ocorreu quando as plantas encontravam-se em florescimento, mas o maior acúmulo de ácido betulínico ocorreu quando as plantas encontravam-se em frutificação. Verificou-se produção de

metabólitos secundários em resposta às condições de estresse, havendo correlação inversa entre crescimento e a produção dos compostos analisados. Em condição de déficit hídrico houveram as maiores produções de compostos fenólicos totais e ácido betulínico, sendo que em temperatura noturna de 10°C e 36°C constante houve maior produção de compostos fenólicos totais. A produção de acilfloroglucinol intensificou-se sob déficit hídrico, mas a de xantona foi maior sob hipoxia. Também foi constatada produção de antocianinas em condições de elevada peroxidação lipídica. As análises isozimáticas revelaram que as enzimas eram monomórficas, com apenas 0,09% de variação de alelos, demonstrando que apesar da espécie não ser domesticada, praticamente não há variabilidade genética entre os indivíduos da população em estudo. As gemas apicais provenientes de plantas juvenis proporcionaram desenvolvimento *in vitro* com dominância apical, sendo que as provenientes de plantas adultas, proporcionaram florescimento *in vitro*. Do óleo essencial, 20 compostos foram identificados (94,17% da composição total do óleo), sendo os principais representantes: β -cariofileno, aromadendreno, α -humuleno, ledeno, γ -cadineno, ledol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, cubenol e α -muurolol.

SUMMARY

The increasing interest in studying representatives of the genus *Hypericum*, mainly because the recent publications on the pharmacological effects of extracts of *H. perforatum*, has motivated Brazilian scientists to investigate the species *H. brasiliense*, demonstrating its phytochemical and pharmacological potential. In the present work, the substances acylfloroglucinol, xanthone and betulinic acid were isolated from roots of *H. brasiliense* and their structure identified by NMR- H^1 and C^{13} , mass spectrometry, UV and infrared spectra. These substances, together quercetin and rutin also identified in the extracts, were quantified in different parts of *H. brasiliense* plants (in the shoot - apical, middle and bottom of the canopy - and roots), in different developmental stage (vegetative, flowering, frutification) and in plants (2 and 3 months old) subjected to water stress (hipoxy and deficit) and different temperature regimes (10, 30, 17 and 36 °C under high and low light intensity). The genetic variability was also studied in the plant material used in the above experiments, using eleven isozyme systems. In addition, the in vitro morphogenetics potential of apical meristems in two developmental stages, named here juvenile and adult stages. Other phytochemical characterization was carried out with the essential oil fraction extracted from the whole plant which was analysed and identified by gas chromatography-mass spectrometry and co-injection with long chain hydrocarbons, and the data obtained compared with the Kovats index for substances already described in the literature. From the experiments of isolation and identification of substances with pharmacological potential, the phenolic substances

(acylfloroglucinol, quercetina, rutin and xanthone) accumulated during the flowering. Betulinic acid was found in higher amounts at the fructification. It was observed increase of secondary metabolites in response to drought and a negative relationship between plant growth and the content of these compounds. Phenolic compounds and betulinic acid accumulated more under water stress. In addition, constant night temperatures (10°C and 36°C) induced the largest accumulation of phenolic compounds. There was an increase of acylfloroglucinol with water stress and xanthones increased under hipoxia. The stress was characterized by the increase in anthocyanins and membrane lipid peroxidation. Regarding the genetic variability, isozyme analyses showed that the enzymes used in the study were monomorphic showing only 0,09% allelic variation. This result means that despite of *H. brasiliense* is not domesticated genetic variability is almost absent in the population used in the present study. The apical meristem from juvenile plants proportionated plants displaying apical dominance while those from adults resulted in plants flowering *in vitro*. Twenty substances were isolated and identified in the analysis of the essential oil from *H. brasiliense* amounting for 94.17% of the total fraction. The main substances were β -caryophyllene, aromadendrene, α -humulene, ledene, γ -cadinene, ledol, caryophyllene oxide, humulen epoxide II, cubenol e α -muurolol.

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia brasileira, em conjunto com a de todo o mundo, encontra-se em processo de ampla expansão desde os anos 70 (Marques, 1999). Isto em grande parte se deve ao fato de que a oferta de plantas medicinais tem aumentado consideravelmente nos últimos 10 anos nos países industrializados (Capasso *et al.*, 2000).

Atualmente, cerca de 40% ou mais dos produtos farmacêuticos utilizados nos países industrializados são originados a partir de fontes naturais (Rout *et al.*, 2000) e, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% das populações dos países em desenvolvimento fazem uso de algum tipo de medicina tradicional para os cuidados básicos da saúde (Costa, 1995).

A crescente tendência ao uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças tem sido promovida por diversos fatores: surgimento de novas doenças para as quais não há tratamentos apropriados; movimentos ecológicos surgidos nos países ocidentais; custo elevado nos processos de síntese química; impossibilidade técnica, em alguns casos, de síntese de determinadas substâncias; largo espectro de efeitos colaterais dos compostos sintéticos (Clemente Filha, 1996; Capasso *et al.*, 2000). Essa expansão pode ser medida em números. Enquanto o mercado global de medicamentos é estimado em US\$ 280 bilhões, os fitoterápicos situam-se na casa de US\$ 14 bilhões (5%), com percentuais cada vez maiores em relação aos sintéticos (Hoareau & Da Silva, 1999).

Nas diferentes regiões florísticas existentes no Brasil encontra-se grande diversidade de espécies medicinais, das quais, de acordo com estimativas otimistas,

apenas 1% foi quimicamente estudado. Esse percentual decresce ainda mais em relação a estudos agronômicos (Abreu, 1998).

De maneira geral, observa-se uma grande dificuldade no suprimento de plantas com propriedades terapêuticas para o mercado, uma vez que a exploração dos recursos medicinais no Brasil está relacionada em grande parte à coleta extensiva e extrativista, e poucas espécies são cultivadas mesmo em pequena escala (Vieira, 1992).

Hoje as possibilidades de cultivo de espécies medicinais, algumas vezes geneticamente melhoradas, permitem introduzir no mercado espécies ricas em determinadas substâncias ativas. Mas a grande vantagem no cultivo dessas plantas está no desenvolvimento de técnicas que permitam a obtenção de qualidade e homogeneidade do material vegetal, uma vez que as inúmeras espécies medicinais utilizadas nos países ocidentais não têm sido submetidas a rigorosos testes científicos, sendo a sua qualidade variável (Huxtable, 1992a,b; Carlsson, 1990).

O gênero *Hypericum*, pertencente à família Guttiferae, contém mais de 400 espécies, sendo que algumas apresentam potencial medicinal comprovado (Robson, 1987). A espécie mais conhecida é *H. perforatum*, cujos extratos são comercializados na Europa e EUA como antiinflamatórios, em perturbações do aparelho digestivo, asma, etc (Ozturk *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1997; Marques, 1999). Recentemente, inúmeras publicações comprovaram sua ação no Sistema Nervoso Central (Chatterjee *et al.*, 1998; Noldner *et al.*, 1998; Yu, 2000; Barnes, 2001), através da elevação das concentrações de Na⁺, a qual gera inibição da reabsorção de serotonina e, conseqüentemente, ação antidepressiva (Singer *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2001).

Com base nas inúmeras publicações que surgiram nos últimos anos, um crescente comércio em torno dos extratos de *H. perforatum* se desenvolveu no mundo inteiro, em tratamentos para depressão, uma vez que o extrato dessa planta apresenta a vantagem de não apresentar reações adversas, comumente encontradas nos antidepressivos convencionais (Josey & Tackett, 1999; Di Carlo *et al.*, 2001). No exterior, o comércio em torno dessa espécie rendeu cerca de US\$ 70 milhões em 1995. No Brasil, não há estatísticas em relação ao seu consumo, sendo que as primeiras ocorrências foram noticiadas em 1999 (Marques, 1999).

H. perforatum, também conhecida como Erva de São João e Prozac Natural, apresenta um complexo de substâncias químicas tais como hipericina, flavonóides, xantonas e um derivado de acilfloroglucinol, a hiperforina, que tem sido considerado o principal composto do extrato com ação antidepressiva (Wills *et al.*, 2000; Di Carlo *et al.*, 2001).

Estudos sobre a ação farmacológica da hipericina e hiperforina demonstraram que estas substâncias apresentavam ação antidepressiva, antiviral e anticancerígena (Moraleda *et al.*, 1993; Thiede & Walper, 1993; Hwang *et al.*, 2001; Simmen *et al.*, 2001) entretanto, atualmente tem sido demonstrado que a hipericina apresenta propriedades que ocasionam fototoxicidade, ocasionando alergias (Schempp *et al.*, 2002), e a hiperforina potencializa o efeito de outras drogas quando administradas através de formulações de *H. perforatum* (Obach, 2000).

Além das atividades farmacológicas citadas para *H. perforatum*, há relatos de que outras espécies de *Hypericum* apresentam atividade anti-cancerígena (Hu & Sim, 1998; Graham *et al.*, 2000).

H. brasiliense (figura 1) é uma espécie para a qual tem havido crescente interesse no estudo das substâncias bioativas, já que pode ser uma alternativa à *H. perforatum*. De porte herbáceo, bianual esta espécie é encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Cardoso & Oliveira, 1996).

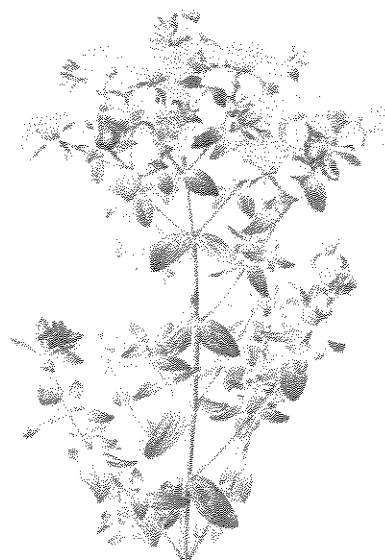


Figura 1. *H. brasiliense*

O seu extrato apresenta xantonas, acilfloroglucinóis e flavonóides (Rocha *et al.*, 1994, 1995, 1996). Ensaio realizado *in vitro* determinaram que o efeito da 1,5 di-hidroxixantona de *H. brasiliense* apresentou resultados semelhantes à hipericina, produzida em *H. perforatum*, na inibição da enzima MAO (monoamina oxidase) A e B (Rocha *et al.*, 1994). Sendo um forte indicador de que o extrato de *H. brasiliense* talvez possa ser utilizado em estudos posteriores sobre a inibição da re-absorção de serotonina, uma vez que a sua constituição química assemelha-se à de *H. perforatum*, com a vantagem de não apresentar hipericina^(*) na sua constituição.

Estudos recentes (Mendes *et al.*, 2000) utilizando camundongos demonstraram que o extrato de *H. brasiliense* apresentava atividade analgésica central.

A ausência de informações sobre as formas de reprodução desta espécie, bem como sobre os fatores que controlam a produção dos diferentes metabólitos secundários, impulsionaram a realização deste trabalho.

(*): Comunicação pessoal de Leandro Rocha

2. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a produção de metabólitos secundários em *H. brasiliense* sob condições de estresse hídrico e de temperatura;
- Estudar a variabilidade genética e propagação *in vitro*;
- Caracterizar a composição química do óleo essencial dessa espécie.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, I.N., 1998. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Tese de mestrado. Universidade Federal de Lavras – Lavras – MG/ Brasil.
- Barnes, J.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D., 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. J. Pharm. Pharmacol. 53 (5): 583-600.
- Capasso, R.; Izzo, A.A.; Pinto, L.; Bifulco, T.; Vitobello, C.; Mascolo, N., 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicine. Fitoterapia 71: S58-S65.
- Cardoso, M.A.; Oliveira, D.E., 1996. Tissue culture of *H. brasiliense* Choise: shoot multiplication and callus induction. Plant Cell Tissue Organ Cult. 44(2):91-94.
- Carlsson, C., 1990. Herbs and Hepatitis. Lancet 336(8722):1068-1068.
- Chatterjee, S.S.; Noldner, M.; Koch, E., 1998. Erdelmeier, C. "Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility". Pharmacopsychiatry 31(1):7-15.
- Clemente Filha, A.C., 1996. Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de *Bauhinia forficata* Link e *Plantago major* L. Dissertação de Mestrado, UFLA, Lavras-MG, Brasil.
- Costa, M.P., 1995. Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de Ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard) obtidas *in vitro* e submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação. Dissertação de Mestrado , UFLA, Lavras-MG, Brasil.
- Di Carlo, G.; Borrelli, F.; Ernst, E.; Izzo, A.A., 2001. St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. Trends Pharmacol. Sci. 22(6): 292-7.

- Graham, J.G.; Quinn, M.L.; Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R., 2000. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. J. Ethnopharm. 73 (3): 347-377.
- Hoareau, L.; Da Silva, E.J., 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. Eletr. J. Biochem. 2(2):56-70.
- Hu, L.H.; Sim, K.Y., 1998. Complex caged polyisoprenylated benzophenone derivatives, sampsoniones A and B, from *Hypericum sampsonii*. Tetrah. Lett. 39 (43): 7999-8002.
- Huxtable, R.J., 1992a. The Myth of beneficent nature - The risks of herbal preparations. Ann. Internal Med. 117(2):165-166.
- Huxtable, R.J., 1992b. The pharmacology of extinction. J. Ethnopharmacol. 37(1):1-11.
- Hwang, M.S.; Yum, Y.N.; Joo, J.H.; Kim, S.; Lee, K.K.; Gee, S.W.; Kang, H.I.; Kim, O.H., 2001. Inhibition of c-erbB-2 expression and activity in human ovarian carcinoma cells by hypericin. Antic. Res. 21 (4A): 2649-2655.
- Josey, E.S. Tackett, R., 1999. St. John's wort: a new alternative for depression? Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 37(3):111-9.
- Marques, L.C., 1999. *Hypericum* e Kava-Kava: Aspectos farmacológicos e terapêuticos. Revista Racine. 51:56-60.
- Mendes, F.R.; Mattei, R.; Carlini, E.A., 2000. Atividade Farmacológica do *Hypericum cordatum* Vell conc. E *Hypericum brasiliense* Choise. Em modelos animais. XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, resumos, p. 259.
- Moraleda, G.; Wu, T.T.; Jilbert, A.R.; Aldrich, C.E.; Condearey, L.D.; Larsen, S.H.; Tang, J.C.; Colacino, J.M.; Mason, W.S., 1993. Inhibition of duck hepatitis-B virus-replication by hypericin. Antivir. Res. 20 (3): 235-247.

- Muller, W.E.; Rolli, M.; Schafer, C.; Hafner, U., 1997. Effects of *Hypericum* extract (LI 60) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30 (suppl):102-7.
- Muller, W.E.; Singer, A.; Wonnemann, M., 2001. The role of sodium conductive pathways for the mechanism of action of hyperforin, a major constituent of St. John's wort. *Biol. Psychiatry*. 49(8):29.
- Noldner, M.; Chatterjee, S.S.; Erdelmeier, C., 1998. Pharmacological studies leading to the identification of hyperforin as a CNS – active component of *Hypericum perforatum*. *Naunyn – Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358(1): 5146.
- Obach, R.S., 2000. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharm. Exp. Ther.* 294 (1):88-95.
- Ozturk, Y.; Aydin, S.; Beis, R.; Baser, K.H.C. e Berberoglu, H., 1996. Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts on the Central Nervous System in mice. *Phytomedicine* 3(2):139-146.
- Robson, N.K.B., 1990. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Bot)*. 20(1):1-151.
- Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M.; Stoeckli-evans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K., 1994. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 36(6):1381-1385.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Evans, H.; Hostettmann, K., 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoid from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40(5):1447-1452.

- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Hostettmann, K., 1996. More Phoroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 42(1):185-188.
- Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P., 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol. Adv.* 18:91-120.
- Schempp, C.M.; Muller, K.A.; Winghofer, B.; Schopf, E.; Simon, J.C., 2002. Saint John's wort in dermatology. *Hautarzt* 53 (5): 316.
- Singer, A.; Wonnemann, M.; Muller, W.E., 1999. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na^{+1} . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290(3):1363-8.
- Simmen, U.; Higelin, J.; Berger-Buter, K.; Schaffner, W.; Lundstrom, K., 2001. Neurochemical studies with St. John's wort *in vitro*. *Pharmacopsychiatry* 34: S137-S142.
- Thiede, H.M.; Walper, A., 1993. Mao-inhibition and comt-inhibition by *Hypericum* extracts and hypericin. *Nervenheilkunde*. 12 (6A): 346-348.
- Vieira, L.S., 1992. *Fitoterapia na Amazônia: manual de plantas medicinais*, 2 ed. São Paulo: Ceres, p. 104-105.
- Wills, R.B.H.; Bone, K.; Morgan, M., 2000. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *Nutr. Res. Rev.* 13(1): 47-77.
- Yu, P.H., 2000. Effect of the *Hypericum perforatum* extract on serotonin turnover in the mouse brain. *Pharmacopsychiatry* 33(2):60-65.

Capítulo 1

**Produção de compostos fenólicos e ácido betulínico em plantas de
Hypericum brasiliense submetidas a estresse hídrico e de
temperatura**

1. INTRODUÇÃO

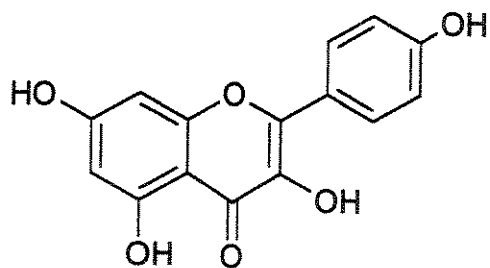
Desde que *H. brasiliense* apresenta composição química semelhante à *H. perforatum*, estudos mais detalhados dos seus metabólitos secundários se tornam interessantes, uma vez que esta espécie pode tornar-se um modelo para o estudo da regulação metabólica de tais substâncias em outras espécies do gênero.

Estudos farmacológicos com substâncias produzidas a partir da via dos fenilpropanóides, ácido chiquímico e do ácido mevalônico foram intensificados nos últimos anos, uma vez que são substâncias muitas vezes encontradas em alimentos e podem contribuir para o tratamento de doenças que ainda não têm cura.

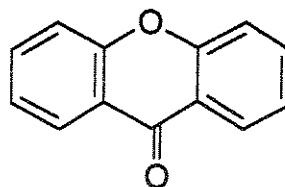
1.1. Substâncias bioativas encontradas em *H. brasiliense*

b) Xantonas

O interesse pelo estudo de xantonas pode ser facilmente explicado pela sua importância na farmacologia e quimiotaxonomia. Sua estrutura química assemelha-se à dos flavonóides (figura 1); entretanto, estes ocorrem freqüentemente na maioria das espécies, enquanto as xantonas ocorrem apenas em oito famílias: Gentianaceae, Guttiferae, Polygalaceae, Leguminosae, Lythraceae, Moraceae, Loganiaceae e Rhamnaceae. A maior freqüência de xantonas, entretanto, está relacionada às famílias Gentianaceae e Guttiferae (Hostettmann & Hostettmann, 1989).



Flavonóide



Xantona

Figura 1. Estrutura básica de flavonóide e xantona.

Diversos são os efeitos farmacológicos e antimicrobianos atribuídos às xantonas. Em ensaios realizados *in vitro* utilizando mitocôndrias de ratos, a 5-hidroxi-1-metoxixantona, 1,5-dihidroxixantona e 6-deoxijacareubina de *H. brasiliense* controlaram a atividade do fungo fitopatogênico *Cladosporium* e inibiram a atividade das enzimas MAO A e B, responsáveis pela indução de depressão em humanos, (Hostettmann & Marston, 1994; Rocha *et al.*, 1994). Xantonas isoladas das espécies *Garcinia mangostana* e *Callophyllum inophyllum* apresentaram atividades bactericida e anti-inflamatória (Sundaram *et al.*, 1983; Mahabusarakam *et al.*, 1986); em outras espécies foram observadas atividades antioxidante, de prevenção contra o câncer, fungicida, antimutagênica, inibidora da transcriptase reversa do HIV-1 e citotoxicidade em células cancerígenas (Guha *et al.*, 1993; Pengsuparp *et al.*, 1995; Edenharder & Tang, 1997; Cortez *et al.*, 1998; Kinghorn *et al.*, 1998; Mahabusarakam *et al.*, 2000).

As xantonas de plantas superiores são formadas a partir de precursores das vias do ácido chiquímico e do acetato (Harborne, 1989). Bennett & Lee (1988) verificaram, a partir da biossíntese de mangostin (uma xantona de *G. mangostana*

L.), que o precursor benzofenona é comum para a formação de todas as xantonas. Assim, para a formação destas, há a participação do ácido cinâmico, ácido benzóico, ácido hidroxibenzóico, ácido malônico e benzofenona (figura 5).

Portanto, para a biossíntese da maioria das xantonas haveria a participação da via dos fenilpropanóides e as diferentes xantonas formadas seriam decorrentes dos diferentes graus de hidroxilações que ocorrem a partir do composto benzofenona (Hostettmann & Hostettmann, 1989). O metabolismo dos compostos fenólicos pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos; no entanto, há poucos trabalhos sobre a regulação do metabolismo das xantonas.

b) Quercetina e Rutina

Dos compostos fenólicos encontrados em fanerógamas, os flavonóides representam a maior classe, tendo mais de 5.000 compostos descritos na literatura. Eles são principalmente classificados em flavonas, flavanóis (catequinas), isoflavonas, flavonóis, flavanonas e antocianinas. Todos são estruturalmente relacionados com o composto de origem, flavona (Yang *et al.*, 2001).

Quercetina e rutina são os principais representantes dos flavonóis e praticamente estão presentes em todas as plantas (Harborne, 1989).

Estruturalmente, a rutina diferencia-se da quercetina por um radical raminosídeo no C-3 (figura 2).

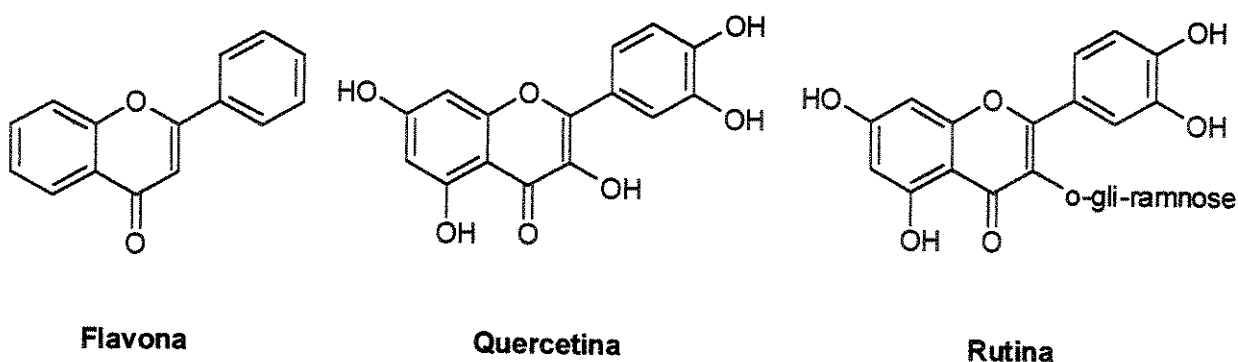


Figura 2. Estrutura da flavona, quercetina e rutina (Harborne, 1989)

Por serem substâncias encontradas em muitos alimentos, as pesquisas sobre os benefícios dos mesmos no metabolismo humano foram intensificadas nos últimos anos (Sugimura, 2000; Yang *et al.*, 2001). Verificou-se, em diversas publicações, que a quercetina apresenta elevada atividade farmacológica, podendo ser utilizada no tratamento de diversas enfermidades, tais como: a) doenças do coração e inibição da enzima Angiotensina II, que é responsável pela hipertrofia das células do músculo do coração (Yoshizumi *et al.*, 2001); b) infecções por papilovírus, devido à ativação das enzimas p53, ocasionando apoptose nas células oncogênicas (Wei *et al.*, 1994; Beniston *et al.*, 2001); c) câncer de próstata, através da inibição do receptor “androgen” envolvido no desenvolvimento e progressão desse tipo de célula (Xing *et al.*, 2001); d) dor, devido às ações sobre o sistema nervoso central (Picq *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2001); e) processos patológicos em geral, devido às propriedades antioxidantes (Morand *et al.*, 1998). Farmacologicamente, a molécula de rutina atua defendendo o organismo contra danos oxidativos (Pérez *et al.*, 2002), prevenção de arteriosclerose (Aviram & Fuhrman, 2002), através da ação vasodilatadora (Pérez-

Viscaíno *et al.*, 2002), além de apresentar elevada capacidade antioxidante, chegando a ser comparada com a vitamina C (Kim *et al.*, 2002).

Apesar de serem substâncias muito bem estudados na área farmacológica, pouco se conhece sobre a regulação metabólica de tais compostos nas plantas.

c) Acilfloroglucinol

Acilfloroglucinóis são compostos fenólicos que podem ser sintetizados a partir da via do ácido chiquímico e átomos adicionais seriam oriundos do acetato; podem ser sintetizados ainda a partir do ácido hidroxibenzóico (Dewick, 1998), (figura 5).

Os acilfloroglucinóis isolados de *H. brasiliense* (figura 3) apresentaram atividade antifúngica e bactericida contra diferentes tipos de microrganismos (Rocha *et al.*, 1996).

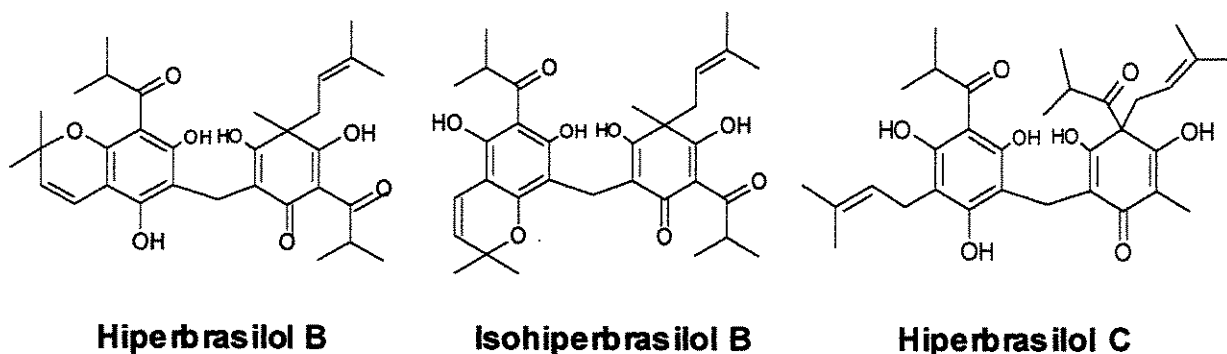


Figura 3. Exemplos de acilfloroglucinóis de *H. brasiliense* (Rocha *et al.*, 1996).

O estudo de substâncias fungicidas e bactericidas é de grande importância, tanto para o controle de microrganismos fitopatogênicos, que causam grandes prejuízos à agricultura, como no controle de micoses e infecções oportunistas que ocorrem comumente em pacientes contaminados pelo vírus da AIDS, em decorrência

das severas medicações tóxicas usadas no tratamento desses pacientes (Hostettman & Marston, 1994).

O interesse no estudo dos derivados de acilfloroglunóis ocorreu devido à descoberta de que o extrato de *H. perforatum* exercia ação antidepressiva pela inibição da re-absorção dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina, dopamina (Muller *et al.*, 1998; Kaehler *et al.*, 1999), glutamato e GABA (Di Carlo *et al.*, 2001), pela ação do derivado de acilfloroglucinol, a hiperforina.

O problema foi a descoberta de que a hiperforina, quando administrada conjuntamente com outras drogas, pode potencializar o efeito de determinados medicamentos, como por exemplo, inibidores de protease, incluindo o inibidor de protease HIV (indinavir), o imunossupressor ciclosporina e contraceptivos orais (James, 2000; Moore *et al.*, 2000; Piscitelli *et al.*, 2000; Wentworth *et al.*, 2000).

Atualmente, as pesquisas estão sendo direcionadas para a descoberta de outros compostos pertencentes à mesma classe, que tenham ação farmacológica, mas que não atuem no citocromo p450 (Varis, 2000).

Não há trabalhos na literatura sobre a regulação de tais substâncias em plantas.

d) Ácido Betulínico

O ácido betulínico (figura 4) é um triterpeno de ocorrência em muitas espécies vegetais, inclusive em *H. brasiliense* (Rocha *et al.*, 1995).

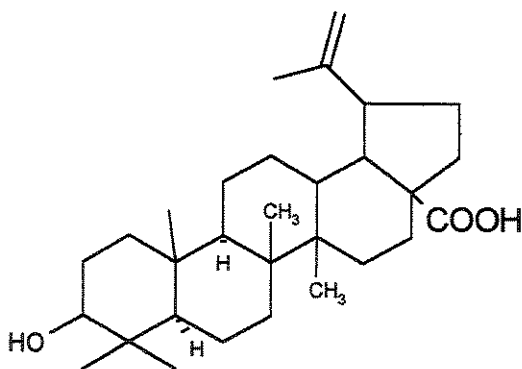


Figura 4. Estrutura do ácido betulínico.

Triterpenos de diversos tipos estruturais são distribuídos em todo o reino vegetal, sendo que algumas plantas apresentam grande quantidade desses compostos na forma de látex, resinas, etc; estes triterpenos tem como principal função fisiológica a defesa contra patógenos e herbívoros. Diversos testes de atividade biológica, desenvolvidos *in vitro*, demonstraram o grande potencial dessa classe de compostos para o controle de patógenos que causam doenças em animais e humanos; entretanto, devido à sua natureza hidrofóbica, a aplicação dessas substâncias como agentes terapêuticos tornou-se limitada (Mahato & Sen, 1997). Atualmente, com o desenvolvimento de técnicas que permitem a solubilização dos triterpenos, as pesquisas intensificaram-se demonstrando o grande potencial terapêutico dessa classe de compostos (Cordel, 2000).

França (1999) relata que há inúmeros metabólitos cujo potencial uso farmacológico justifica um empenho no desenvolvimento de técnicas biotecnológicas de produção, que permitam manipulações bioquímicas e genéticas em culturas para aumentar o rendimento de tais compostos. Um exemplo é o ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico do tipo lupano. Pesquisas desenvolvidas recentemente tem

demonstrado que essa substância e alguns de seus derivados desempenham um papel relevante como potentes inibidores seletivos da replicação do vírus HIV do tipo 1 (De Clercq, 2000; Akihisa *et al.*, 2001) e como agentes bactericidas (Hess *et al.*, 1995; Schuhly *et al.*, 1999). Essa substância está sendo atualmente utilizada em ensaios pré-clínicos para o tratamento e prevenção de melanomas malignos, através da indução de apoptose em células p53 (Thatte *et al.*, 2000; Haridas *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002).

No entanto, até o momento não há referências sobre fatores que podem contribuir para maximizar a produção dessa substância em espécies vegetais.

O interesse na exploração racional desta espécie se baseia no fato de que uma vez otimizadas as condições de cultivo, que permitam obter a produção dos diferentes metabólitos secundários em quantidades significativas, será possível a extração de tais compostos em escala comercial.

1.2. Metabolismo dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de diferentes rotas e constituem um grupo heterogêneo do ponto de vista metabólico. Muitas classes de compostos fenólicos são derivados da fenilalanina e através da fenilalanina amônia liase (PAL), enzima chave do metabolismo secundário, ocorre a catálise deste aminoácido para ácido trans-cinâmico, pela eliminação de amônia (Razal *et al.*, 1996; Towers *et al.*, 1997). O ácido trans-cinâmico é um fenilpropano e a partir deste composto são formados outros compostos mais complexos, como as xantonas, quercetinas, acilfloroglucinóis e antocianinas (figura 5).

Muitas plantas superiores respondem a vários estímulos ambientais através da ativação da produção de metabólitos secundários, principalmente através do

metabolismo dos compostos fenólicos. A produção desses compostos é controlada por diversos fatores internos e externos como hormônios, luz, nutrientes, água, etc (Harborne, 1983; Dixon & Paiva, 1995; Dey & Harborne, 1997; Weidner *et al.*, 2000). Portanto, a partir de modificações das condições ambientais é possível estimular a síntese de diversos compostos como antocianinas, flavonóides, fenóis, taninos, etc.

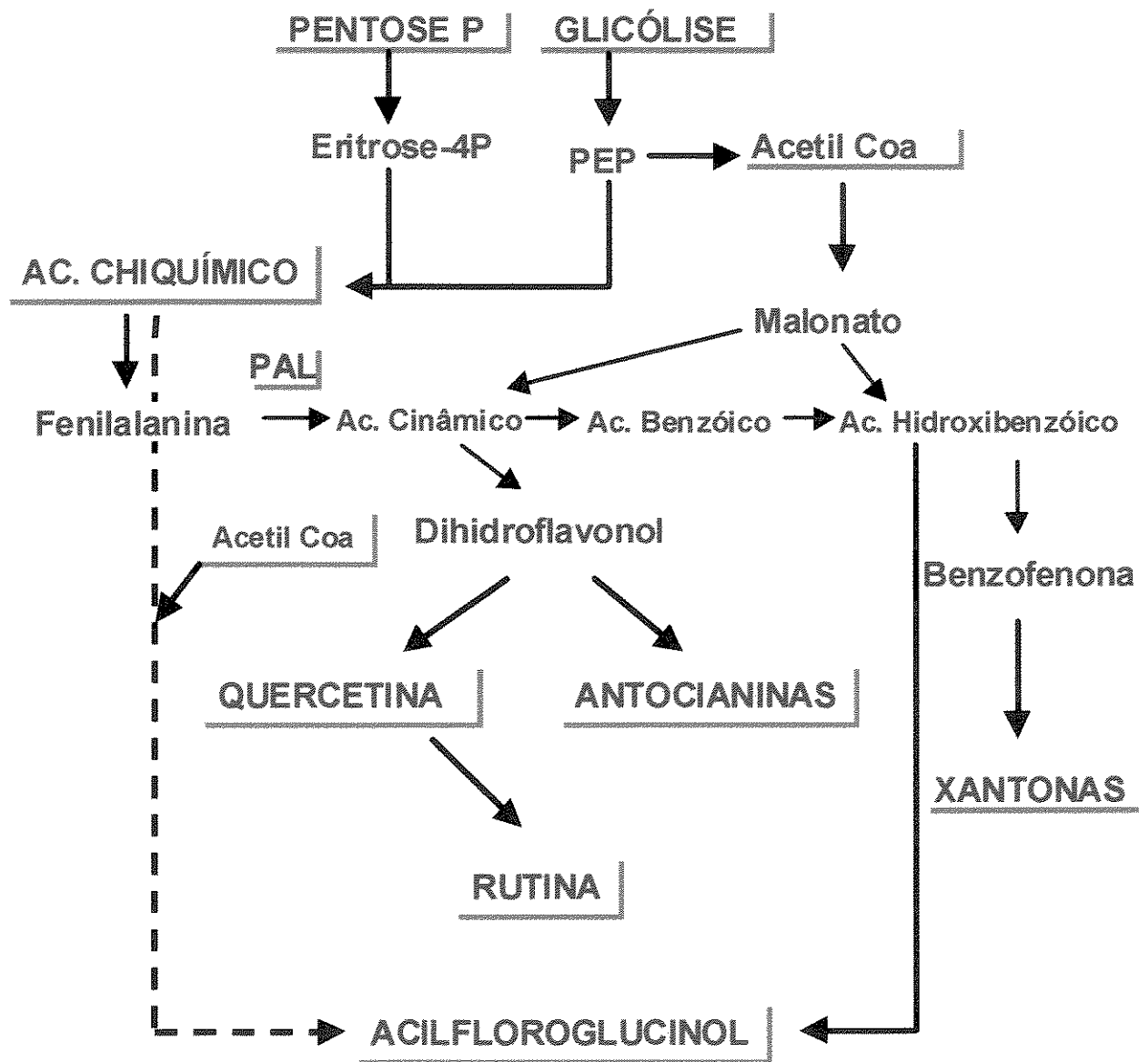


Figura 5. Biossíntese de xantona, acilfloroglucinol, quercetina, rutina e antocianinas (Adaptado de Torssel, 1997; Harborne, 1989; Bennett & Lee, 1988).

Já foi verificado que alguns compostos fenólicos, de importância farmacológica como a hipericina e xantona produzidos em espécies de *Hypericum* e *Centaureum*, responderam positivamente a diferentes condições de estresse. A biossíntese de hipericina aumentou em resposta ao jasmonato, deficiência de nitrogênio, qualidade da luz e eliciadores bióticos. A biossíntese de xantonas aumentou em resposta à presença de metiljasmonato e eliciadores bióticos (Beerhues & Berger, 1995; Briskin *et al.*, 2000; Briskin *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2002).

Por isso, nos últimos anos, houve um crescente interesse pela fisiologia do estresse, para se saber o efeito deste no metabolismo das plantas e desta forma verificar as possíveis adaptações que poderiam ocorrer no metabolismo secundário, uma vez que poderiam maximizar a produção de constituintes ativos de plantas medicinais e condimentares (Gershenzon, 1983; Dixon & Paiva, 1995).

1.3. Metabolismo dos Triterpenos

Os terpenos constituem uma grande classe de metabólitos secundários, que além de desempenharem funções fisiológicas nas plantas, apresentam importante papel na farmacologia atual.

Todos os terpenos são formados a partir de unidades de isopreno (5C) e a classificação ocorre em função do número de isoprenos que a molécula contém (Taiz & Zeiger, 1998).

A síntese dos isoprenos tem sido convencionalmente proposta como sendo a partir da via do ácido mevalônico, no citosol, através do Acetil CoA e isopentenil pirofosfato (IPP). Entretanto, recentemente foi proposta uma nova via biossintética

para a formação do isopreno, a qual ocorre a partir de 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, produzido a partir do ciclo de Calvin (figura 6), nos cloroplastos (Lichtenthaler, 1999).

Os esteróides (triterpenos), sesquiterpenos e ubiquinonas são sintetizados no citosol, a partir da via do ácido mevalônico. Entretanto, os fitohormônios (ácido abscísico, giberelinas e citocininas), carotenóides e monoterpenos são sintetizados através da via cloroplastídica (figura 7) (Lichtenthaler *et al.*, 1997).

O IPP (isopentenil pirofosfato) é um precursor comum para todos os isoprenóides de ambas as vias. A IPP isomerase catalisa a conversão do IPP para dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para formar a unidade básica de isopreno. Em plantas, os derivados do isopreno atuam na proteção e adaptação a condições de estresse (Nakamura *et al.*, 2001). Por exemplo, a 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase, uma enzima chave da via do mevalonato, foi induzida por patógenos (Choi *et al.*, 1992). Para proteger o sistema fotossintético da elevada intensidade luminosa, a quantidade e composição de carotenóides aumenta substancialmente para proteger o cloroplasto contra formas reativas de oxigênio molecular (Demmig-Adams & Adams, 1996).

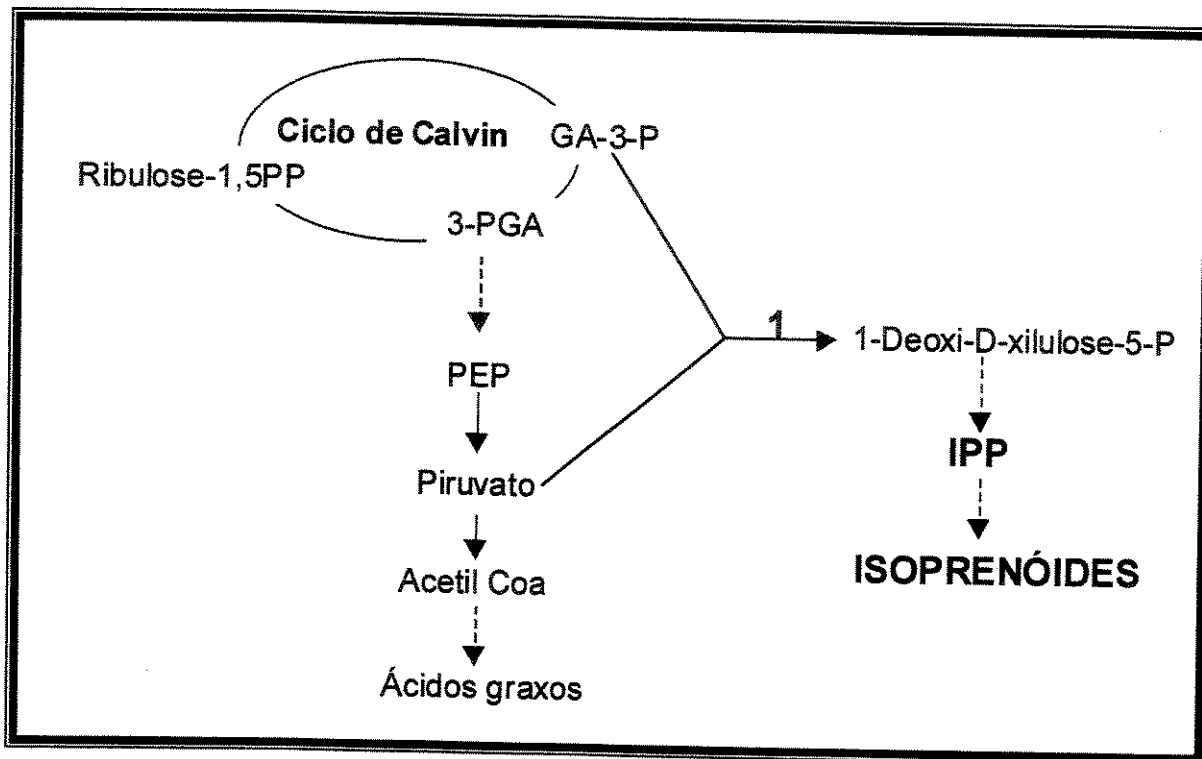


Figura 6. Esquema biossintético da formação de 1-deoxi-D-xilulose-5P, a partir do Ciclo de Calvin. Reação mediada pela 1-deoxi-D-xilulose-5P-sintase (1), (Lichtenthaler, 1999).

O acúmulo de ácido abscísico (ABA) também aumenta em resposta aos estresses hídrico, térmico e salino (Yamagushi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). Nakamura *et al.* (2001) verificou que diferentes formas da IPP isomerase respondem diferentemente a condições de estresse salino e térmico, demonstrando que ainda são necessários mais estudos sobre a regulação dessa via metabólica.

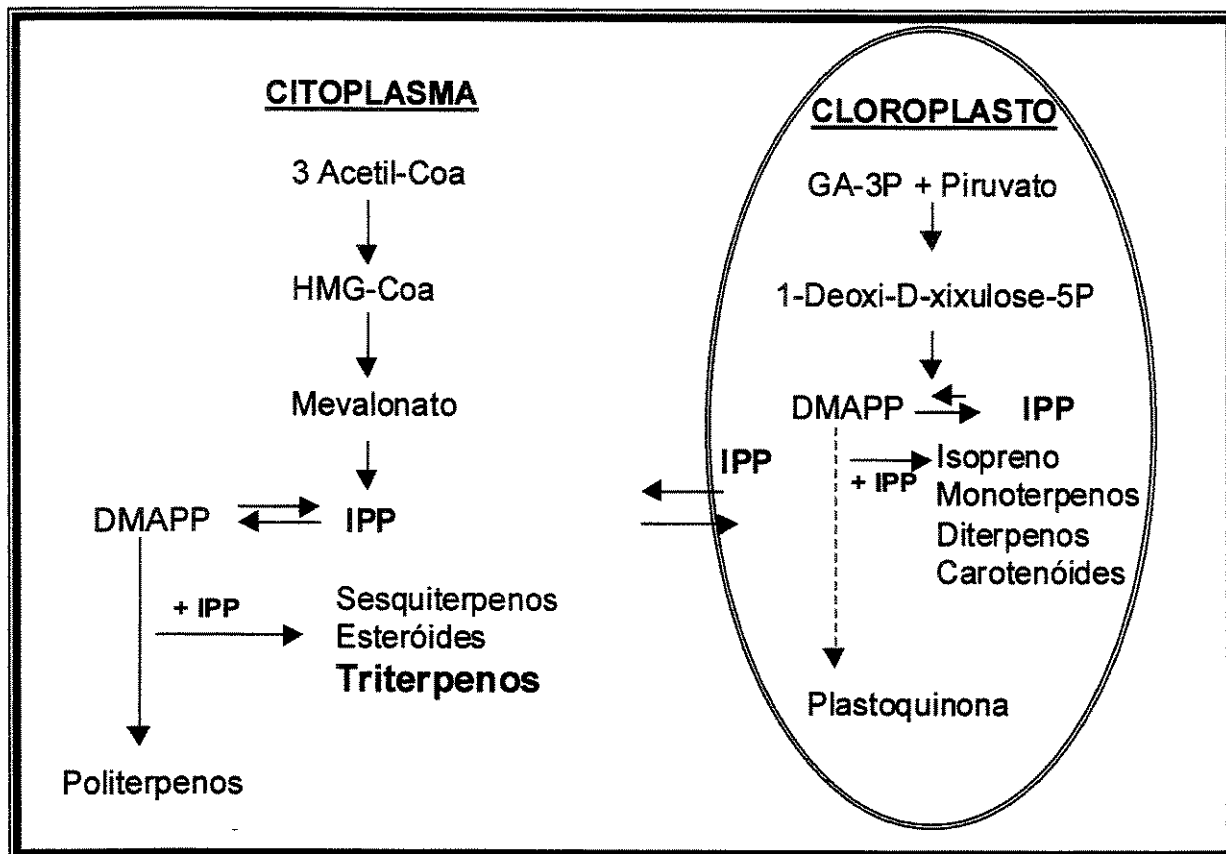


Figura 7. Compartimentalização da biossíntese do isopreno (Lichtenthaler, 1999).

1.4. Metabolismo sob condições de estresse

Entende-se por metabolismo o conjunto de reações bioquímicas, em diferentes organelas, anabólicas e catabólicas, cujo objetivo é o suprimento de compostos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Sabe-se que diversos compostos com funções essenciais às plantas são sintetizados a partir do metabolismo secundário, tais como: os hormônios vegetais (giberelinas, ácido abscísico e brassinosteróides), sintetizados a partir da via do ácido mevalônico; os aminoácidos fenilalanina e tirosina, sintetizados a partir da via

do ácido chiquímico; alguns flavonóides que possuem função no transporte polar de auxinas (Taiz & Zeiger, 1998); os alcalóides, com função de transporte ou armazenamento de nitrogênio quando em condições de grande disponibilidade do elemento na planta (Kutchan, 1995); além de vários outros exemplos.

Assim, em condições naturais, as plantas mantêm os metabolismos primário e secundário integrados, onde a maior parte do carbono fotoassimilado vai para a manutenção do metabolismo primário e uma parte menor para o secundário, uma vez que os metabólitos secundários, na maioria das vezes, são sintetizados em menor proporção (Hagerman, 1987).

Freqüentemente, as plantas se encontram em condições de estresse, condições externas que são adversas ao seu crescimento. Estresses podem ser de origem biótica (imposto por outros organismos) ou abiótica (interferência do ambiente físico ou químico). As condições ambientais que normalmente causam danos são: excesso ou falta de água, temperaturas baixas ou elevadas, salinidade, suprimento inadequado de nutrientes no solo, muita ou pouca luz, etc (Hale & Orcutt, 1987).

Diante do estresse, uma planta pode sobreviver e continuar a crescer, mesmo que lentamente, ou pode morrer. A resistência ou susceptibilidade de uma planta depende da espécie, genótipo e estágio de desenvolvimento da planta (Buchanan *et al.*, 2000).

Sob condições de estresse, as plantas podem se adaptar através de genótipos evolutivos caracterizando um mecanismo de resistência/tolerância. Outro mecanismo de resistência é a aclimação, que é o ajuste temporário do metabolismo da planta em resposta a mudanças ambientais. Durante a aclimação, o metabolismo das plantas é alterado para produzir compostos que permitam a sua sobrevivência durante a condição adversa (Hallgren & Oquist, 1990).

1.4.1. Estresse hídrico

A água é um fator extremamente limitante para a sobrevivência das plantas (Fitter & Hay, 1981; Urchei, 1992). Entretanto, o excesso de água também pode ser um problema à sobrevivência das plantas. Sob condições de anoxia ou hipoxia, as plantas tem o suprimento de oxigênio limitado, dificultando a realização dos processos metabólicos, uma vez que o oxigênio é oceptor final da fosforilação oxidativa da cadeia de transporte de elétrons. Assim, mudanças metabólicas são requeridas para a condição de baixa disponibilidade de oxigênio, uma vez que ocorrem alterações no pH citosólico e acúmulo de substâncias, como lactato e etanol que podem ser prejudiciais à sobrevivência da célula (Buchanan *et al.*, 2000; Souza, 2001).

Por outro lado, plantas sob baixa disponibilidade de água, adaptam-se alterando a concentração de diferentes metabólitos: a concentração de clorofila tende a diminuir; os teores de prolina aumentam proporcionalmente ao aumento dos níveis de ácido abscísico, decorrente do fechamento estomático; ocorre aumento do conteúdo de ACC, ocasionando a senescência das plantas (El – Ikil *et al.*, 2002). Já foi verificado, também, que os genes da sub-unidade menor da Rubisco são regulados por vários fatores externos, como estresse hídrico e salino, levando ao comprometimento no desenvolvimento das plantas, por alterações nas taxas fotossintéticas (He *et al.*, 2002).

O comprometimento do desempenho metabólico pode ocasionar o redirecionamento de substratos para a produção de compostos do metabolismo secundário, acarretando estabilização no crescimento vegetal. Herms & Mattson (1992) relatam que há relação inversa entre crescimento e otimização na síntese de compostos do metabolismo secundário, uma vez que em condições adversas a

planta se aclimatária à nova condição, produzindo compostos para armazenar carbono, resultando na paralisação do crescimento.

A síntese de muitos fenilpropanóides sofre interferências devido ao estresse hídrico: os derivados do ácido cinâmico e ácido benzóico de *Triticum aestivum* declinaram consideravelmente em resposta ao estresse hídrico; já em *Helianthus annuus* e *Cucumis sativus* as mesmas substâncias aumentam, respectivamente, em resposta ao mesmo tipo de estresse (Gershenzon, 1983).

Estrada (1999) relatou que em plântulas de tomate sob intenso déficit hídrico, a produção de fenóis solúveis declina; em compensação, ocorre aumento na produção de fenilpropanóides. A produção de taninos em plântulas de tomate submetidos à condição de déficit hídrico, diminui em função do declínio do potencial hídrico, o mesmo ocorrendo em baixas concentrações de CO₂, uma vez que o baixo suprimento de água dificulta ou paralisa os processos iniciais da fotossíntese (Bialczyk & Lechowski, 1999). Entretanto, Wakabayashi *et al.* (1997) verificaram que apesar da atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e tirosina amônia liase decaírem substancialmente sob condições de baixa disponibilidade hídrica, a produção de ácidos fenólicos aumentou.

1.4.2. Estresse de temperatura

Extremos de temperatura geralmente resultam na inibição dos processos fotossintéticos, alteração das funções celulares e mudanças no metabolismo celular, incluindo alterações físicas das membranas celulares, interrupção da mobilidade protoplasmática, descontrole do movimento de eletrólitos através das membranas celulares e alteração da atividade respiratória e em condições extremas, pode ocorrer a morte da planta (Oliveira, 2000).

Sob baixa temperatura pode haver comprometimento da estrutura e função das enzimas transportadoras da membrana plasmática, mudanças na composição de lipídeos, decréscimo na transpiração e na condutividade hidráulica das raízes, etc (Running & Read, 1980; Whitehead & Jarvis, 1981; Kramer & Boyer, 1983).

Em condições de temperatura elevada plantas sensíveis tem o metabolismo fotossintético e de açúcares comprometidos, uma vez que ocorre redução na atividade carboxilase da Rubisco e sacarose fosfato sintase (SPS); conteúdo de clorofila e atividade no fotossistema II em cloroplastos também são afetados; ocorre redução no conteúdo de amido e proteínas nas folhas, enquanto o de aminoácidos aumenta (Criddle & Hansen, 1991; Lafta & Lorenzen, 1995; Chaitanya *et al.*, 2001).

Com relação ao metabolismo secundário, alguns trabalhos demonstram que algumas vias tornam-se mais ativas sob condições de estresse de temperatura, demonstrando que alguns compostos podem ser sintetizados como forma de proteção, ou de redirecionamento do fluxo de carbono (uma vez que os processos de respiração ficam comprometidos). Uma possível função dos compostos fenólicos solúveis na aclimação de plantas em baixas temperaturas é discutido por Solecka *et al.* (1999), que verificou que plantas de *Brassica napus* crescidas a 2°C e aclimatadas a -5°C, apresentaram aumento no conteúdo de ácidos fenólicos solúveis (ácidos caféico, cumárico, ferúlico e sináptico) e antocianinas, quando comparadas com plantas que não sofreram aclimação. Também foi verificado aumento na atividade da PAL durante o período de aclimação, demonstrando que o metabolismo dos fenilpropanóides poderia ter uma importante função no desenvolvimento de resistência para baixas temperaturas (Solecka & Kacperska, 1995).

Plantas de *Mahonia repens*, quando em baixas temperaturas, apresentam aumento do fluxo de carbono para as via dos fenilpropanóides e flavonóides (Grace *et al.*, 1998). Leyva (1995) verificou que plantas de *Arabidopsis thaliana*, expostas à baixas temperaturas, acumulavam RNAm de PAL e CHS (Chalcona sintase), seguido do acúmulo de antocianinas.

Existem alguns parâmetros que podem ser utilizados como marcadores para detectar se uma planta entrou em estresse:

a) Antocianinas

As antocianinas estão presentes nos vacúolos das células do mesófilo, dos tecidos de folhas jovens de plantas tropicais, folhas no período do outono e em folhas de plantas submetidas a condições de estresse (Haslam, 1983).

Normalmente, o conteúdo de antocianinas aumenta em resposta aos diferentes estresses ao qual as plantas são submetidas. As vantagens adaptativas, especialmente em tecidos não reprodutivos, ainda não estão muito claras. Geralmente as antocianinas são sintetizadas num estágio de desenvolvimento específico e podem ser induzidas em resposta a diversos fatores ambientais, como radiação UV, baixas temperaturas e estresse hídrico. Então, a síntese e localização das antocianinas em diferentes órgãos e tecidos poderia ser uma forma de resistência da planta aos diferentes estresses ambientais (Chalker – Scott, 1999).

Hoch *et al.* (2001) relata que espécies com risco de senescência foliar, devido às condições fotoinibitórias, durante o outono, utilizam as antocianinas para proteger o aparelho fotossintético. Quando a senescência ocorre ao mesmo tempo que estresses ambientais, particularmente baixas temperaturas, a fotoinibição severa pode resultar na redução da disponibilidade de nutrientes nas folhas, afetando o

“status” da planta. Portanto, plantas decíduas produzem antocianinas durante o outono, como estratégia ecológica e fisiológica de fotoproteção durante os períodos críticos.

Em plantas de milho, sob baixas temperaturas, ocorre aumento no conteúdo de antocianinas e abundância na transcrição de genes de produtos funcionais da via dos fenilpropanóides, como PAL, CS, 4-coumarato:CoA ligase e chalcona isomerase. Isto evidencia que os genes dos componentes da via biossintética que irá sintetizar as antocianinas respondem positivamente a baixas temperaturas ou às conseqüências dessa mudança ambiental, demonstrando que é um excelente composto para caracterizar as respostas moleculares das plantas a baixas temperaturas (Christie *et al.*, 1994).

b) Fluorescência da clorofila

Condições de estresse afetam a fotossíntese; assim, o emprego de técnicas que permitam a detecção de alterações nestes processos são válidas para a identificação do “status” metabólico da planta, permitindo inferir se estas entraram ou não em estresse (Oliveira, 2000).

Após a excitação da molécula de clorofilas *a*, estas emitem fluorescência no vermelho, o que pode ser registrado em função do tempo de emissão (Taiz & Zeiger, 1998). Qualquer amostra de tecido fotossintético após um período de adaptação no escuro, apresenta mudanças características na intensidade da fluorescência da clorofila *a*, quando iluminada com luz contínua. Tais mudanças são sinais qualitativos de certas etapas da fase fotoquímica, que iniciam com a captação da energia luminosa pelo complexo antena, se desenvolvem com o transporte de elétrons, pelos diversos trocadores de elétrons, até culminarem no centro de reação do PSII, com o

evento fotoquímico mediado por uma molécula de clorofila *a*, a P_{680} . Alterações no rendimento da fluorescência refletem, indiretamente, as modificações que estariam ocorrendo no metabolismo fotossintético (Oliveira, 2000).

c) Peroxidação lipídica

Em algumas espécies, estresse hídrico e de temperatura induzem estresse oxidativo, resultando na produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxílicos ($OH^\cdot$), (Bowler *et al.*, 1992; Foyer *et al.*, 1994; Inze & Van Montagu, 1995). Estas espécies reativas de oxigênio, produzidas durante o estresse, podem danificar muitos componentes celulares como lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Monk *et al.*, 1989).

As plantas tem um elaborado sistema enzimático para eliminar espécies reativas de oxigênio. Por exemplo, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do O_2^- para H_2O_2 e malondialdeído (MDA), molécula que pode ser quebrada pela catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (AP) (Jiang & Huang, 2001). Entretanto, o funcionamento dessas reações pode ser interrompido diante de condições adversas, como estresse hídrico e de temperatura, podendo resultar em aumentos da peroxidação lipídica e conseqüentes danos à integridade das membranas (Chowdhury & Choudhuri, 1985), podendo ocasionar a morte celular (Zykova *et al.*, 2002).

Portanto, mudanças na concentração de MDA podem ser indicadoras da integridade estrutural das membranas de plantas submetidas a diferentes condições de estresse (Purvis & Shewfelt, 1993).

2. OBJETIVOS

- Isolar xantonas e outras substâncias que possam ser encontradas majoritariamente no extrato diclorometânico de *H. brasiliense*;
- Caracterizar a produção de compostos fenólicos e ácido betulínico nos diferentes estádios de desenvolvimento de plantas de *H. brasiliense*.
- Quantificar e estudar a regulação de compostos fenólicos e ácido betulínico em plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico e térmico;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fitoquímica

3.1.1. Material vegetal

Plantas de *H. brasiliense* cultivadas no campo experimental do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), as quais eram oriundas de sementes coletadas na cidade de Ibiúna – SP, foram utilizadas nesta etapa do trabalho.

Uma excisata da espécie coletada foi enviada para o Instituto de Botânica do Estado de São Paulo para identificação e comprovação de que o material em estudo era realmente *H. brasiliense*, onde obteve o código SP 337800.

3.1.2. Extração

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no laboratório de química orgânica do Instituto de Química – Unicamp, sob orientação da Dra. Anita J. Marsaioli.

Raízes frescas (500 g) de plantas de *H. brasiliense*, em diferentes estádios de desenvolvimento, foram coletadas no CPQBA, lavadas e, após retirada do excesso de umidade com papel estas foram trituradas.

O material vegetal (triturado) foi submetido à extração exaustiva em éter de petróleo, para uma limpeza prévia do material e, posteriormente, o material foi submetido à extração em diclorometano. A extração em ambos os solventes foi realizada sob agitação (em shaker), por 5 dias. O extrato diclorometânico, quando seco em rotoevaporador a 45°C, obteve um rendimento de 2 g. O extrato obtido a partir de éter de petróleo foi descartado.

3.1.3. Fracionamento

O fracionamento foi realizado a partir do extrato diclorometânico, o qual tem sido considerado o melhor extrator de xantonas. Como os trabalhos anteriores com *H. brasiliense* demonstraram que esta espécie continha xantonas com atividade anti-depressiva, o fracionamento foi iniciado com o intuito de isolar xantonas.

Todas as etapas do fracionamento e purificação das substâncias podem ser visualizadas na figura 8.

2g do extrato diclorometânico de raízes frescas de *H. brasiliense* (HBFDR) foram aplicados em coluna (18 x 6 cm) contendo sílica G “flash”, seguindo o método descrito por Still *et al.* (1978). A eluição das substâncias iniciou – se com diclorometano (100 %) e a polaridade foi aumentada gradativamente (a cada 10 % até chegar em 100 %) com a adição de metanol.

As frações foram coletadas em volume de 5 mL e alíquotas destas foram aplicadas em placas cromatográficas de sílica (G 60 F254 – Merck), sendo a cromatografia desenvolvida com hexano : acetato de etila (8:2, v/v). A visualização das corridas cromatográficas foi realizada em UV a 254 e 366 nm e com anisaldeído (etanol: ácido sulfúrico: ácido acético: anisaldeído – 90: 5: 1: 5, v/v/v/v). Por semelhança do perfil cromatográfico, as frações foram agrupadas em 13 frações.

A fração 6 (100 mg) foi submetida à cromatografia de camada delgada, em placa cromatográfica de sílica “preparativa”, usando-se hexano e acetato de etila (80:20 v/v) como fase móvel. Foram visualizadas 6 manchas a 254 nm, as quais foram separadas e identificadas como 6.1 a 6.6. A fração 6.3 (27 mg), que era majoritária, quando aplicada em placa cromatográfica, apresentou mais de uma mancha quando visualizada no UV, e então esta foi novamente aplicada em placa de sílica “preparativa”, utilizando-se mistura de hexano, diclorometano e acetato de etila

na proporção 70: 20: 10 (v/v/v). Dessa corrida cromatográfica foram separadas 4 frações, denominadas de 6.3.1 a 6.3.4, sendo que a fração 6.3.2. (10 mg) foi purificada e denominada HB67/96F3.2.

A fração 8 (797 mg) foi solubilizada em clorofórmio e uma fração insolúvel foi separada (100 mg), sendo denominada HBF8RES. A fração solúvel foi aplicada em coluna (18 x 3 cm) contendo sílica G "flash", a qual foi equilibrada com diclorometano (100 %). A polaridade foi aumentada gradativamente (a cada 10 %) até chegar em 100 % de metanol. Foram coletadas frações de 5 mL, as quais foram posteriormente agrupadas pela semelhança do perfil cromatográfico em 8 frações (8.1 a 8.8). A fração 8.4 foi lavada com hexano e uma fração insolúvel foi isolada e identificada como HBF8.4.

3.1.4. Identificação das substâncias isoladas

Com exceção da fração HBF8.4, que não foi obtida em quantidade suficiente para ser analisada por RMN de C^{13} , Dept (90 e 135°) e IV, todos os compostos isolados foram analisados por espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (INOVA – 500 mhz) (RMNH¹, C^{13}), Dept 90 e 135° (intensificação do sinal sem distorção por transferência polarizada), ressonância bidimensional (HSQC e Cosy), infra vermelho (IV) e ultravioleta (UV).

Os espectros de infravermelho foram obtidos a partir do espectrômetro FT-IR Perkin Elmer 298.

Os espectro de RMNH¹ foram obtidos nos espectrômetros Varian INOVA 500, operando a 500 mhz, ou Bruker AC 300AP, operando a 300 mhz, utilizando

clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou acetona deuterada (acetona-d_6) como solvente e tendo Me_4Si (TMS) como padrão interno.

Os espectros de RMN de C^{13} foram obtidos com o espectrômetro Varian INOVA 500, utilizando CDCl_3 como solvente e Me_4Si (TMS) como padrão interno. A discriminação dos carbonos ligados a 1H, 2H e 3H foi realizada através da obtenção dos espectros de Dept a 90° e 135° . E a RMN bidimensional, realizada entre H,H (Cosy) e H,C (HSQC), foi realizada no espectrômetro Varian INOVA 500 a 500 mhz.

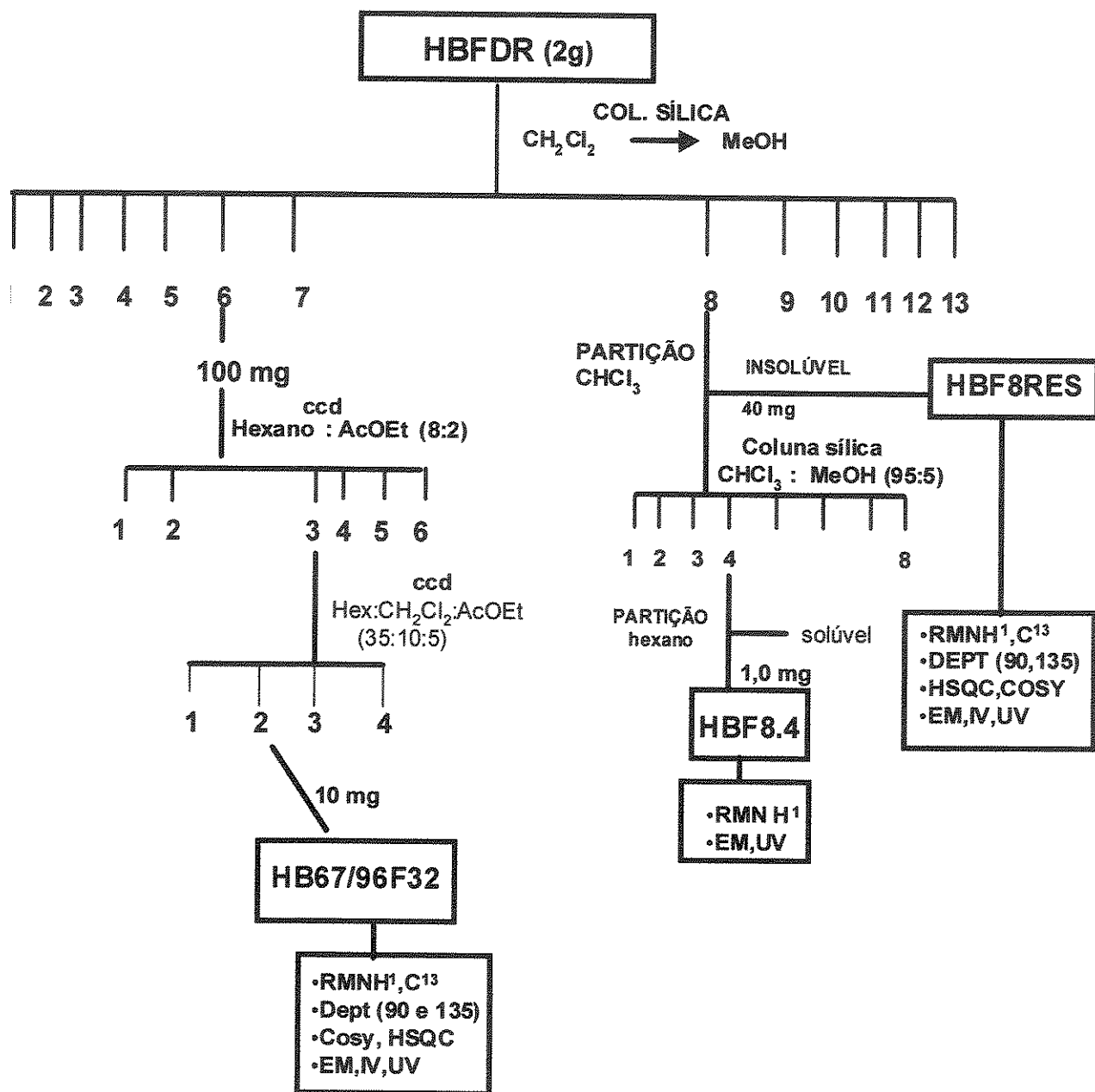
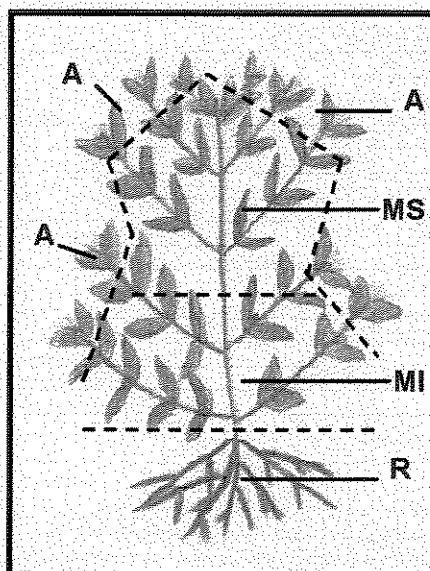


Figura 8. Resumo da etapa fitoquímica do extrato diclorometânico de *H. brasiliense*.

3.2. Caracterização da produção de diferentes metabólitos secundários nos diferentes estádios de desenvolvimento

Para este experimento foram utilizadas plantas com aproximadamente 15 cm de altura (oriundas de sementes), as quais foram transferidas para vasos com capacidade para 5 litros de substrato e permaneceram em casa de vegetação, com irrigação diária. O experimento consistiu de 3 estádios de desenvolvimento (vegetativo, florescimento e frutificação) e 4 partes da planta: apical (A), mediana superior (MS), mediana inferior (MI) e raiz (R). As diferentes partes coletadas podem ser visualizadas no esquema 1.

O tratamento onde as plantas eram mantidas no estágio vegetativo foi encerrado quando as plantas tinham 4 meses e apresentavam em torno de 30 cm de altura, o de florescimento aos 5 meses e o de frutificação, aos 6 meses. Após a coleta das diferentes partes das plantas, foi determinada a massa fresca e o material foi submetido à extração exaustiva em éter de petróleo e metanol.



Esquema 1. Diferentes partes da planta de *H. brasiliense*.

3.3. Estresse de temperatura

O trabalho foi desenvolvido no Departamento de Fisiologia Vegetal em fevereiro de 2000, cuja temperatura média na época na casa de vegetação era de 30°C durante o dia e 19°C durante a noite.

Plantas com dois meses (15 cm), formadas a partir de sementes, foram utilizadas no experimento. As plantas foram submetidas a diferentes regimes de temperatura e duas intensidades luminosas: controle (temperatura ambiente), temperatura ambiente durante o dia e 10°C à noite (TA10N); temperatura ambiente durante o dia e 30°C à noite (TA30N); 17°C durante o dia e noite (17 DN); 25°C dia e noite (25 DN) e 36°C dia e noite (36 DN).

Plantas mantidas a 17, 25 e 36°C, permaneceram durante o dia e noite em câmaras do tipo Fitotron, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro e com radiação fotossinteticamente ativa variando de 20 a 30 moles de fótons/cm².s. As plantas mantidas em temperatura noturna de 10 e 30°C permaneceram em casa de vegetação durante o dia (recebendo a iluminação do dia até aproximadamente 17:00) e à noite foram transferidas para incubadora do tipo BOD, cujas temperaturas foram ajustadas para 10 e 30°C. A irrigação, tanto para as plantas controle como as dos demais tratamentos, foi diária.

Após quinze dias da instalação do experimento foram realizadas as seguintes determinações na parte aérea:

- Eficiência quântica do fotossistema II (PSII);
- Massa fresca (g);
- Determinação dos teores de prolina
- Quantificação e caracterização das antocianinas;

- Quantificação e caracterização das antocianinas;
- Quantificação de fenóis totais;
- Determinação da peroxidação lipídica de membranas;
- Extração da parte aérea de 3 plantas em metanol, durante cinco dias, sob agitação;
- Quantificação nos extratos metanólicos, dos compostos isolados na etapa fitoquímica.

Cada tratamento foi composto por 3 repetições e os dados coletados foram analisados através de análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (5 %).

3.4. Estresse hídrico

O experimento foi desenvolvido no Departamento de Fisiologia Vegetal – IB - Unicamp, em junho de 2000.

Foram utilizadas no experimento, plantas com três meses (25 cm), crescidas em vasos com capacidade para 700 mL (contendo terra e areia, na proporção 2:1), as quais foram submetidas a hipoxia (hipoxia) e déficit hídrico.

O regime de irrigação para as plantas mantidas no tratamento controle foi diário.

Para manter a hipoxia, os vasos foram regados em excesso e posteriormente colocados dentro de outros recipientes maiores contendo água até quase a borda.

Para a indução do déficit hídrico, optou-se em fazer uma retirada gradativa da água de irrigação. No primeiro dia de instalação do experimento os vasos foram saturados e pesados. Posteriormente, foram realizadas pesagens diárias dos vasos

e metade da massa perdida era repostada por água (em mL). Após quinze dias, as plantas começaram a entrar em estado de murcha e o experimento foi encerrado.

Em todos os tratamentos foram utilizadas 3 repetições, num delineamento inteiramente casualizado. Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas através do teste Tukey (5 %).

Após o encerramento do experimento, 3 plantas de cada tratamento foram separadas em parte aérea e raiz e submetidas a extração exaustiva em éter de petróleo, diclorometano e metanol. O material vegetal foi mantido em cada solvente por 5 dias, sob agitação.

Nos três tratamentos foram realizadas as seguintes avaliações:

- Determinação do potencial hídrico;
- Massa fresca (g) da parte aérea e raiz;
- Determinação dos teores de prolina, antocianinas e fenóis totais;
- Determinação da peroxidação lipídica das membranas;
- Quantificação das substâncias isoladas na etapa fitoquímica, nos extratos em diclorometano, éter de petróleo e metanol da parte aérea e raiz.

3.5. Análises Bioquímicas

3.5.1. Determinação da eficiência quântica do PSII

A fotossíntese foi avaliada através da determinação da fluorescência da clorofila dentro de condições de luz não saturada, utilizando um “analisador da produção fotossintética – MINI-PAN” (Heinz Walz GmbH). As medições dos parâmetros de produção foram realizadas em folhas completamente expandidas e

sob iluminação solar. Este parâmetro determinou a eficiência quântica da conversão da energia fotoquímica em fotossíntese, conhecida como parâmetro Genty (Genty *et al.*, 1989).

3.5.2. Determinação do potencial hídrico

As determinações do potencial hídrico (ψ) foram realizadas quando as plantas mantidas no tratamento sob déficit hídrico, apresentaram sinal de murcha. Então, as determinações foram realizadas em todos os tratamentos e o experimento encerrado.

Os primeiros cinco nós (contados do ápice para a base) de cada planta foram cortados, com o auxílio de uma lâmina, e colocados em uma bomba de pressão - “Bomba de Scholander” para ser determinado o potencial hídrico (bars).

3.5.3. Preparo do extrato em MCW

As determinações bioquímicas seguiram a mesma metodologia para os dois experimentos. Foram utilizados aproximadamente 5 g de material vegetal para serem extraídos em 5 mL de metanol – clorofórmio – água (12:5:3, v/v/v).

O material permaneceu intacto dentro da solução, a 4°C, com agitação ocasional, por aproximadamente uma semana (tempo suficiente para retirada total da clorofila). Após, a solução ser retirada da amostra, foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio e 7,5 mL de água destilada sob agitação contínua. O extrato apresentou duas frações, uma clorofórmica e outra contendo metanol – água. A fração contendo metanol – água foi retirada e seca em Speed Vac (Savant). Após secagem, a fração foi solubilizada em água e utilizada nas diferentes análises.

3.5.4. Quantificação e identificação das antocianinas

As dosagens de antocianinas seguiram os métodos descritos por Mancinelli & Scharzt (1984) e Rabino & Mancinelli (1986).

Da fração aquosa do MCW, 1 mL foi submetido à secagem em Speed Vac e solubilizada em 2,0 mL de metanol (contendo 2 % HCl). Após agitação, foi realizada leitura da absorbância a 530 e 657 nm em espectrofotômetro. A concentração de antocianina foi obtida através da equação: $ABS = ABS\ 530\ nm - (0,25\ ABS_{657\ nm})$. A subtração de 25 % da ABS de 657 nm foi feita para retirar possíveis interferências ocorridas pela presença de clorofila.

A identificação da classe das antocianinas foi realizada da seguinte maneira: 2 g de parte aérea foram extraídos por uma hora em metanol contendo 1% de HCl. O extrato, após secagem em rotoevaporador, foi ressuscendido em água e submetido à cromatografia em papel Whatman 3 MM, utilizando o seguinte sistema de solventes: butanol : ácido acético : H₂O (4:1:5, v/v/v).

A visualização dos compostos foi realizada em UV a 254 e 366 nm. O perfil cromatográfico do extrato demonstrou a presença de apenas um tipo de antocianina. Esta fração foi recortada e extraída novamente em metanol contendo 1% de HCl e foi submetida à cromatografia de exclusão, sendo a purificação realizada em coluna de sephadex LH-20, contendo água – ácido acético (50%) como eluentes. Uma fração vermelha foi coletada e após secagem em Speed Vac, foi realizada a hidrólise de açúcares através da solubilização da amostra em HCl 2N a 100°C, por aproximadamente 1 hora. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 15.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante, contendo a antocianidina, foi analisado em HPLC, sendo injetada em coluna microsorb – C18, com detecção a 540 nm, utilizando os solventes: metanol(A) e ácido acético (B), para um gradiente de eluição que variou

de 10 % a 50 % de B em 50 minutos, com fluxo de 1 mL/min. A antocianidina foi coletada e identificada segundo as suas propriedades espectrais. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, onde foi traçada uma varredura e foi possível identificar em qual comprimento de onda ocorria a máxima absorção da amostra. Os resultados foram comparados com os dados espectrais para diferentes classes de antocianidinas, encontrados em Mabry *et al.* (1970).

3.5.5. Quantificação de prolina

Para a dosagem de prolina, foi utilizada a fração aquosa do MCW. As dosagens foram realizadas de acordo com o método da ninhidrina ácida, descrito por Bates & Waldren (1973).

A ninhidrina ácida foi preparada utilizando os seguinte reagentes: 600 mg de ninhidrina; 15 mL de ácido acético glacial e 10 mL de ácido ortofosfórico. Foram utilizados 2,0 mL da fração aquosa do MCW e em seguida foram adicionados 0,1 mL de glicina (94.5 mg/10mL H₂O) sob agitação. O volume foi completado para 3 mL com água. Após adição de 2,0 mL de ácido acético e 2,0 mL de ninhidrina ácida sob intensa agitação, a mistura permaneceu por 35 minutos em banho – maria a 100 °C. Após rápido resfriamento em gelo, foram adicionados 4,0 mL de tolueno sob constante agitação. Duas frações foram separadas, sendo a fração rósea (toluênica) utilizada para leitura em espectrofotômetro a 515 nm. A curva padrão variou de 5 – 25 ug/mL de prolina.

3.5.6. Quantificação de fenóis totais

As dosagens seguiram o método desenvolvido por Swain & Hillis (1959). Foram utilizados 20 µl de extrato em MCW e o volume foi completado para 3,5 mL com água. Adicionou-se 0,25 mL do reagente Folin – Ciocalteu e, exatamente 3 minutos depois, adicionou-se 0,5 mL de Na₂CO₃ (saturado) e 0,75 mL de água. Após agitação a mistura permaneceu em repouso por uma hora, e em seguida as leituras foram realizadas a 725 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi realizada nas concentrações de 20 a 200 µg/mL de ácido fênico.

3.5.7. Determinação da peroxidação lipídica

Foram utilizados 0,250 g de material vegetal (parte aérea ou raiz) que foram macerados em 5 mL de ácido tricloroacético (0,1 %), contendo aproximadamente 20 % de povinilpolipirrolidona. Após perfeita homogeneização, 1,4 mL foram transferidos para eppendorf para centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético (20 %, contendo 0,5 % de ácido tiobarbitúrico) em 0,5 mL do sobrenadante e a mistura foi mantida por 30 minutos a 95°C. Ao ser retirada do banho – maria, a amostra sofreu um rápido resfriamento em gelo. Com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento e também para clarear a amostra, 1,4 mL foram transferidos para eppendorf para centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Pharmacia a 535 e 600 nm. As determinações das concentrações de MDA foram realizadas através da fórmula:

$C = \text{ABS} (535 - 600) / E.b$, onde:

E = Coeficiente de extinção = $155 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}$; b = comprimento óptico;

De onde pode-se obter: $C = \text{ABS} (535 - 600) \times 155 \text{ mM}$ e os resultados são expressos em mMol de MDA / g de massa fresca.

3.5.8. Quantificações dos metabólitos secundários

a) acilfloroglucinol

As quantificação de acilfloroglucinol foram realizadas nos extratos diclorometânicos e de éter de petróleo obtidos a partir de raízes.

As quantificações foram realizadas em HPLC (Shimadzu) a 25°C , com separação em coluna C18, microsorb-MVTM e detecção em 284 nm. O gradiente foi composto por duas fases móveis: fase A (0,5 % de ácido acético em água) e fase B (0,5 % de ácido acético em acetonitrila). As condições das análises foram: 0-20 min, 10 % de B; 20 – 40 min, 50 % de B; 40 – 50 min, 60 % de B; 50 – 60 min, 100 % de B. O fluxo foi de 0,6 mL/min e o volume injetado de 50 μL . Os picos do padrão foram comparados com o das amostras através do tempo de retenção e da co-injeção da amostra com o padrão.

A partir da área do padrão no espectro, contendo concentração conhecida (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), foi possível realizar as quantificações da substância nos espectros.

b) Xantona, quercetina e rutina

As quantificações de xantona foram realizadas nos extratos obtidos a partir de éter de petróleo e diclorometano e de quercetina e rutina no extrato metanólico.

As quantificações foram realizadas, em HPLC (Shimadzu) a 25°C, com separação em coluna Supelco - LC18 e detecção em 254 nm. O gradiente foi composto por duas fases móveis: fase A (0,5 % de ácido acético em água) e fase B (metanol). As condições das análises foram: 0-5 min, 30 % de B; 05 – 20 min, 80 % de B; 20 - 30min, 100 % de B. O fluxo foi de 1,0 mL/min e o volume injetado de 25 µL. Os padrões utilizados foram: xantona (isolada na etapa fitoquímica), quercetina (Sigma) e rutina (composto purificado no CPQBA), os quais tiveram os seus picos comparados com o das amostras, através do tempo de retenção e da co-injeção da amostra com o padrão.

A partir da área dos padrões nos espectros, contendo concentrações conhecidas (5 µg/µL), foi possível realizar as quantificações das substâncias nos espectros dos diferentes extratos.

c) Ácido betulínico

As quantificações foram realizadas, a partir da metodologia de Oliveira *et al.* (2002), nos extratos em éter de petróleo e diclorometano. No caso do experimento de estresse de temperatura, onde os extratos foram obtidos apenas com metanol, alíquotas do extrato foram evaporadas em Speed Vac e solubilizadas em diclorometano.

As quantificações foram realizadas em HPLC (Shimadzu) – DAD (Diode Array Detector), com separação em coluna C-18, Microsorb^{MT}, e detecção em 210 nm. O sistema utilizado foi o isocrático, contendo acetonitrila : água (pH 3,0 com ácido fosfórico) – (9:1, v/v). O fluxo foi de 1,0 mL/min e o volume injetado de 20 µL.

A identificação da substância nas amostras foi realizada pela porcentagem de similaridade entre os picos, através da comparação dos perfis espectrofotométricos.

A equação da reta foi construída a partir de 3 repetições do padrão, cujas concentrações variaram de 20 a 60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A partir desta, foi possível fazer as quantificações de ácido betulínico nos extratos.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação das substâncias purificadas na etapa fitoquímica

a) Fração 67/96 F3.2: isouliginosina B

A seguir são apresentados os resultados espectrais da substância em: EM, RMN H^1 e C^{13} , UV, IV, são:

TLC: Sílica (G F254 – Merck), $CHCl_3$: metanol (19:1), $R_f = 0,48$

EM: 498 [M^+] (%); 483 (23), 364 (14), 275 (15), 262 (44), 247 (100), 219 (63), 193 (52), 167 (24), 149 (48), 91 (18), 71 (28) (Anexo 1).

UV $\lambda^{acetone}$ nm (**ABS**): 226 (0,35), 270 (0,49) (Anexo 2).

IV $\nu^{CH_2Cl_2}$ cm^{-1} (**filme**): 3259 (m, ν), 2930 (m, ν), 2872 (f, δ), 2655 (f, δ), 1743 (f, ν), 1642 (Fm ν), 1604 (F, ν), 1427 (F, ν), 1383 (m, ν), 1285 (m, ν), 1240 (m, ν), 1133 (m, ν), 1191 (m, ν), 1159 (m, ν) (Anexo 3).

RMN H^1 e C^{13} ($CDCl_3$, a 500 mhz): tabela 1 e anexos 4 e 5.

Os dados espectrais, juntamente com os dados de RMN de H^1 e de C^{13} , Dept 135° e 90°, RMN – 2D (Cosy e HSQC) foram comparados com os dados da literatura (Rocha *et al.*, 1995), onde foi possível elucidar a estrutura da substância isolada como sendo a de um acilfloroglucinol, anteriormente denominada em outras espécies de *Hypericum* como isouliginosina B.

Tabela 1. Dados de RMN H^1 e C^{13} de isouliginosina B de *H. brasiliense*

C	C^{13} δ (ppm)	H^1 δ (ppm)	C	C^{13} δ (ppm)	H^1 δ (ppm)
1	199,17		5'	154,60	
2	106,99		6'	104,48	
3	170,97	OH – 9,05 s	7'	160,47	OH - 11,69 s
4	44,09		8'	104,7	
4-Me	25,00	1,57 s	9'	160,47	OH – 14,14 s
5	187,26		10'	102,11	
6	111,35		11'	210,98	
7	17,05	3,52 (m)	12'	39,5	4,12(sep, j=7 Hz)
8	211,08		12'-Me	18,9	
9	36,78	4,19 (sep j=7 Hz)			
9-Me	18,93	1,19 (d, j=7Hz)			
2'	80,52				
2'-Me	27,7	1,59 s			
3'	124,13	5,47 (d, j=10 Hz)			
4'	117,15	6,74 (d, j=10 Hz)			

b) Fração F8 RES: ácido betulínico

Os resultados das análises realizadas em EM, RMN H^1 e C^{13} , UV, IV, são apresentados a seguir:

TLC: Sílica gel, $CHCl_3$:acetona R_f = 0,45

EM: 457,3039 [M^+] (%); 456 (60), 438 (20), 248 (45), 234 (25), 220 (27), 207 (57), 189 (100), 175 (32), 135 (41), 107 (35), 69 (38) (anexo 6).

UV $\lambda^{acetone}$ nm (ABS): 196 (0,74), 291 (0,07) (Anexo 7).

IV $\nu^{CH_2Cl_2}$ cm^{-1} (filme): 3429 (F, δ), 2939 (m, δ), 2872 (f, ν), 1692 (m, ν), 1653 (F, δ), 1460 (f, δ), 1102 (f, ν), 883 (f, ν), 618 (f, ν) (Anexo 8).

$[\alpha]_D^{acetone}$: 0,5 +/- 7.

RMN H^1 (acetona- d_6 a 300 MHz) e **C^{13}** ($CDCl_3$ a 500 MHz): tabela 2 e anexos 9 e 10.

Tabela 2. Dados espectrais de RMN H^1 e C^{13} do ácido betulínico de *H. brasiliense*.

C	C^{13} δ (ppm)	H^1 δ (ppm)	C	C^{13} δ (ppm)	H^1 δ (ppm)
1	38,31	2H	16	31,79	2H
2	26,36	2H	17	55,79	
3	77,25	OH, d, δ 3,28	18	46,57	1H
4-Me	27,37	3H, s, δ 1,24	19	48,7	1H
	14,8	3H, s, δ 0,94	20	150,26	
5	54,97	1H	20-Me	18,58	3H, s, δ 1,65
6	17,8	2H	21	29,18	2H
7	33,9	2H	22	36,7	2H
8	40,2		28	178,75	
8-Me	15,46	3H, s, δ 0,79	29	108,9	2H, s, δ 4,67
9	50,12	1H			
10	36,7				
10-Me	15,28	3H, s, δ 0,91			
11	20,41	2H			
12	25,07	2H			
13	37,87	1H			
14	41,95				
14-Me	14,05	3H,s, δ 0,71			
15	30,08	2H			

Os espectros de RMN H^1 e C^{13} , juntamente com os de Dept (90 e 135), HSQC e COSY foram comparados com a literatura onde foi possível a elucidação da estrutura do triterpeno como sendo a do ácido betulínico.

c) Fração F8.4: xantona

Os resultados das análises espectrais de massas, UV e RMN H^1 são apresentadas a seguir:

TLC: Sílica (G F254 – Merck), $CHCl_3$:MeOH (19:1, v/v) - R_f = 0,40

UV $\lambda^{acetônitrila}$ nm (ABS): 202 (0,25), 224 (0,35), 252 (0,32) e 312 (0,04)

EM: 295 [M^+], 284 (1), 273 (1), 256 (1), 241 (1), 236 (1), 228 (100), 200 (8), 171 (7), 115 (10), 81 (18), 69 (38), 57 (20) (Anexo 11).

A substância foi obtida em pequena quantidade e por isso não foram realizadas as análises de RMN de C^{13} , portanto não sendo possível elucidar a sua estrutura.

O perfil dos espectros de massas e de RMN de H^1 foram comparados com a literatura (Rocha *et al.*, 1994), onde foi possível identificar a substância como sendo a de uma xantona.

4.2. Identificação das substâncias nos extratos

As substâncias identificadas na etapa fitoquímica (xantona, acilfloroglucinol e ácido betulínico) juntamente com quercetina e rutina, foram utilizadas como padrões para a quantificação nos extratos das plantas submetidas aos tratamentos de estresse. A identificação foi feita em HPLC, através da comparação do tempo de retenção com a co-injeção da amostra com o padrão (figuras 9,10,11, 12) e da porcentagem (90%) de similaridade do pico entre o padrão e a amostra.

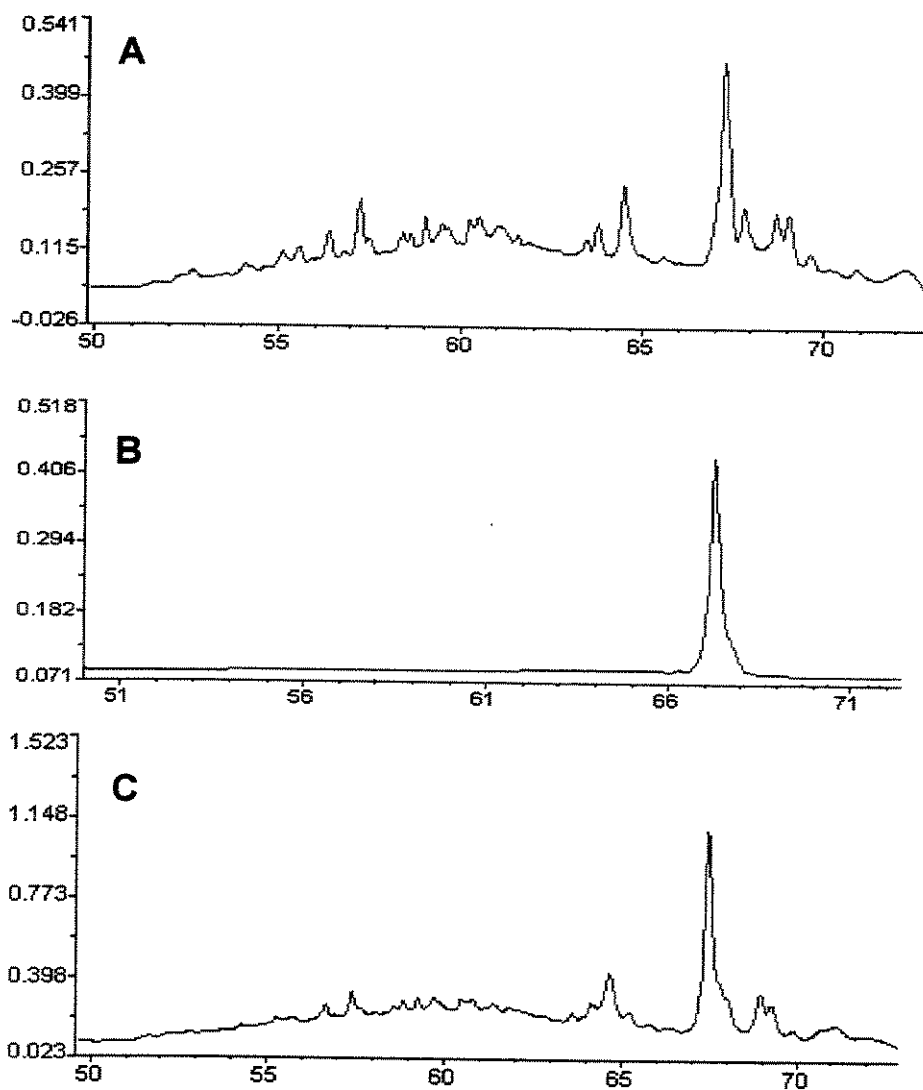


Figura 9. Espectros cromatográficos em HPLC (284 nm) do extrato em diclorometano da raiz (A) de plantas de *H. brasiliense* submetidas a déficit hídrico, do padrão de acilfloroglucinol (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).

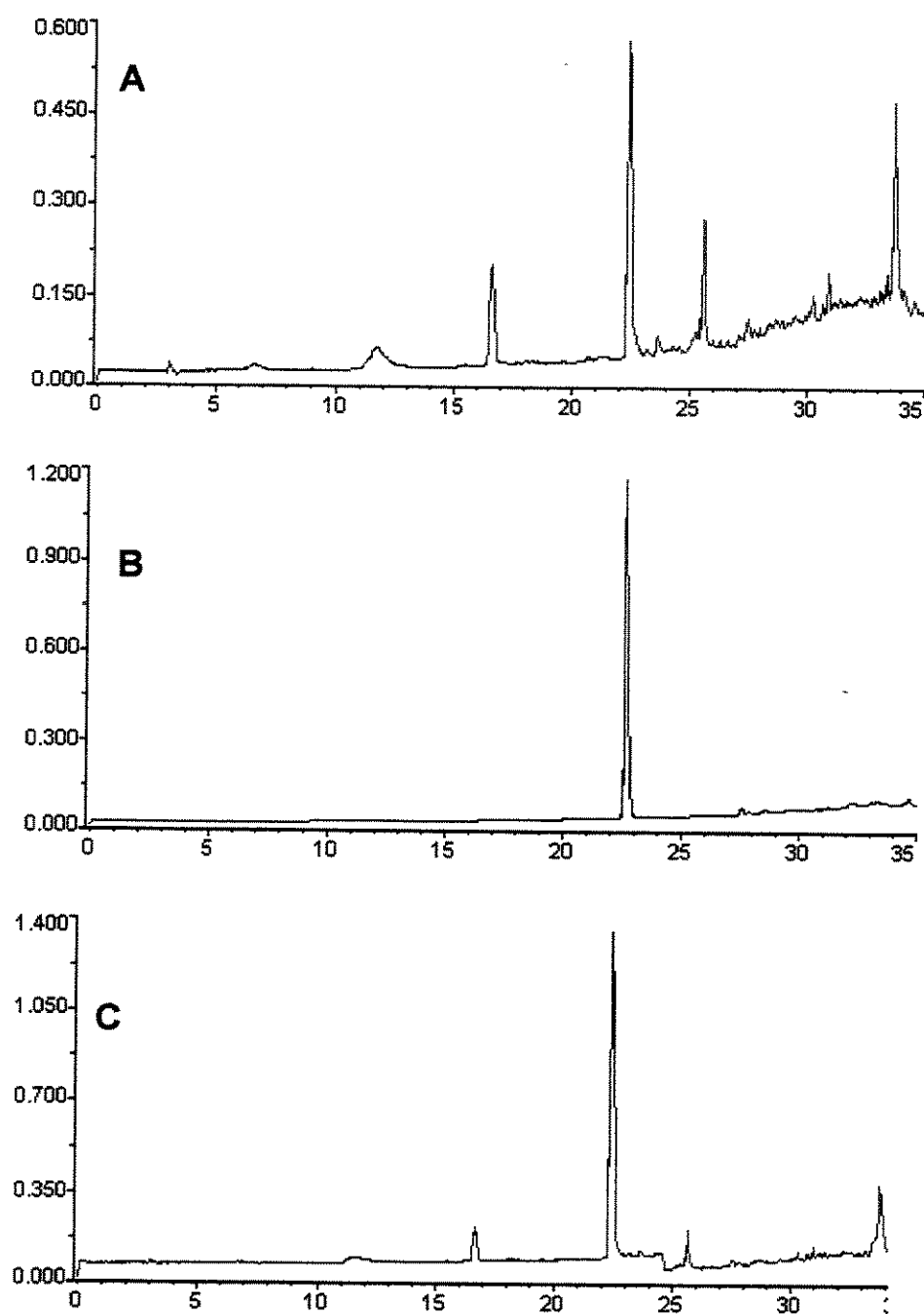


Figura 10. Espectros cromatográficos em HPLC (254 nm) do extrato em diclorometano da raiz de plantas de *H. brasiliense* submetidas a déficit hídrico (A), do padrão de xantona (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).

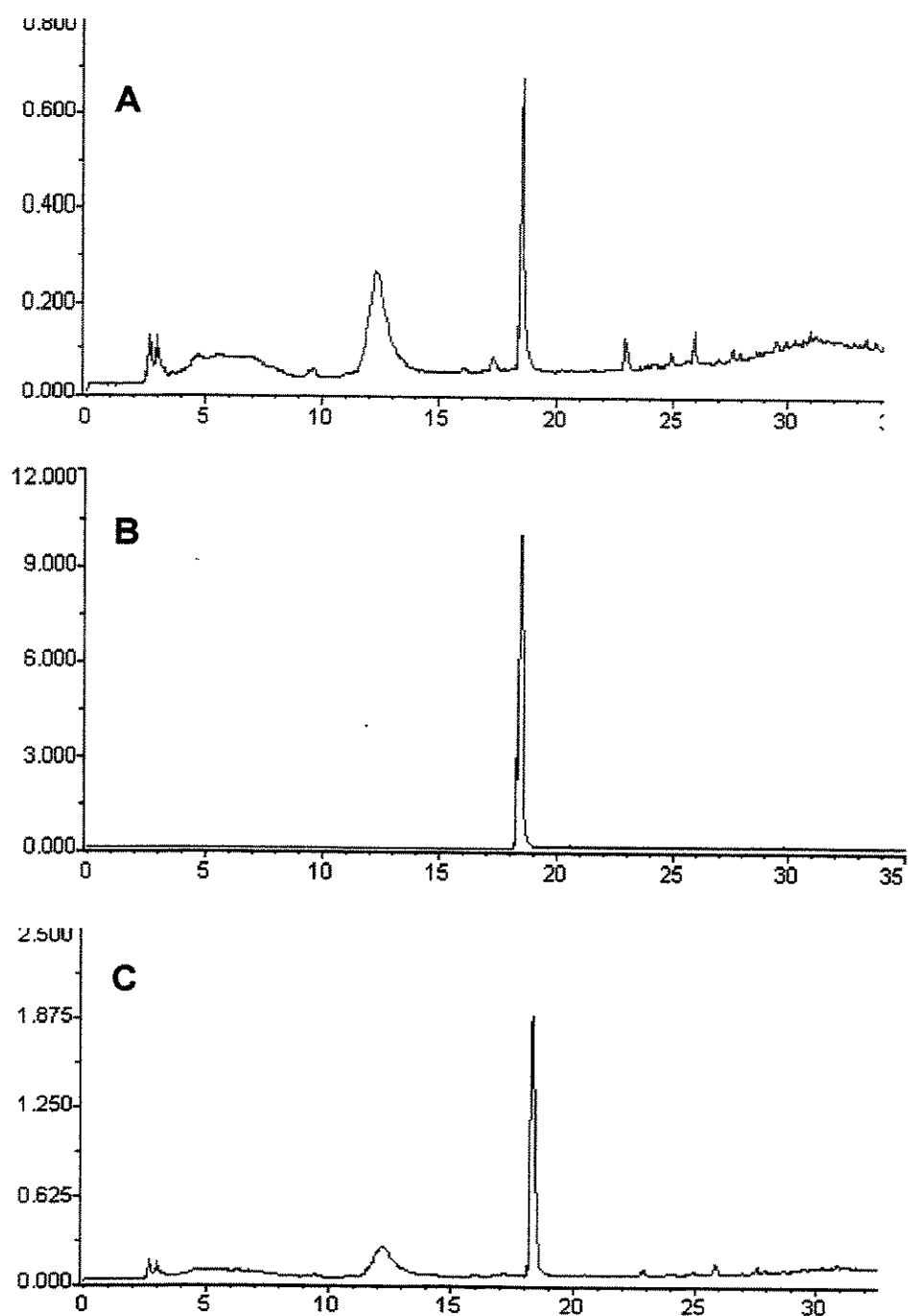


Figura 11. Espectros cromatográficos, em HPLC (254 nm) do extrato metanólico da parte aérea de plantas controle de *H. brasiliense* pertencentes ao experimento de estresse hídrico (A), do padrão de quercetina (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).

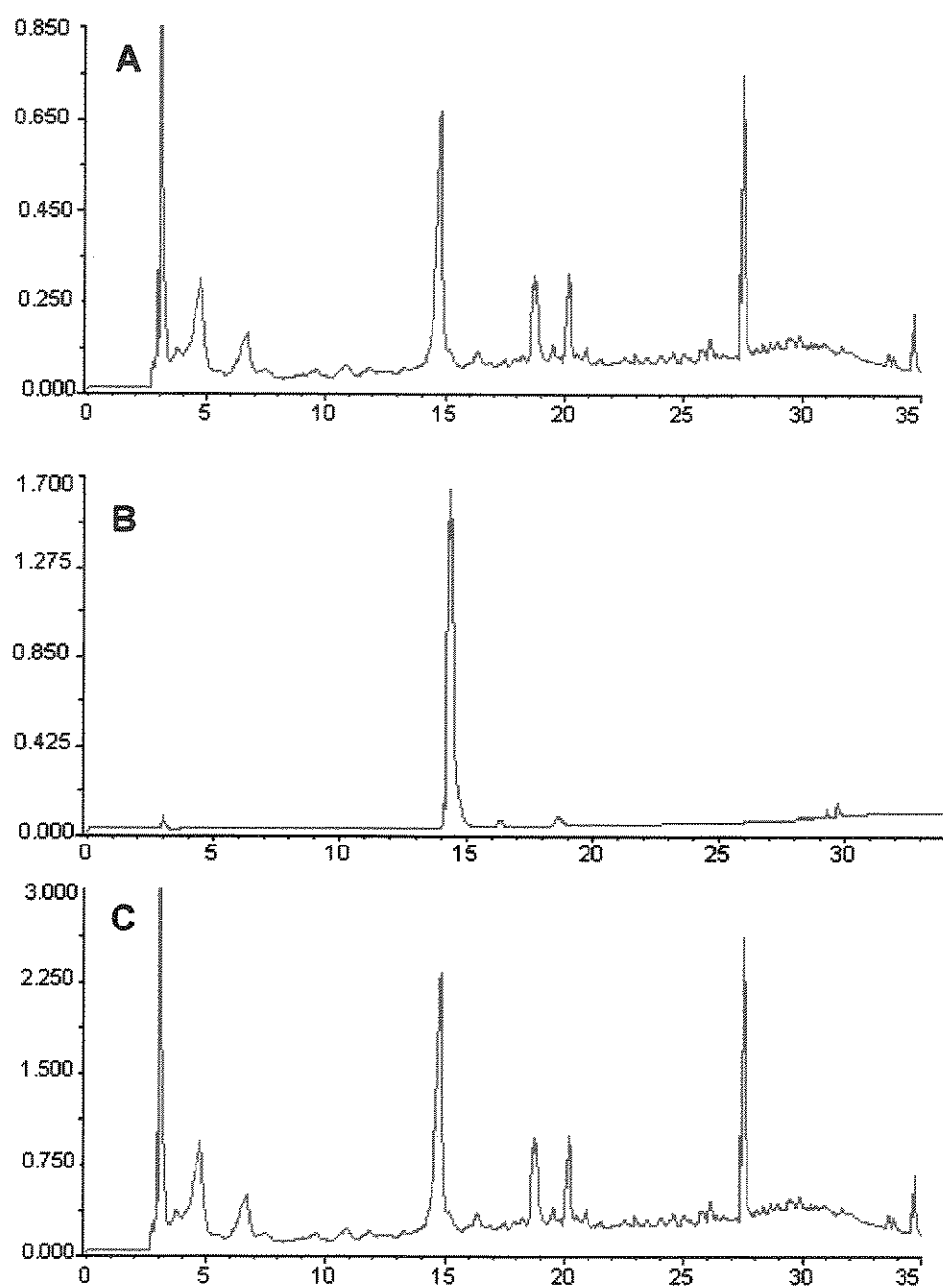


Figura 12. Espectros cromatográficos, em HPLC (254 nm) do extrato metanólico da parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a temperatura constante de 36°C (A), do padrão de rutina (B) e da co-injeção da amostra com o padrão (C).

4.3. Caracterização da produção dos metabólitos secundários nos diferentes estádios de desenvolvimento

A produção dos metabólitos secundários foi analisada nas diferentes partes das plantas (A = região apical; MS = região mediana superior; MI = região mediana inferior e R = raiz), nos diferentes estádios de desenvolvimento (vegetativo, florescimento e frutificação) e os resultados são mostrados na figura 13.

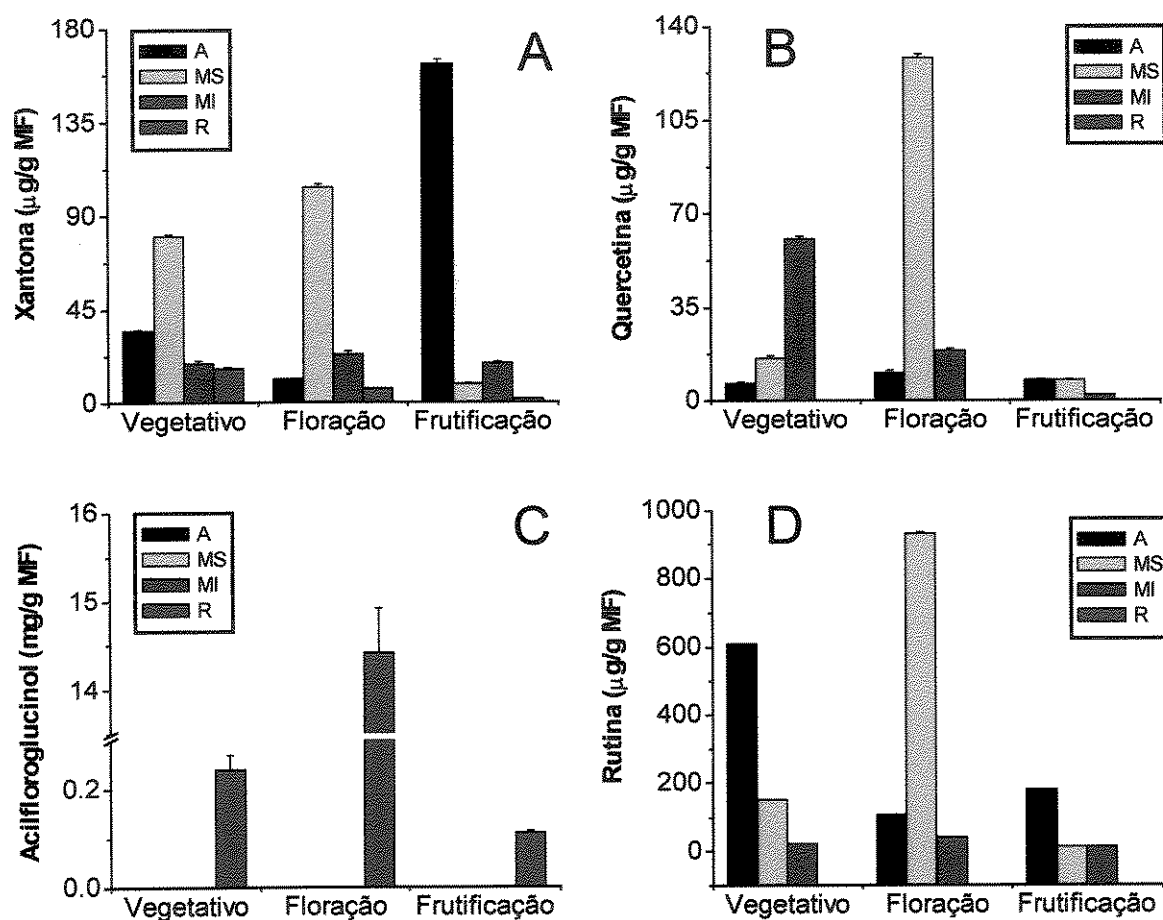


Figura 13. Conteúdo de xantona (A), quercetina (B), rutina (D) nas diferentes partes das plantas (A= região apical; MS= região mediana superior; MI= região mediana inferior; R= raiz) e acilfloglucinol (C) nas raízes de *H. brasiliense*, em diferentes estádios de desenvolvimento. Quando não indicado na figura, significa que não foi detectada a presença da substância.

Verifica-se que a produção de xantonas ocorre em todas as partes das plantas, nos diferentes estádios de desenvolvimento. Quando as plantas encontram-se na fase vegetativa, ocorre maior acúmulo da substância na região mediana superior, mas quando as plantas entram na fase de florescimento há redução na região apical e maior acúmulo na região mediana superior, sendo que na fase de frutificação ocorre maior acúmulo na região apical. Verificou-se que à medida que as plantas começaram a ter diferenciação das gemas apicais para flores e frutos, houve uma queda no acúmulo de xantonas nas raízes.

Quercetina e rutina foram encontradas nos diferentes estádios de desenvolvimento e, com exceção das raízes, foram encontradas em todas as partes das plantas. Essas substâncias concentram-se principalmente na região mediana superior, durante a floração.

Verificou-se correlação inversa entre quercetina e rutina nas diferentes partes das plantas quando estas se encontram na fase vegetativa de crescimento, enquanto que na fase de frutificação a concentração de quercetina decresce a quantidades mínimas quando em MI. Mas de maneira geral, os conteúdos de rutina são muito superiores aos de quercetina, independente da parte da planta ou fase de crescimento.

O acilfloroglucinol em estudo foi encontrado apenas nas raízes, havendo um elevado acúmulo na fase de florescimento.

Com relação à produção de ácido betulínico nas diferentes partes das plantas verifica-se que a produção desse triterpeno é baixa quando as plantas estão em fase vegetativa ou em florescimento (figura 14), sendo que na fase de frutificação, ocorre maior acúmulo nos frutos, diminuindo nas partes mais baixas das plantas, sendo menor a concentração nas raízes.

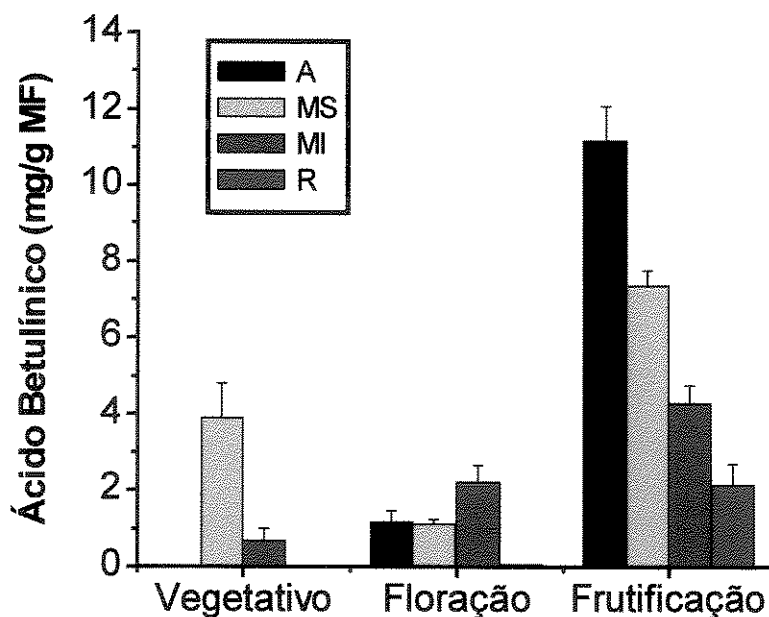


Figura 14. Conteúdo de ácido betulínico nas diferentes partes das plantas (A= região apical; MS= região mediana superior; MI= região mediana inferior; R= raiz) de *H. brasiliense* (contendo a massa em g) em diferentes estádios de desenvolvimento. Quando não indicado na figura, significa que não foi detectada a presença da substância.

Quando foi analisado o conteúdo de compostos fenólicos totais e de ácido betulínico na planta inteira, nos diferentes estágios de desenvolvimento (figura 15), verificou-se que os compostos fenólicos acumulavam-se predominantemente quando as plantas estavam em floração, apresentando concentrações mínimas quando em fase de frutificação. Mas, verificou-se que a produção de ácido betulínico foi superior quando as plantas estavam em fase de frutificação, não havendo diferenças quando estavam em estágio vegetativo ou em floração.

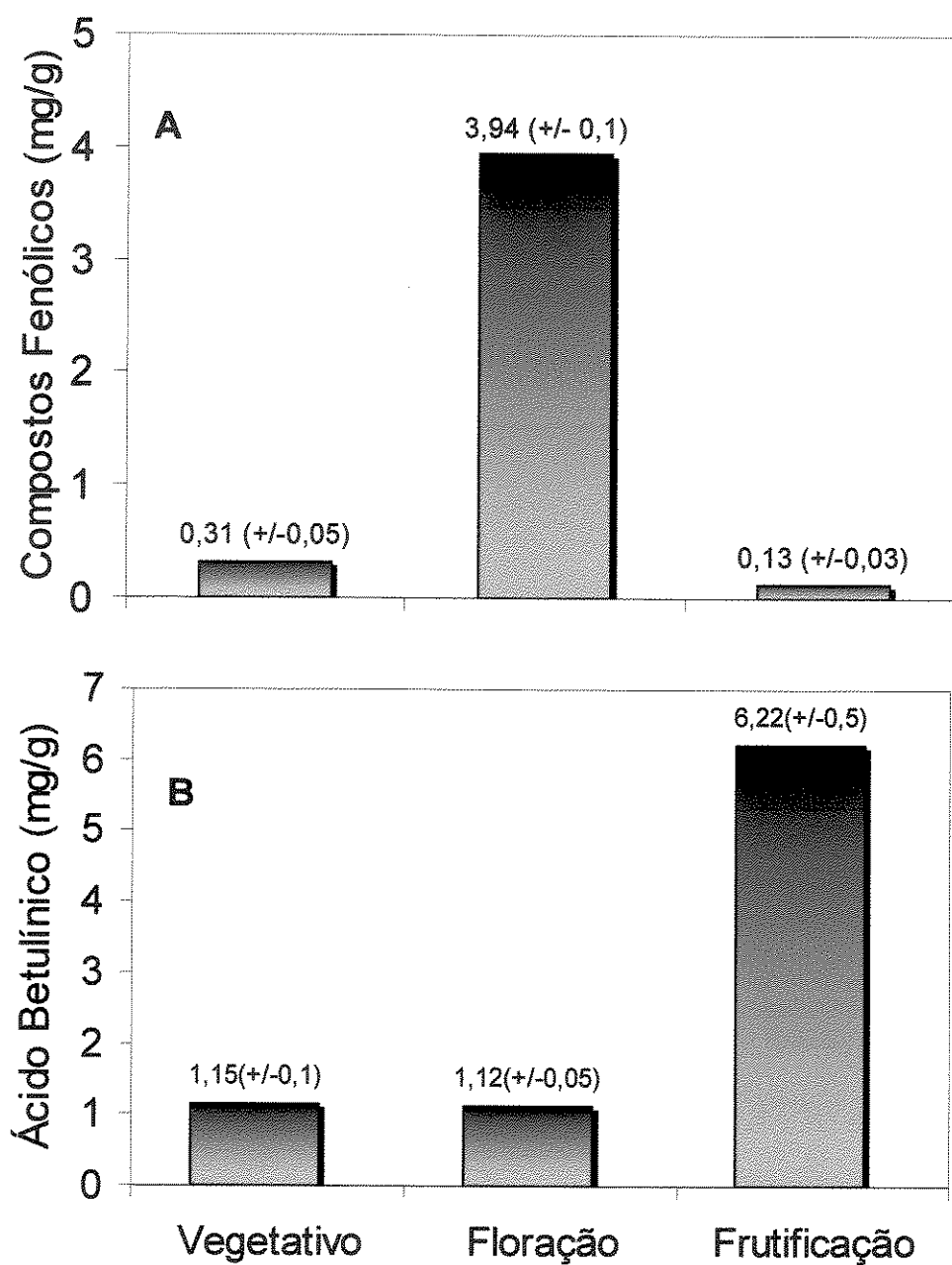


Figura 15. Conteúdo total de compostos fenólicos (xantona, rutina, quercetina e acilfloroglucinol) (A) e ácido betulínico (B) em planta inteira de *H. brasiliense* em diferentes estádios de desenvolvimento.

4.4. Estresse de temperatura

As plantas mantidas em condições de iluminação natural, apresentaram maior ganho de massa fresca quando a temperatura noturna foi de 30°C, mas quando a temperatura noturna foi de 10°C, o ganho foi inferior ao das plantas controle (figura 16). Além de ter proporcionado maior ganho de massa fresca, a temperatura noturna de 30°C também estimulou o florescimento das plantas (dados não apresentados).

Sob baixa intensidade luminosa, as plantas mantidas a 25°C (controle) apresentaram massa fresca superior às plantas dos demais tratamentos.

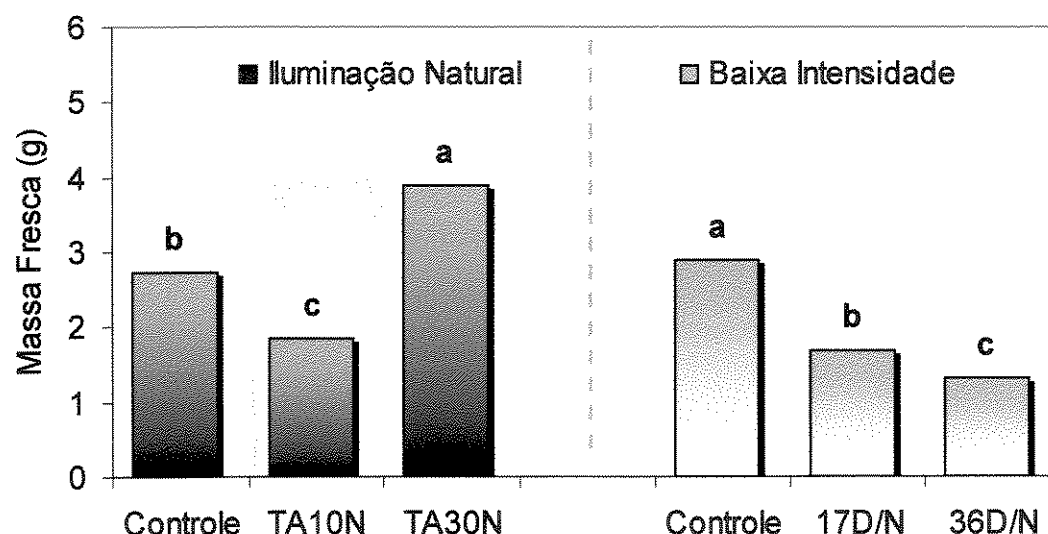


Figura 16. Massa fresca da parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial). Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey.

Para tentar caracterizar a condição de estresse nas plantas submetidas aos diferentes regimes de temperatura e intensidade luminosa, foram realizadas as

determinações da eficiência quântica do PSII e a determinação do conteúdo dos indicadores bioquímicos de estresse, MDA e prolina na parte aérea (figura 17).

Na temperatura noturna de 10°C observou-se menor eficiência quântica do PSII (figura 17A), enquanto que os demais tratamentos, dos dois experimentos, apresentaram valores semelhantes. Com relação ao acúmulo de MDA (figura 17B), o qual é um indicador da ocorrência de peroxidação lipídica das membranas celulares, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos expostos à iluminação natural, mas em condição de baixa intensidade luminosa, as plantas mantidas a 17°C apresentaram elevada produção de MDA, sugerindo a ocorrência de dano nas membranas celulares.

O acúmulo de prolina foi estatisticamente significativo nas plantas mantidas a 10°C noturno (figura 17C), sendo que em condições de baixa intensidade luminosa houve maior acúmulo nas plantas mantidas em temperatura constante de 17 e 36°C, quando comparadas com as plantas controle.

A baixa eficiência quântica do PSII e o elevado acúmulo de prolina nas plantas mantidas em temperatura noturna de 10°C demonstram que estas plantas podem ter entrado em estresse, por danos ocorridos no aparelho fotossintético. Entretanto, em condições de baixa intensidade luminosa, as plantas mantidas em temperatura constante de 17°C, o indicador de estresse foi a elevada peroxidação lipídica nas membranas, o qual teve como consequência o acúmulo de prolina.

As plantas mantidas em temperatura constante de 36°C tiveram baixo acúmulo de MDA e a eficiência do PSII não foi alterada. No entanto, ocorreu acúmulo de prolina, demonstrando que estas podem ter entrado em estresse.

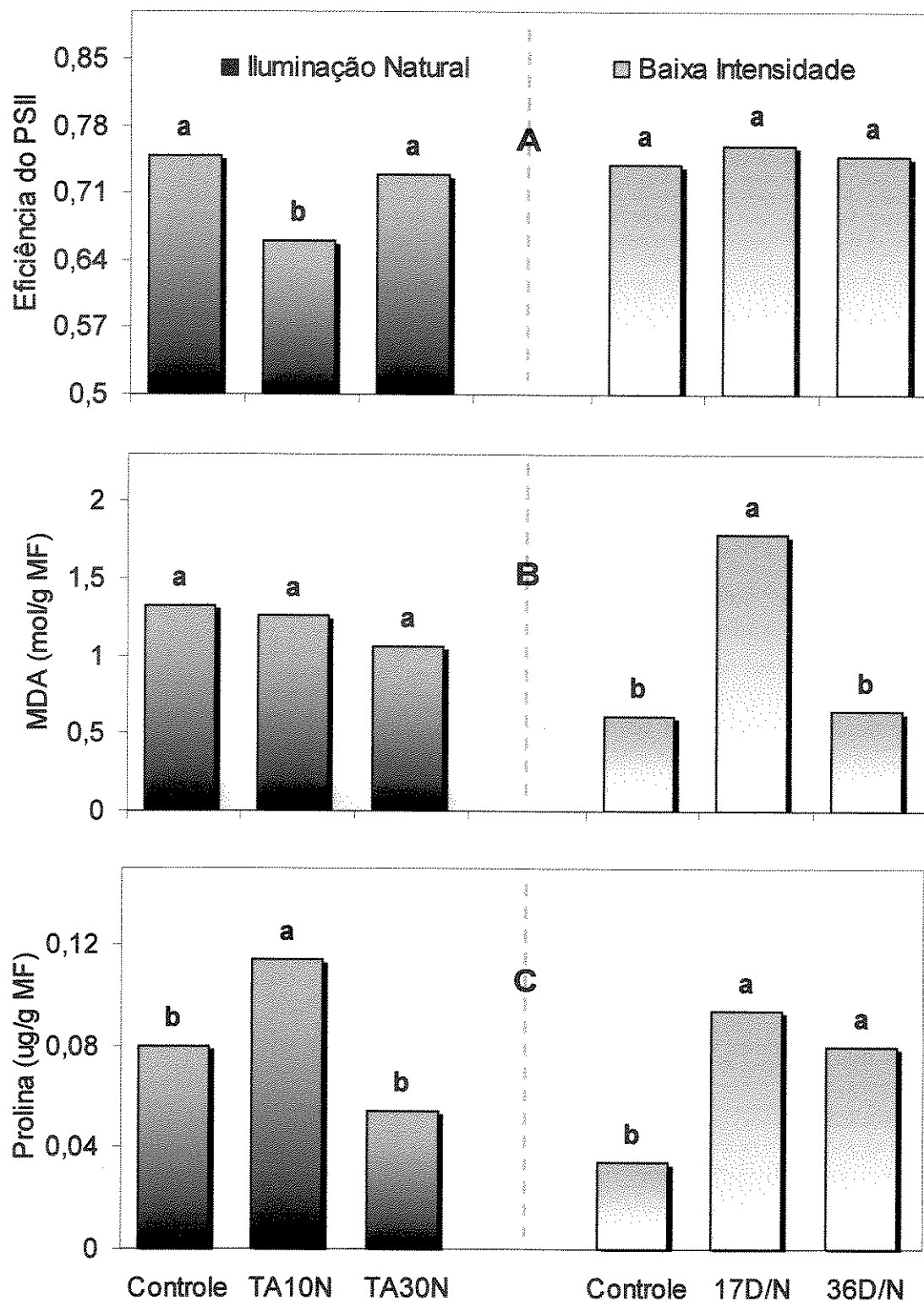


Figura 17. Eficiência quântica do PSII (A), conteúdo de MDA (B) e prolina (C) na parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17 e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial). Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey.

Ao final dos experimentos, algumas plantas apresentaram coloração vermelha e, então, foram realizadas as determinações de fenóis totais e antocianinas (figura 18), com o intuito de verificar se elas tiveram o seu metabolismo aclimatado aos tratamentos estabelecidos.

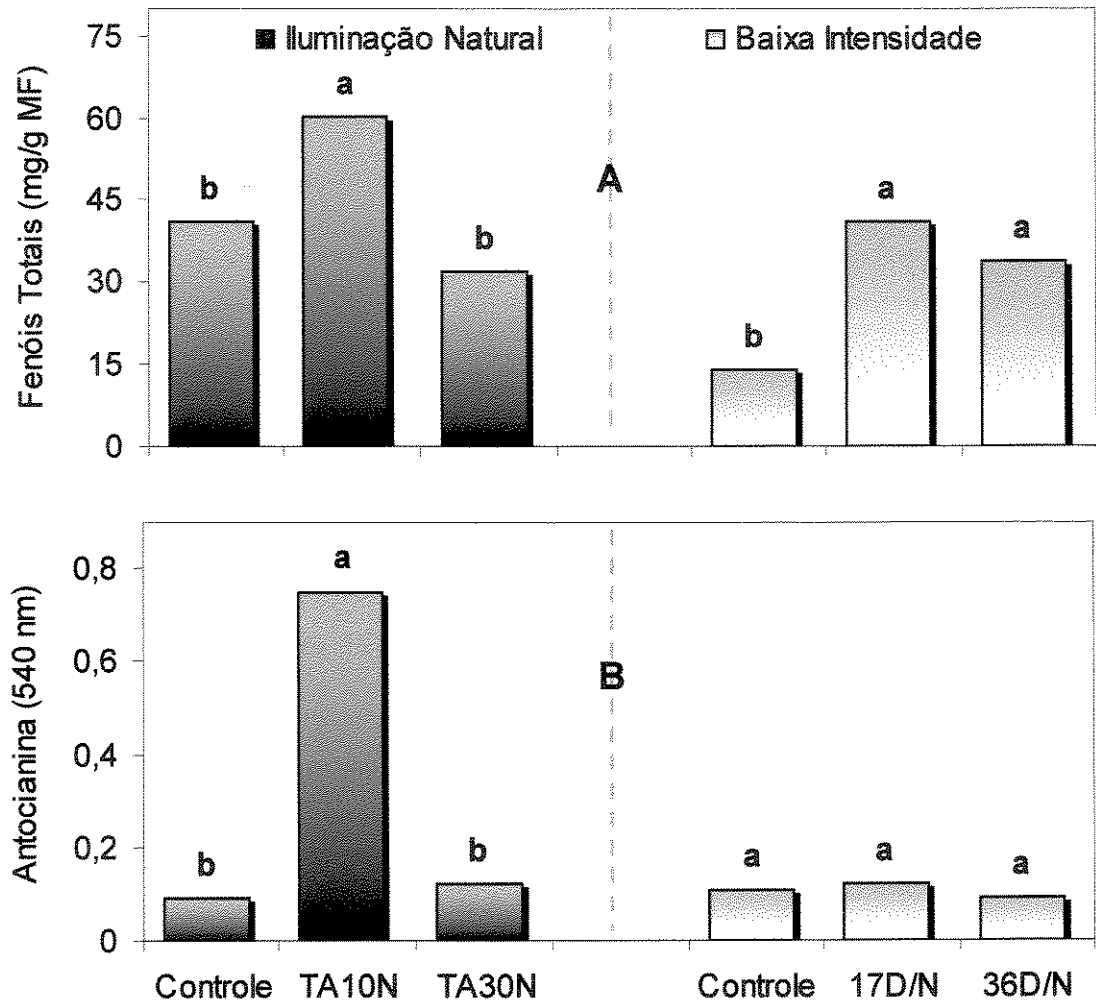


Figura 18. Conteúdo de fenóis totais (A) e antocianinas (B) na parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial). Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey.

A produção de fenóis totais foi superior nas plantas mantidas a 10°C, sob luminosidade natural (figura 18A) provavelmente porque este tratamento também proporcionou maior acúmulo de antocianina (figura 18B).

A baixa intensidade luminosa parece ter sido prejudicial para a síntese de antocianinas, uma vez que estatisticamente as médias dos tratamentos não diferiram entre si. Essa condição de luminosidade também interferiu na produção de fenóis totais, uma vez que as plantas controle produziram menos que as plantas controle, mantidas em condição natural. Entretanto, a produção de fenóis totais das plantas mantidas em temperaturas constantes de 17 e 36°C, foi superior às plantas controle (25°C).

As plantas mantidas em temperatura noturna de 30°C não apresentaram aumento na produção de fenóis totais e antocianinas em relação às plantas controle, mas parecem ter ajustado o seu metabolismo à condição adversa, uma vez que observou-se a ocorrência de florescimento (dados não apresentados). O mesmo pode ser verificado com relação à produção de quercetina e rutina (figuras 19B,C), uma vez que as plantas em temperatura noturna de 30°C produziram tais substâncias fenólicas em menores quantidades do que as plantas controle. Mas, nestas mesmas plantas a produção de xantonas foi superior à das plantas controle, porém, em quantidades muito inferiores à das plantas mantidas em temperatura noturna de 10°C (figura 19A).

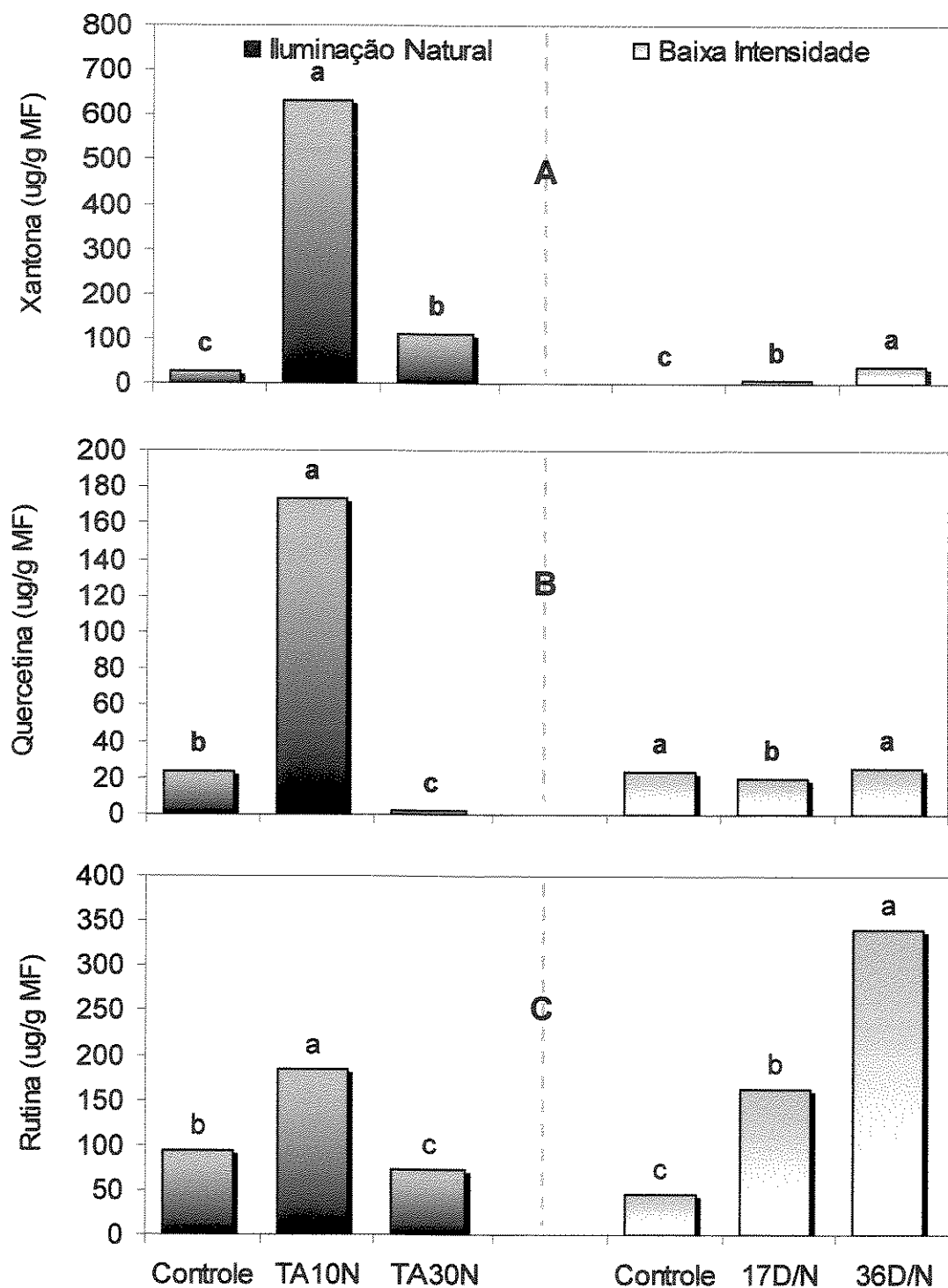


Figura 19. Conteúdo de xantona (A), quercetina (B) e rutina (C) na parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial). Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey.

A baixa intensidade luminosa parece ter influenciado negativamente na produção de xantonas, uma vez que as plantas controle mantidas em tais condições praticamente não produziram esta substância, quando comparadas com as plantas controle crescidas em condições de luminosidade natural (figura 19A). O mesmo pode ser observado para as plantas mantidas em temperatura constante de 17 e 36°C, que tiveram a produção dessa substância em quantidades inexpressivas quando comparadas com as plantas mantidas em condição de luminosidade natural.

Os resultados da figura 19 foram agrupados na figura 20 para melhor expressar a produção de compostos fenólicos totais. Verifica-se que o conteúdo de compostos fenólicos é inverso ao crescimento, uma vez que os tratamentos que apresentaram os maiores ganhos de massa fresca apresentaram as menores produções de metabólitos secundários, independente da intensidade luminosa ou regime de temperatura.

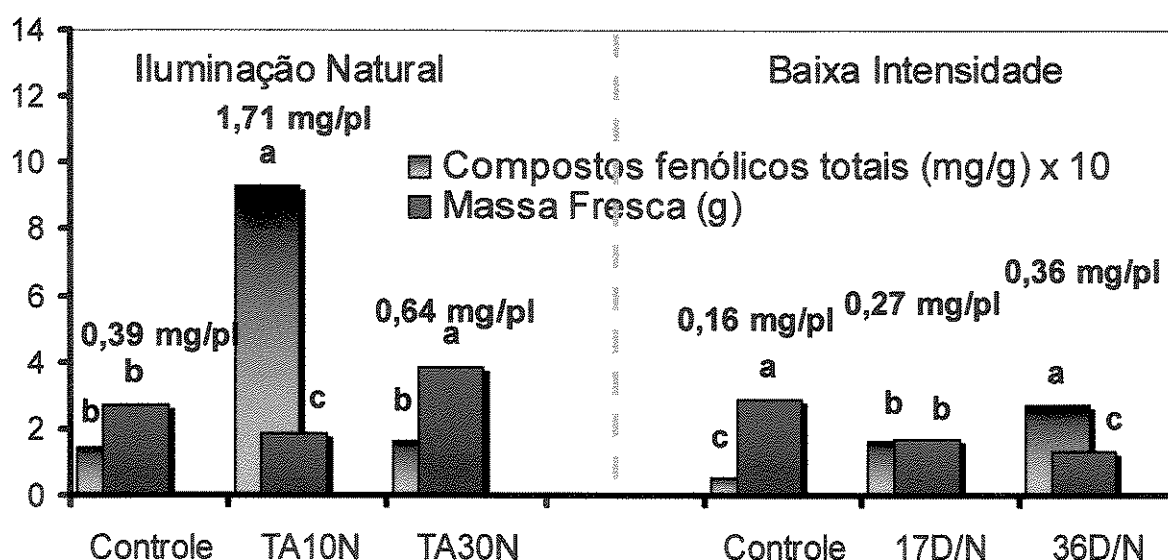


Figura 20. Teor (mg/g) e conteúdo (mg/parte aérea) de compostos fenólicos totais (xantona, quercetina e rutina) e massa fresca da parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial). Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada parâmetro analisado.

Enquanto as plantas mantidas em temperatura noturna de 30°C, aumentaram o ganho de massa fresca, produzindo baixa quantidade de compostos fenólicos, as plantas mantidas em temperatura constante de 36°C, apresentaram baixo ganho de massa fresca, mas com aumento da produção de compostos fenólicos totais, sugerindo um desvio do fluxo de carbono para essa via biossintética.

Com relação à produção de ácido betulínico, na figura 21 verifica-se que a produção dessa substância foi estatisticamente inferior nas plantas mantidas em temperatura noturna de 30°C, sendo que não houve diferença entre as plantas controle e as mantidas em temperatura noturna de 10°C, quando em condições de

casa de vegetação. Entretanto, quando as plantas foram mantidas em condições de baixa intensidade luminosa, houve aumento na produção do triterpeno quando a temperatura era de 17 e 36°C constante.

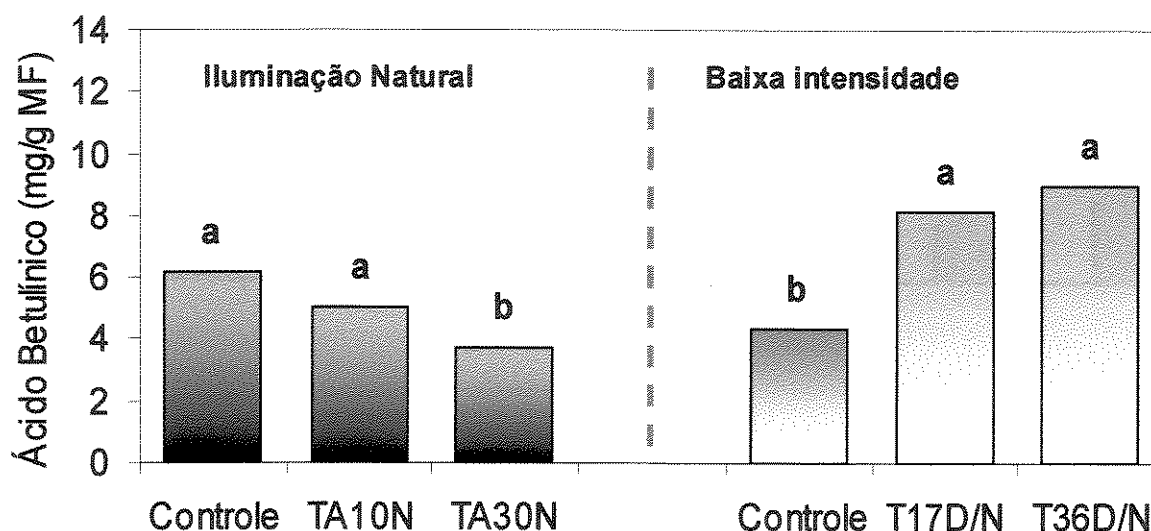


Figura 21. Conteúdo de ácido betulínico na parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial). Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey.

Quando se analisa a produção de ácido betulínico em relação ao ganho de massa fresca (figura 22), verifica-se que em baixa intensidade luminosa houve correlação inversa entre os parâmetros analisados, obtendo-se $r = -0,99$.

Tanto em condições de casa de vegetação como de baixa intensidade luminosa, a menor produção de ácido betulínico ocorreu nos tratamentos onde houve

maior ganho de massa fresca ou seja, em temperaturas noturna de 30°C e 25°C constante.

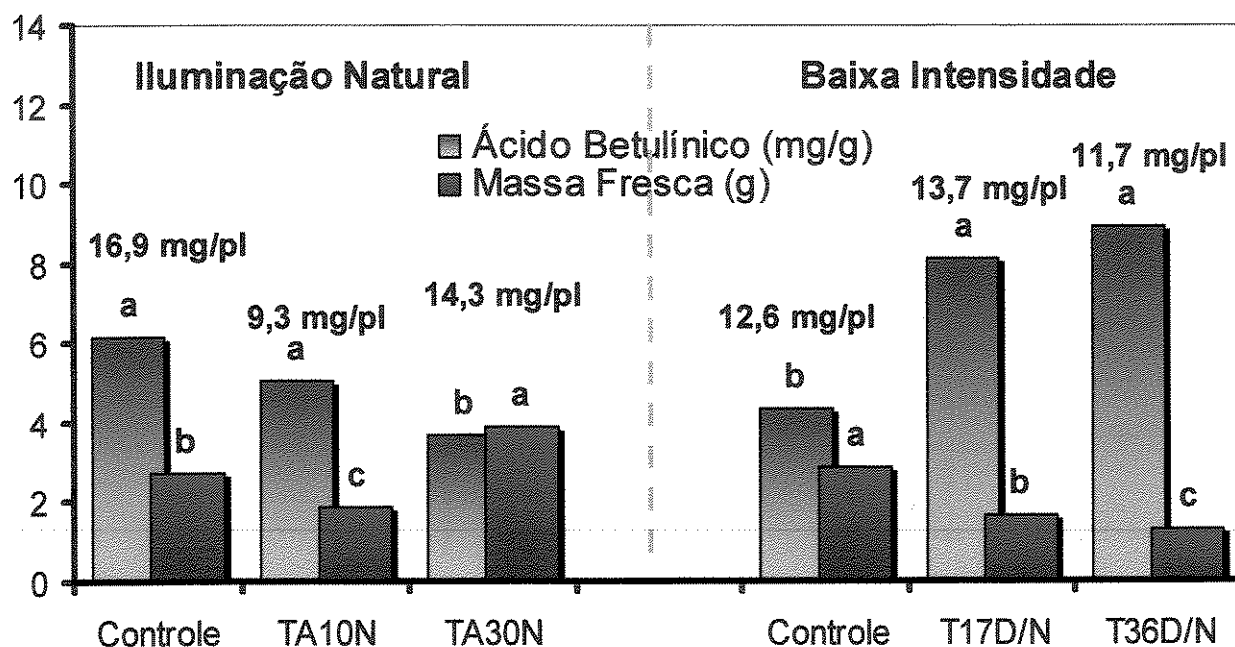


Figura 22. Teor (mg/g), conteúdo (mg/parte aérea) de ácido betulínico e massa fresca (g) da parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a três regimes de temperatura (controle = temperatura ambiente; TA10N = temperatura ambiente durante o dia e 10°C durante a noite; TA30N = temperatura ambiente durante o dia e 30°C noturna) com iluminação natural (casa de vegetação) e três regimes de temperatura constante durante o dia e noite (controle = 25°C; 17D/N e 36 D/N = temperatura constante de 17°C e 36°C durante o dia e noite), sob baixa intensidade luminosa (luz artificial). Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada parâmetro analisado.

O tratamento T36D/N proporcionou o acúmulo de 0,7% de ácido betulínico em relação à massa fresca, sendo um ganho de aproximadamente 0,5% em relação às plantas controle crescidas tanto em condições de casa de vegetação como em baixa intensidade luminosa.

4.5. Estresse hídrico

Com relação ao crescimento das plantas estudadas, o maior ganho de matéria fresca na parte aérea ocorreu nas plantas controle (figura 23), uma vez que nos demais tratamentos as condições de crescimento foram limitantes.

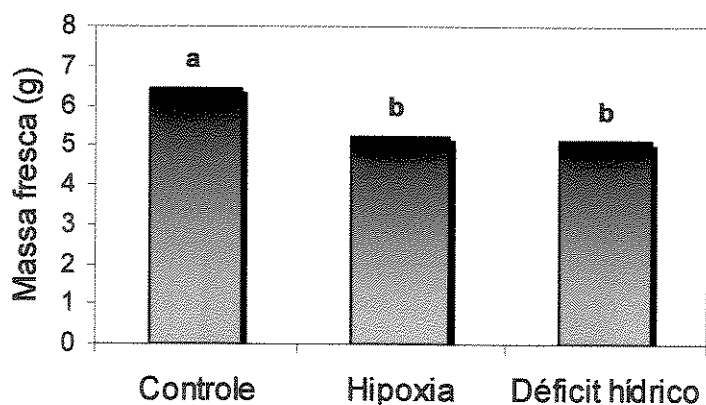


Figura 23. Massa fresca (g) da parte aérea de plantas de *H. brasiliense* mantidas sob estresse hídrico, durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey.

Para caracterizar a condição de estresse, ao término do experimento, foram realizadas, as determinações do potencial hídrico, do teor de prolina na parte aérea e da peroxidação lipídica na parte aérea e raiz (figura 24). Verificou-se que as plantas mantidas sob déficit hídrico, apresentaram potencial hídrico (figura 24A) muito inferior ao dos demais tratamentos, indicando que estas entraram em estresse. Entretanto, verificou-se que tanto folhas como raízes das plantas mantidas em hipoxia apresentaram maior produção de MDA (figura 24B), demonstrando elevada peroxidação lipídica. No final do experimento, as raízes destas plantas apresentavam-se com aspecto escurecido e parcialmente necrótico, provavelmente

ocasionado pela ausência de oxigenação do substrato. No mesmo tratamento, foram detectados maiores teores de prolina (figura 24C), não havendo diferença significativa entre as plantas mantidas em condições de déficit hídrico e as plantas controle.

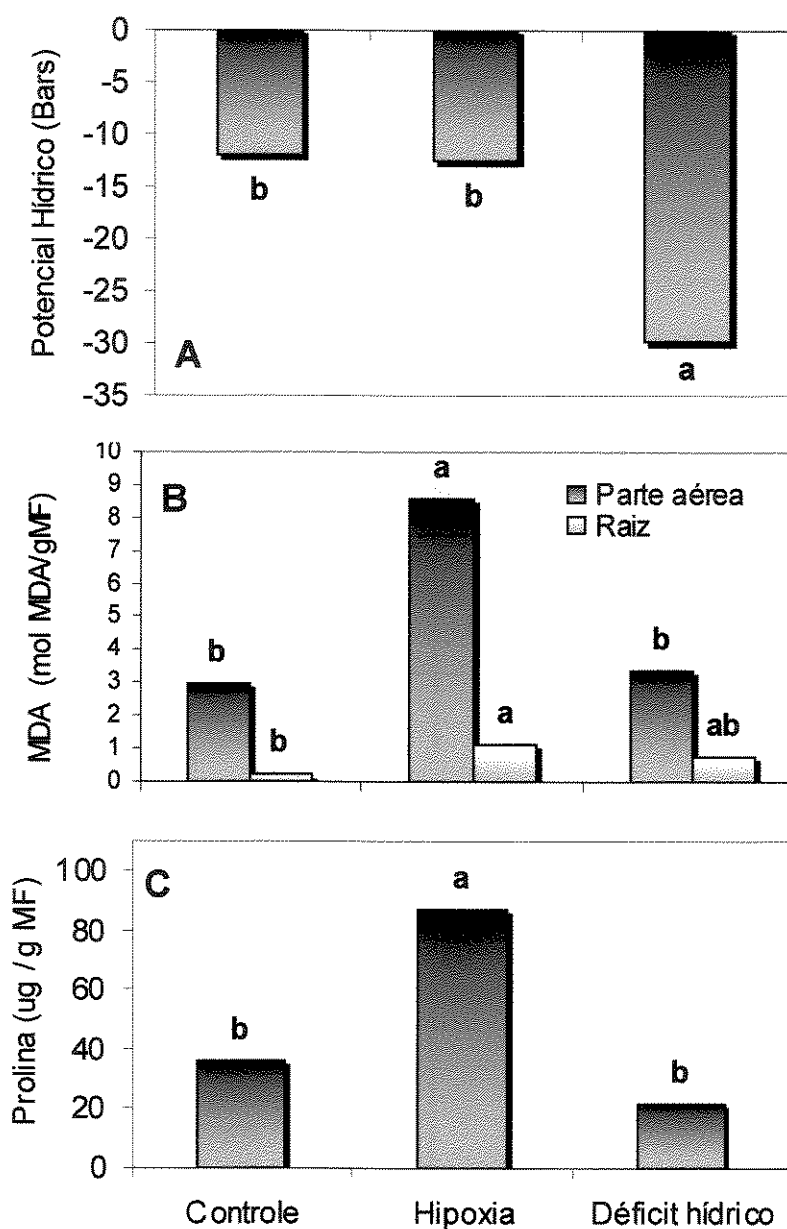


Figura 24. Potencial hídrico (A), teor de MDA na parte aérea e raiz (B) e teor de prolina (C) na parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada órgão.

Ao final do experimento as plantas mantidas em hipoxia apresentaram-se com coloração avermelhada, sugerindo que alguns compostos do metabolismo secundário poderiam estar sendo produzidos. Então, foram realizadas as determinações dos teores de fenóis totais e concentração de antocianinas (figura 25). Verificou-se que o teor de fenóis totais na parte aérea não diferiu estatisticamente entre as plantas mantidas em hipoxia e déficit hídrico, mas foram maiores do que o controle (figura 25A). A concentração de antocianinas foi superior nas plantas mantidas em hipoxia (figura 25B).

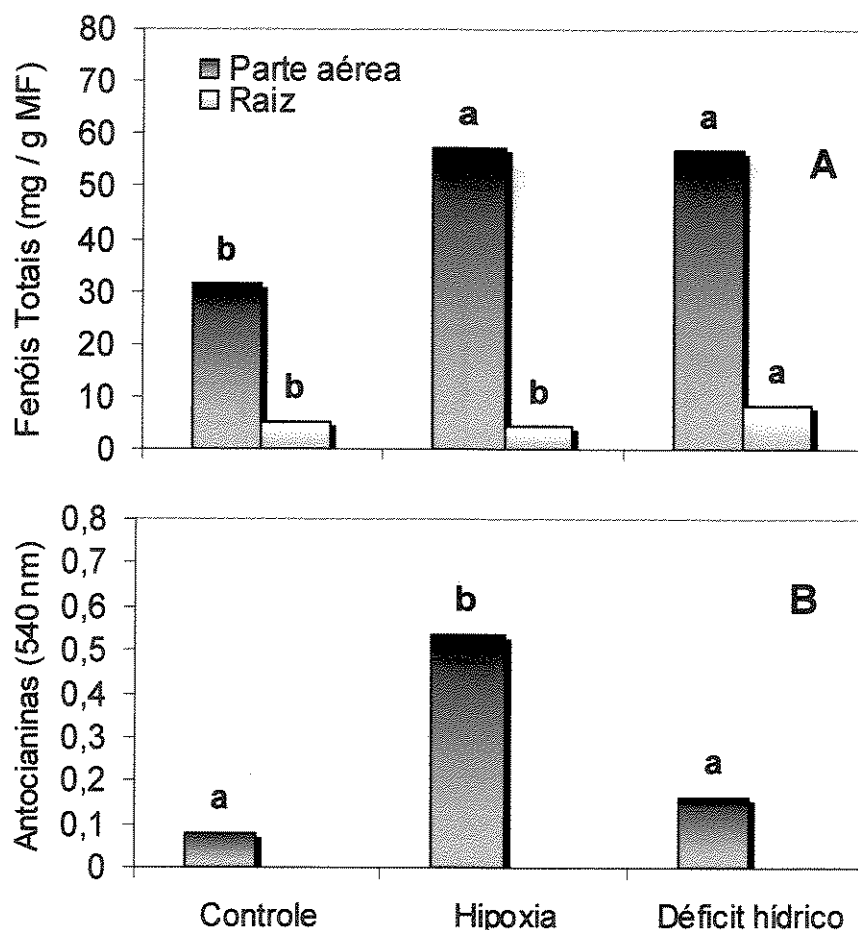


Figura 25. Teores de fenóis totais na parte aérea e raiz (A) e antocianinas (B) em plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada órgão analisado.

Na purificação da antocianina verificou-se a presença de apenas um tipo no extrato e as análises do espectro de ultravioleta revelaram que as antocianidinas tem estrutura de cianidina (figura 26), as quais apresentam máxima absorção no ultravioleta em 535 nm.

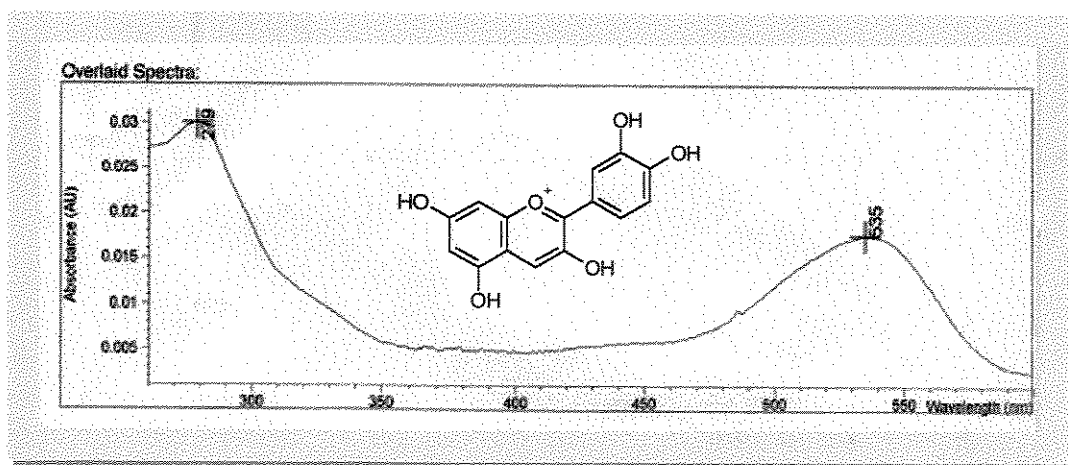


Figura 26. Espectro no UV e estrutura da cianidina de *H. brasiliense*.

Na figura 27 são apresentados os resultados dos conteúdos de acilfloroglucinol em raízes de *H. brasiliense*. A substância não foi detectada na parte aérea das plantas. Verifica-se que os maiores conteúdos ocorreram quando as plantas foram mantidas sob déficit hídrico e a melhor extração do composto ocorreu em éter de petróleo.

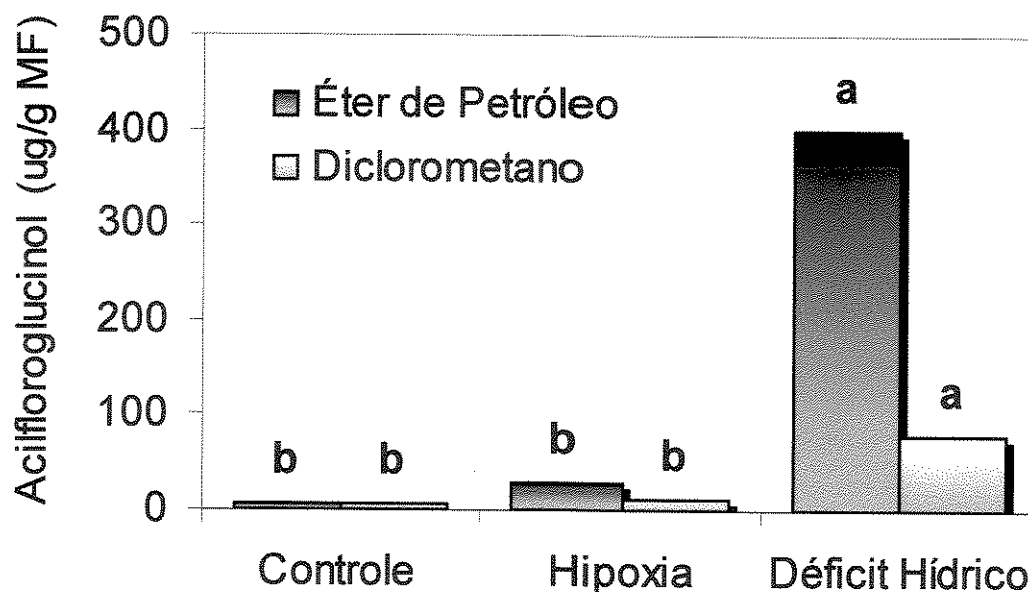


Figura 27. Conteúdo de acilfloroglucinol, em extratos obtidos a partir de éter de petróleo e diclorometano, em raízes de plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada parâmetro analisado.

O extrato em éter de petróleo foi realizado como forma de fazer uma pré-limpeza do material, para que depois fossem realizadas as determinações de xantona no extrato em diclorometano que, segundo a literatura, é o melhor extrator para esta substância. Mas no entanto, esta substância foi detectada nos extratos em éter de petróleo, diclorometano e metanol, sendo que a melhor extração ocorreu em diclorometano. Os valores obtidos nas quantificações de xantona, em cada extrato, foram somados e apresentados na figura 28. Verificou-se que o estresse hídrico estimulou a produção de xantona, uma vez que na parte aérea a produção foi superior nas plantas mantidas em condições de hipoxia, sendo que nas raízes a produção foi superior nas plantas mantidas em condições de déficit hídrico.

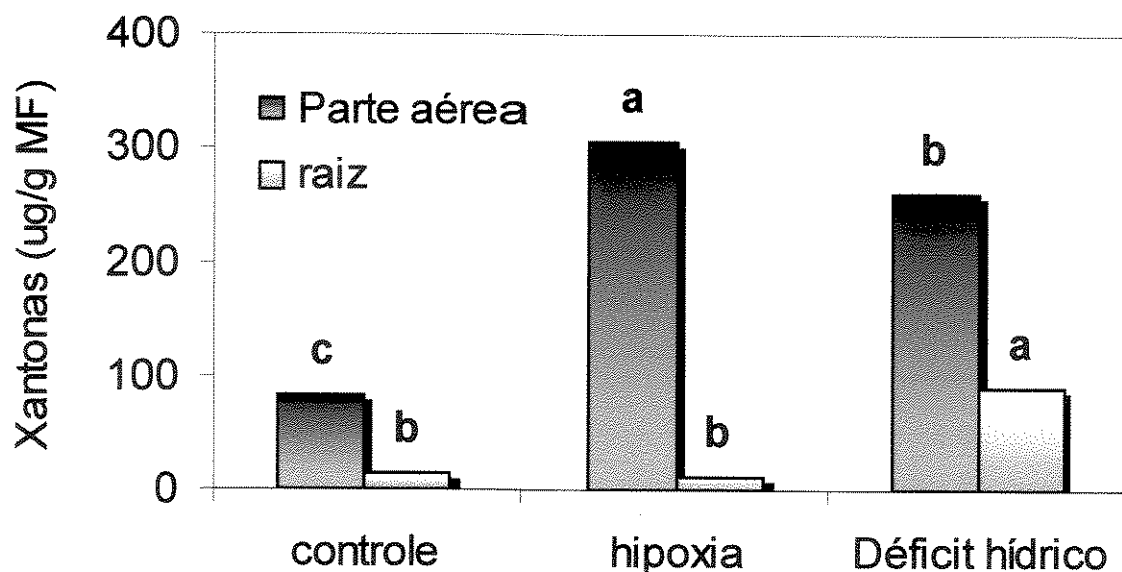


Figura 28. Teores de xantonas na parte aérea e raiz de plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada órgão.

Tanto os resultados de acilfloroglucinol como os de xantona estão coerentes com os de fenóis totais (figura 25A), onde foram verificados maiores teores na parte aérea das plantas submetidas a hipoxia e déficit hídrico e nas raízes de plantas mantidas em déficit hídrico.

Quercetina e rutina foram detectadas nos extratos da parte aérea em diclorometano e metanol, sendo os valores somados e apresentados na figura 29. O metanol demonstrou ser o melhor extrator. Os valores encontrados nos extratos radiculares continham valores inferiores a 0,001 mg/g e, portanto não são apresentados.

As plantas mantidas sob déficit hídrico apresentaram maior conteúdo de quercetina. No entanto, houve redução do composto nas plantas mantidas em hipoxia, quando comparado com as plantas controle. A produção de rutina, que

diferencia-se da quercetina apenas por um radical de glicose e ramnose no carbono 3, foi superior em condições de hipoxia.

Na figura 29, verifica-se que há evidente relação inversa entre os conteúdos de quercetina e rutina, nas plantas controle e em hipoxia.

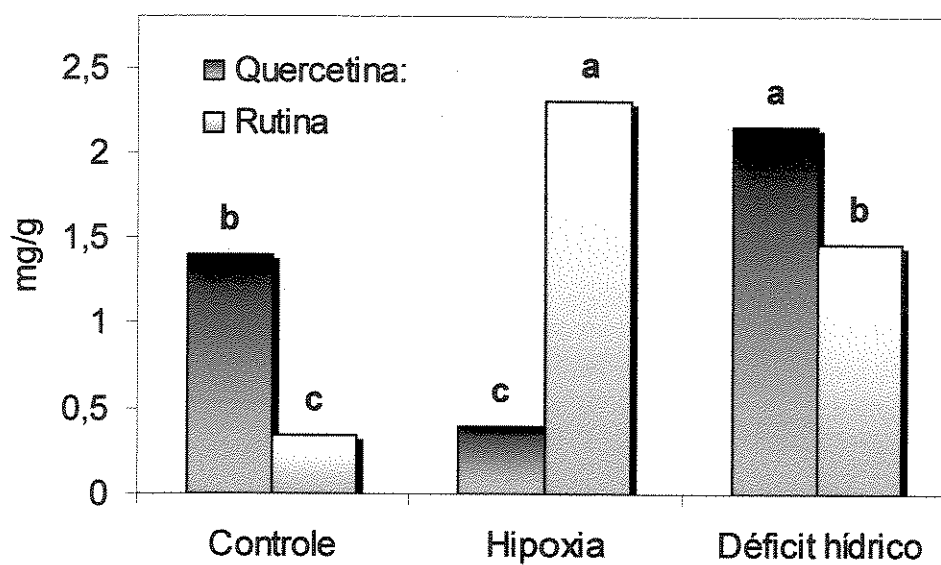


Figura 29. Produção de quercetina e rutina na parte aérea de plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada substância analisada.

Os dados das figuras 27, 28 e 29 foram agrupados e apresentados na figura 30, confrontando com os dados de massa fresca da planta inteira (parte aérea e raiz). A produção de compostos fenólicos (xantona, acilfloroglucinol, quercetina e rutina) apresentou correlação inversa com o crescimento da planta, com $r = -0,96$.

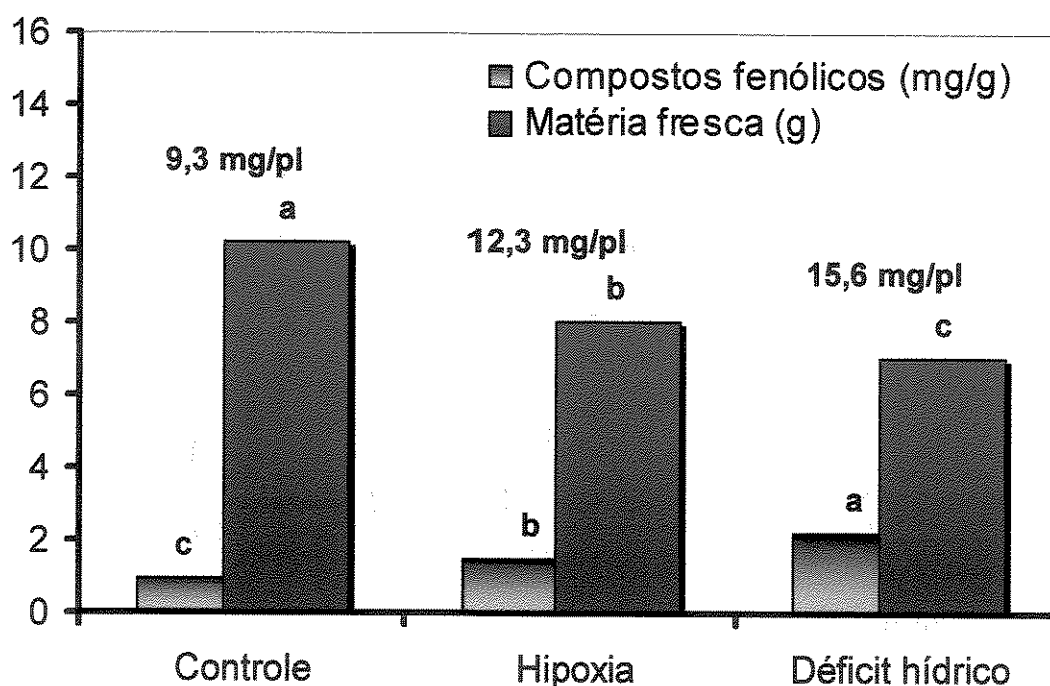


Figura 30. Teor (mg/g) e conteúdo (mg/planta) de compostos fenólicos totais (xantonas, acilfloroglucinol, quercetinas e rutina) e massa fresca da planta inteira (parte aérea e raiz) de plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada parâmetro analisado.

O ácido betulínico foi detectado tanto no extrato em éter de petróleo como em diclorometano. Assim, os valores foram somados e analisados estatisticamente.

Na figura 31, é apresentado o conteúdo de ácido betulínico nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Verificou-se que, tanto na parte aérea como na raiz, houve aumento na produção do triterpeno em relação às plantas controle. Entretanto, não observou-se diferença estatística entre os tratamentos de hipoxia e déficit hídrico na parte aérea ou raiz.

A partir da figura 32 verifica-se que houve correlação inversa ($r = -0,99$) entre a produção total do triterpeno e o ganho de massa fresca total das plantas, comportamento semelhante à produção de compostos fenólicos totais.

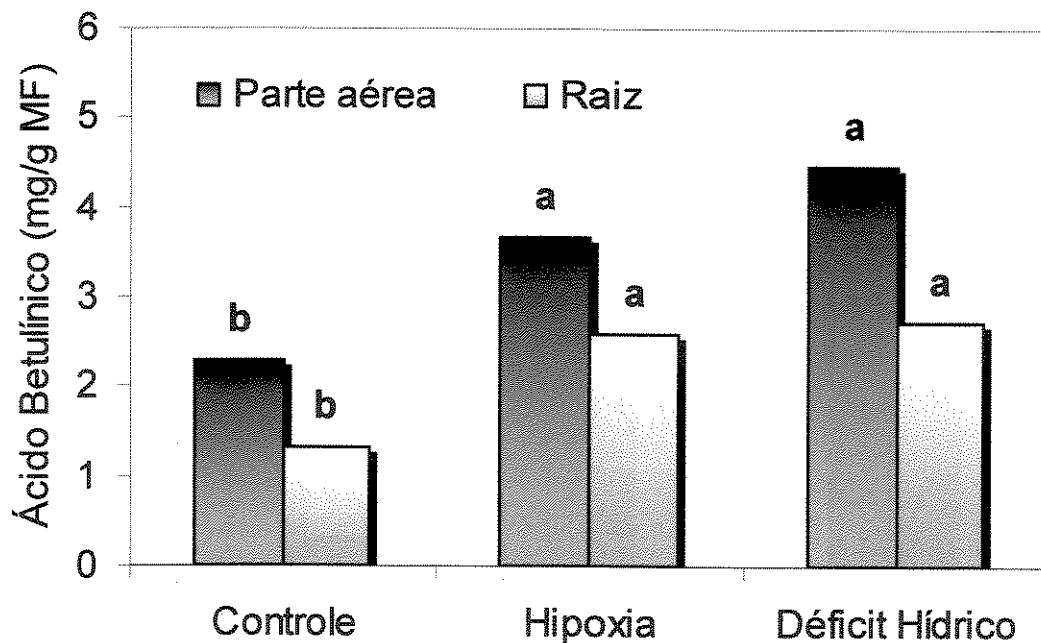


Figura 31. Teor de ácido betulínico na parte aérea e raiz de plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico, durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada órgão analisado.

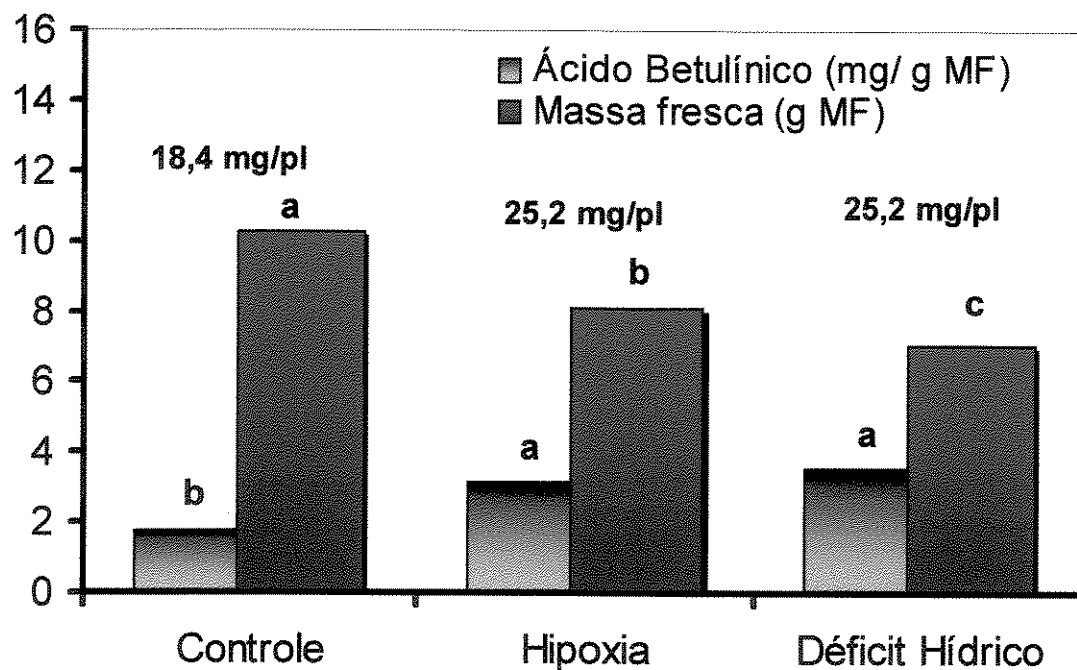


Figura 32. Teor total (mg/g) e conteúdo (mg/planta) de ácido betulínico e massa fresca (parte aérea e raiz) de plantas de *H. brasiliense* submetidas a estresse hídrico durante 15 dias. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo Teste Tukey, para cada parâmetro analisado.

5. DISCUSSÃO

5.1. Fitoquímica:

5.1.1. Fração 67/96F3.2: isouliginosina B

A substância apresentou-se como sólido amarelo amorfo. O espectro no UV demonstrou bandas em 226 e 270 nm.

O espectro de massas com impacto eletrônico apresentou íon molecular de m/z 498.1424, consistente com a fórmula molecular $C_{28}H_{34}O_8$. O pico base foi de m/z 247.0 o qual corresponde a $C_{14}H_{15}O_4$.

O espectro no infravermelho apresentou bandas típicas de estiramento de grupos hidroxílicos (3258 cm^{-1}), carbonílicos (1642 e 1604 cm^{-1}), de ligação $C=O$, devido à presença de insaturações α ($1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$), estiramentos de ligações $C-O$ ($1000-1200\text{ cm}^{-1}$), duplas ligações em sistemas aromáticos (1604 e 1383 cm^{-1}) e de $C-H$ metílicos e metilênicos (2974 , 2930 e 2871 cm^{-1}).

O espectro de ressonância magnética nuclear de H^1 apresentou diversos sinais entre δ 0,88 – 1,59 que foram atribuídos a grupos metílicos, em δ 3,54 verificou-se um sinal correspondente a dois hidrogênios. Os dois sinais duplos em δ 5,45 (J 10 Hz) e δ 6,75 (J 10 Hz) estão acoplados entre si, fato confirmado no mapa de contorno de RMN de 2D (Cosy) pela correlação entre os dois sinais.

Os deslocamentos do espectro de RMN de C^{13} foram comparados com o espectro de Dept 90 e 135°C e com os espectros de RMN bidimensional entre H^1 e C^{13} , os quais foram comparados com a literatura, verificando-se que a substância isolada é um acilfloroglucinol, que já havia sido isolada anteriormente, sendo

denominada Isouliginosina B (Rocha *et al.*, 1995). A figura 33 representa os deslocamentos de RMN de C^{13} na molécula de Isouliginosina B de *H. brasiliense*.

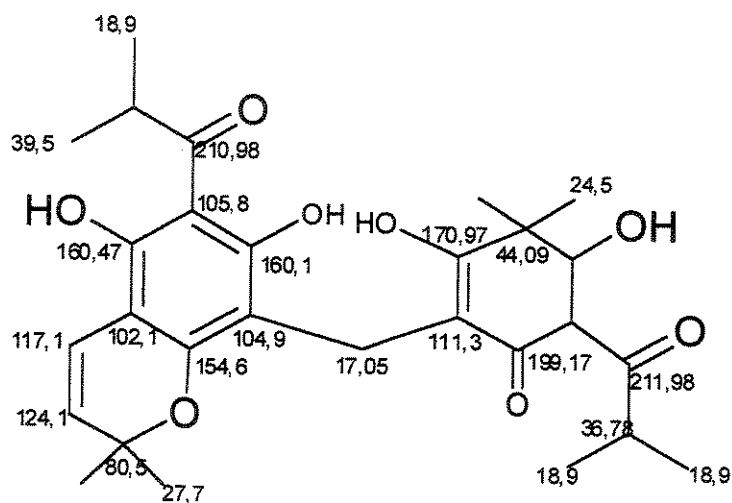


Figura 33. Atribuição do deslocamento de C^{13} na molécula de Isouliginosina B de *H. brasiliense*.

5.1.2. F8 RES: ácido betulínico

O espectro de massas com impacto eletrônico apresentou ion molecular de m/z 456, consistente com a fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. O pico base foi de m/z 189,0752.

O espectro no infravermelho apresentou bandas típicas de estiramento de grupos hidroxílicos (3429 cm^{-1}), carbonílicos (2939 e 2872 cm^{-1}) e de duplas ligações (1653 cm^{-1}).

A substância apresentou um espectro no UV com bandas em 195 e 300 nm.

O espectro de RMN de H^1 , da substância dissolvida em acetona deuterada apresentou sinais entre δ 0,71 e 1,24 que foram atribuídos a grupos metílicos, de δ 1,65 a 2,22 atribuídos a anéis alifáticos e δ 4,24 a 4,59 a grupos metilênicos e em δ

4,67 a grupo isopropenil, os quais foram comparados com os dados da literatura (Galgon *et al.*, 1999).

O espectro de RMN de C^{13} realizado em clorofórmio deuterado demonstrou sinais do grupo isopropenil em δ 150,0 e 108,76 (contendo dupla ligação) e δ 18,59 atribuído ao grupamento metila, carboxílico em δ 178,75 e carbono hidroxilado em δ 77,78. Os dados foram confirmados pelo espectro de Dept (90 e 135°) e comparado com os dados da literatura (Oliveira *et al.*, 2002), de onde foi possível a confirmação de que a substância isolada é o ácido betulínico (figura 34).

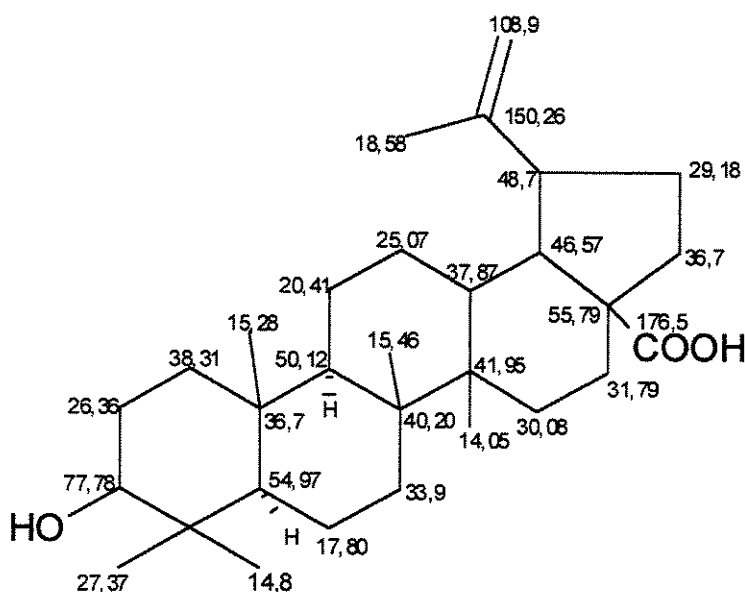


Figura 34. Atribuição dos deslocamentos de C^{13} na molécula de ácido betulínico de *H. brasiliense*

5.1.3. F 8.4

A substância apresentou ausência de cor. O espectro no UV demonstrou bandas em 202, 224 e 252 nm.

O espectro de massas com impacto eletrônico apresentou íon molecular de m/z 296 consistente com a fórmula molecular de $C_{17}H_{11}O_5$. O pico base dos

fragmentos obtidos no espectro de massas demonstrou ser de m/z 228, o qual é consistente com a fórmula molecular $C_{13}H_8O_4$, semelhante à da xantona 1,5-diidroxixantona de *H. brasiliense* (Rocha *et al.*, 1994). O padrão de fragmentação dessa molécula foi então comparado com os fragmentos obtidos no espectro de massas da substância F8.4 (anexo 11), onde verificou-se que eram idênticos. Entretanto, a molécula isolada apresentou massa adicional de m/z 68, o qual poderia ser consistente com C_4H_3O .

Portanto, pode-se concluir que a xantona isolada apresenta a estrutura básica da molécula de 1,5-diidroxixantona, com outros radicais adicionais não identificados (figura 35).

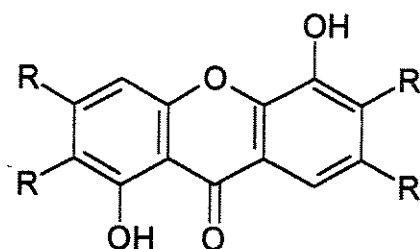


Figura 35. Estrutura da 1,5-Diidroxixantona de *H. brasiliense*, com possíveis radicais adicionais não identificados.

Os espectros obtidos não permitiram a elucidação da estrutura dessa substância; entretanto, como o principal objetivo do presente trabalho era o estudo da regulação da via metabólica de diferentes classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico, a confirmação de que a substância isolada pertencia à classe de xantonas foi suficiente para decidirmos pela continuidade dos estudos.

5.2. Caracterização dos metabólitos secundários nos diferentes estádios de desenvolvimento e partes das plantas.

Os melhores extratos para o isolamento de xantonas são os obtidos a partir de raízes (Chang *et al.*, 1995; Ioset *et al.*, 1998); no entanto, não há dados na literatura referentes à produção destas substâncias em raízes de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento. Também, além dos trabalhos fitoquímicos, não há estudos em plantas pertencentes ao gênero *Hypericum*, utilizando raízes para o estudo da regulação de metabólitos secundários.

Xantonas de *H. perforatum*, atuam na atividade antidepressiva, através da ação nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Muruganandam *et al.*, 2000), mas mesmo tendo a sua importância farmacológica comprovada, estas ainda não foram estudadas com relação à produção nas diferentes partes da planta ou estádios de desenvolvimento. Porém, já foi verificado que a produção de hipericina varia durante as diferentes estações do ano, sendo maior nos meses do verão e concentram-se prioritariamente nas flores (Southwell & Bourk, 2001).

Em plantas de *H. perforatum* também foi verificada correlação inversa entre os conteúdos de rutina e quercetina (Buter *et al.*, 1998), uma vez que a formação de rutina ocorre a partir da quercetina (Harborne, 1989).

H. brasiliense é fotoperiódica, uma vez que floresce sob condições de dias longos, mais precisamente entre dezembro e março. A produção de compostos fenólicos totais foi muito superior nesta fase, quando comparado com os demais estádios de desenvolvimento.

Durante o ciclo de vida das plantas, as células continuamente respondem a sinais (internos e externos) que alteram a sua fisiologia, morfologia e

desenvolvimento. As respostas das plantas a estes estímulos são modulados pela idade, época do ano, número de horas de luz durante o dia, etc (Buchanan *et al.*, 2000).

O florescimento é o melhor exemplo das mudanças no desenvolvimento programado de plantas superiores. Tais mudanças não envolvem apenas a formação do meristema floral, mas muitas outras estruturais e fisiológicas, passando da fase de juvenilidade para a reprodutiva (Fosket, 1994).

O fitocromo é conhecido por ser o pigmento receptor da sinalização do fotoperíodo para controlar o florescimento. O sinal fotoperiódico é recebido pelas folhas e transferido para o meristema apical, onde inicia o processo de estímulo ou inibição da diferenciação do meristema vegetativo para o reprodutivo (Fosket, 1994).

Uma vez desencadeado o processo a luz, absorvida pelas folhas verdes, promove a atividade dreno na corola, proporcionando crescimento da estrutura floral e pigmentação (Lingakumar & Kulandaivelu, 1993; Moscovici *et al.*, 1996), processo que seria mediado pelo fitocromo, em conjunto com hormônios endógenos; como resultado do processo verifica-se aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia liase e chalcone sintase (Beggs *et al.*, 1987) e aumentos dos produtos finais relacionados, como antocianinas, quercetina e qualquer outra substância que seja produzida por essas vias.

Tal elevação na atividade metabólica das plantas de *H. brasiliense* por ocasião do florescimento poderia proporcionar a produção de acilfloroglucinol em quantidades muito superiores, cerca de quatorze vezes mais, quando comparado com plantas em estágio vegetativo. Tais plantas apresentaram maior massa do sistema radicular, o que não é uma ocorrência comum, dado que quando em

floração, as plantas paralisam o seu crescimento para priorizar os processos de desenvolvimento do órgão floral (Fosket, 1994).

De maneira geral, os floroglucínóis atuam sinergisticamente com auxinas, através da inibição das AIA-oxidases, na formação de raízes adventícias e brotações laterais (Nandi *et al.*, 1996; Kooi *et al.*, 1999). Portanto, cabe a questão: a elevação da produção de massa radicular (dados não apresentados) no estágio de florescimento foi consequência do acúmulo dessa substância?

Durante a fase de frutificação o fruto atua como um dreno, re-direcionando o fluxo de carbono para a formação da semente, principalmente para a síntese de compostos de reserva (Buchanan *et al.*, 2000). Nesta fase, as plantas cessam o crescimento e apresentam atividade metabólica reduzida. Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram obtidos quando plantas de *H. perforatum* encontravam-se em estágio de frutificação, onde houve queda significativa na produção de compostos fenólicos, quando comparado com plantas em floração (Pietta *et al.*, 2001). Resultados semelhantes também foram obtidos por Tekel'ová *et al.* (2000), que verificou queda na produção (10 vezes) de quercetina em frutos quando comparados com flores de *H. perforatum*.

Entretanto, a fase de frutificação de *H. brasiliense* proporcionou maior acúmulo de ácido betulínico, obtendo-se quantidades semelhantes às encontradas na cortiça de *Platanus acerifolia* e superiores às encontradas na casca de *Betula pendula* (Galgon *et al.*, 1999). Os resultados não puderam ser comparados com outras espécies de *Hypericum*, uma vez que ainda não foi realizado este tipo de estudo no gênero.

A elevada produção de compostos fenólicos totais nas plantas floridas se deve ao elevado teor de acilfloruglinol nas raízes; portanto, quando o interesse for a

produção desta substância, a melhor época para coleta é a de floração e utilizando as raízes. Por outro lado, quando o interesse for xantona, pode-se utilizar as partes apicais de plantas em estágio de frutificação ou a planta inteira nos estádios vegetativos e em florescimento.

Quando em estágio vegetativo, as plantas apresentaram ampla distribuição dos diferentes metabólitos em todas as suas partes porém, em quantidades inferiores às encontradas durante a floração. Apesar disso, a fase vegetativa poderia ser utilizada para o estudo dos compostos fenólicos analisados, com a vantagem de poder ser realizada durante o ano todo.

A caracterização da produção de metabólitos secundários nos diferentes estádios de desenvolvimento, bem como a localização na planta, é de extrema importância, uma vez que já foi verificado em diversos trabalhos que a composição dos fitoterápicos de *H. perforatum*, encontrados no mercado, varia muito (Wills *et al.*, 2000; Bergonzi *et al.*, 2001). De fato, os resultados deste trabalho mostraram que a fase de crescimento, bem como as diferentes partes de plantas de *H. brasiliense* interferem muito na quantidade dos metabólitos de interesse.

5.3. Estresse de temperatura

5.3.1. Indução de estresse

Exposições a baixas temperaturas desencadeiam mudanças bioquímicas e fisiológicas nas plantas, como forma de ajuste do metabolismo para condições adversas (Zhang *et al.*, 1997). Plantas cultivadas em condições de baixa temperatura podem exibir perda de vigor e redução no crescimento, mudanças na estrutura e composição das membranas e parede celular (Zabotin *et al.*, 1998). Além de afetar o

metabolismo como um todo, exposições a baixas temperaturas podem afetar as etapas fotoquímicas da fotossíntese (Oquist, 1983).

A eficiência na captura, transferência e utilização de energia luminosa nas reações fotoquímicas do PSII, requer uma seqüência de eventos fotoquímicos, bioquímicos e biofísicos. Estes em última análise dependem da energia, para a síntese de compostos constitutivos (proteínas), metabólicos (enzimas) e estruturais, como as membranas dos tilacóides. Dessa forma, a manutenção da estrutura do aparelho fotossintético depende energia, sendo indiretamente afetada pela queda no metabolismo causada pela temperatura de resfriamento (Wang & Camp, 2000).

Segundo Oliveira (2000), alguns efeitos de danos causados pela baixa temperatura só se manifestam quando as plantas retornam a temperaturas acima da temperatura de resfriamento. Isso pôde ser observado nos resultados obtidos no presente trabalho, onde foi verificada queda na eficiência quântica do PSII nas plantas mantidas em temperatura noturna de 10°C e durante o dia expostas a temperaturas de 30°C (ambiente). Sendo que, nas plantas mantidas em temperatura constante de 17°C não foi possível detectar danos causados no aparato fotossintético.

Baixas temperaturas também podem causar danos irreversíveis, durante o ajuste metabólico, que podem ser mediados por espécies reativas de O₂ (Janas *et al.*, 2000). As cadeias de ácidos graxos das membranas das organelas celulares são altamente vulneráveis à peroxidação lipídica. A degradação de ácidos graxos poli-insaturados pela peroxidação produz íons peróxido e malondialdeído (MDA), induzindo um aumento na rigidez das membranas. Aumentos excessivos dessa rigidez podem ocasionar a morte das células (McKersie & Leshem, 1994). A

peroxidação lipídica, caracterizada pelo acúmulo de MDA, em consequência do acúmulo de espécies reativas de O_2 , foi superior nas plantas crescidas em ambiente com temperatura constante de $17^{\circ}C$, sendo que nos demais tratamentos os conteúdos foram semelhantes ao controle.

Em altas temperaturas é comum a ocorrência de sintomas morfológicos e ontogênicos, como aceleração do desenvolvimento e redução no tamanho das folhas (Paolacci *et al.*, 1997). As plantas mantidas a $30^{\circ}C$ noturno apresentaram maior ganho de massa fresca em relação aos demais tratamentos, sendo que ao final do experimento iniciou-se o processo de floração. Resultados semelhantes não foram obtidos a $36^{\circ}C$, uma vez que a produção de massa fresca foi inferior às plantas controle. Isso talvez tenha ocorrido porque estas plantas encontravam-se em condição de estresse.

Altas temperaturas afetam a integridade da membrana plasmática e causam desnaturação térmica de enzimas, afetando a fotossíntese, principalmente em espécies C_3 . Além disso, aumentam a atividade oxigenase da Rubisco, favorecendo a fotorrespiração (Conroy *et al.*, 1994). Dessa forma, a partir da glicolato oxidase ocorre a produção de H_2O_2 , espécie reativa de oxigênio, produzida no peroxissoma, que pode ser potencialmente tóxica para as células. Em condições de estresse as enzimas catalase e ascorbato peroxidase, podem ter a sua atividade reduzida e não quebrar a molécula de H_2O_2 , ocorrendo como consequência danos nas membranas celulares. O acúmulo de H_2O_2 pode estimular a produção de substâncias com funções antioxidantes, como alguns flavonóides (Paolacci *et al.*, 1997; Jiang & Huang, 2001).

Baixas temperaturas podem ocasionar decréscimo no conteúdo de água e mudanças estruturais nas folhas. Wanner & Juntilla (1999) demonstraram que a produção de prolina não tem função específica no aumento da tolerância às baixas temperaturas, mas poderia ser importante no ajuste do metabolismo ao estresse hídrico induzido pelas baixas temperaturas. Steponkus (1984) relatou que baixas temperaturas podem resultar no acúmulo de substâncias tóxicas de metabólitos da respiração anaeróbica, como etanol, CO₂ e ácido láctico, tornando o pH citossólico ácido.

Em muitas plantas, o acúmulo de prolina livre ocorre em resposta à imposição de estresses ambientais, como déficit hídrico, salinização, altas e baixas temperaturas, etc (Draper, 1972; Heuer, 1994; Werner & Finkelstein, 1995; Chang & Lee, 1999). O acúmulo de prolina muitas vezes é gerado de forma a reduzir a acidificação celular ocasionada por condições de estresse. Grande síntese de prolina durante uma condição de estresse poderia manter a razão NAD(P)⁺/NADPH, em valores compatíveis com o metabolismo em condições normais (Hare & Cress, 1997). Aumento na razão NADP⁺/NADPH durante a síntese de prolina pode resultar no aumento da atividade da via das pentoses-fosfato, a qual fornece importantes intermediários para a síntese de metabólitos secundários (Kohl *et al.*, 1990).

Neste trabalho, a produção de prolina aumentou significativamente quando a temperatura noturna foi de 10°C e em temperatura constante de 17 e 36°C. Coincidentemente, nestes mesmos tratamentos observou-se os maiores conteúdos de fenóis solúveis totais. Resultados semelhantes foram encontrados por Sahai & Shuler (1984) e Janas *et al.* (2000).

Embora as plantas mantidas na temperatura constante de 36°C não tenham apresentado elevadas concentrações de MDA, elas apresentaram aumento no conteúdo de prolina e redução no ganho de massa fresca e, portanto, podem ter entrado em estresse. Resultados semelhantes foram encontrados por Chang & Lee (1999), que verificaram correlação inversa entre crescimento e acúmulo de prolina em plantas de *G. tenuistipitata*.

5.3.2. Produção de compostos fenólicos e ácido betulínico

Santis *et al.* (1999) demonstraram que algumas espécies são tolerantes a extremos de temperatura quando adquirem capacidade para aumentar a síntese de enzimas antioxidantes, como a peróxido dismutase, catalase e peroxidases. Estes mecanismos previnem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Prasad, 1996). Entretanto, outras espécies intensificam a produção de compostos antioxidantes, como antocianinas, quercetina e rutina (Grace *et al.*, 1998; Close *et al.*, 2000).

Tem sido proposto que as antocianinas atuam como pigmento fotoprotetor nos tecidos vegetais e acumulam-se em resposta a baixas temperaturas (Rabino & Mancinelli, 1986; Zhang *et al.*, 1997). Levy *et al.* (1995) realizaram estudos sobre a regulação da biossíntese de antocianinas durante a adaptação metabólica em baixas temperaturas, verificando que o processo é dependente de luz. Isto poderia ser explicado pelo fato de que as antocianinas são produzidas para atenuar a qualidade e quantidade de luz capturada pelas clorofilas e carotenóides (Feild *et al.*, 2001).

A radiação fotossinteticamente ativa na casa de vegetação e nas câmaras de crescimento com temperatura e luz controladas foi de 1000 a 1500 e 20 a 30 μmoles fótons/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$, respectivamente. Portanto, os resultados do presente trabalho

demonstram que a produção de antocianina e xantona foi dependente da intensidade luminosa, uma vez que em condições de baixa intensidade luminosa, a produção de antocianinas não aumentou, independente da temperatura, e a produção de xantonas, nestas condições de luminosidade, praticamente foi inexistente nas plantas controle.

Há autores que relatam que a produção de antocianinas não faz parte do desenvolvimento programado dos tecidos fotossintéticos, mas a produção dessas substâncias ou a expressão das enzimas regulatórias da sua biossíntese são conhecidas por serem reguladas pela alta intensidade luminosa ou tratamentos que limitem a utilização da energia fotoquímica, sugerindo que as antocianinas podem ter uma função na proteção das plantas contra o excesso de luz (Christie *et al.*, 1994; Nooden *et al.*, 1996; Chalker-Scott, 1999).

As enzimas chave da via dos fenilpropanóides, a fenilalanina amônia liase e chalcona sintase, tem sido descritas por responderem a vários tipos de estímulos ambientais (Davies & Ausubel, 1989; Kubasek *et al.*, 1992). Levy *et al.* (1995) verificaram que o aumento da atividade dessas enzimas ocorria em baixas temperaturas, unicamente na presença de luz. Os resultados deste trabalho demonstram que as mesmas condições que permitiram a máxima produção de antocianinas, também promoveu a síntese de xantona. Apesar de não termos elementos para comprovar, é possível que os mesmos efeitos que a luz e temperatura têm sobre fenilalanina amônia liase e chalcona sintase, ocorram também sobre as enzimas da via biossintética de xantonas.

A produção de quercetina e rutina foi superior nas plantas mantidas a 10°C, demonstrando que estas substâncias podem ter sido produzidas em consequência do estímulo inicial realizado sobre as enzimas chave da via dos fenilpropanóides. O

mesmo pôde ser verificado nas plantas mantidas em temperatura constante de 36°C, que tiveram maior produção de rutina. Segundo Schindler & Lichtenthaler (1994), a síntese de metabólitos cloroplastídicos poderia atuar como uma proteção contra a formação de radicais livres e, consequentemente, peroxidação lipídica. A rutina, que é metabolizada nos cloroplastos, pode ter sido sintetizada em resposta à produção de H₂O₂, durante a fotorrespiração, que normalmente é mais acentuada em plantas C3 crescendo em altas temperaturas, como foi o caso das plantas de *H. brasiliense* mantidas a 36 °C. Pelas mesmas razões, pode ter ocorrido maior acúmulo de ácido betulínico nas plantas mantidas neste tratamento, uma vez que tem sido relatado que o isopreno muitas vezes é sintetizado para proteger a célula contra o estresse oxidativo, através da síntese de IPP no cloroplasto e posterior transporte para o citossol, o qual pode ser metabolizado em moléculas maiores como os triterpenos (Lichtenthaler, 1999).

Em condições de baixa intensidade luminosa, as plantas mantidas a 17 °C apresentaram maior conteúdo de ácido betulínico do que as plantas controle. Nakamura *et al.* (2001) já haviam demonstrado que em condições de baixas temperaturas ocorria um aumento na expressão de mRNA de IPP isomerase citossólica, justificando os resultados obtidos no presente trabalho.

A partir dos resultados observados no presente trabalho pode-se concluir que os compostos fenólicos responderam positivamente aos tratamentos de baixa temperatura. Entretanto, a produção de quercetina, seguida de rutina, respondeu positivamente à imposição de altas temperaturas, sob baixa intensidade luminosa, como forma de amenizar possíveis danos causados pelo estresse.

Em condições de baixa intensidade luminosa, tanto a baixa como a alta temperatura proporcionaram aumentos na produção de ácido betulínico.

5.4. Estresse hídrico

5.4.1. Déficit hídrico

Em condição de déficit hídrico, houve acúmulo de MDA na parte aérea em relação às plantas controle entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Talvez isto tenha ocorrido, porque a técnica utilizada para induzir gradativamente o estresse hídrico, não foi tão drástica ao metabolismo da planta, não havendo tempo hábil para a ocorrência do estresse oxidativo e conseqüente acúmulo de MDA. Em outras espécies, a retirada repentina do fornecimento de água levou ao acúmulo significativo de MDA (Rensburg & Kruger, 1994; Jiang & Huang, 2001).

Com relação ao acúmulo de prolina, que também tem sido um parâmetro utilizado para caracterizar a condição de déficit hídrico (Heuer, 1994), não houve diferença estatística entre plantas controle e estressadas, resultados que diferem dos encontrados em outras espécies (Alexieva *et al.*, 2001). Novamente, pode ser que a retirada gradual de água tenha influenciado no resultado.

Entretanto, a grande queda do potencial hídrico da parte aérea permite concluir que as plantas entraram em estresse pelo déficit hídrico, uma vez que chegou a ser o dobro dos valores encontrados nas plantas controle, e ao final do experimento estas apresentaram início de murcha no ápice.

A produção de antocianina não diferiu e a de fenóis totais foi superior aos valores encontrados nas plantas controle. Resultados semelhantes aos nossos foram

encontrados por Alexieva *et al.* (2001), quando submeteu ervilha e trigo a déficit hídrico; nas mesmas espécies também foram verificados menores ganhos de massa fresca.

5.4.2. Hipoxia

Em condições de deficiência de O₂, a glicólise e a fermentação láctica ou alcóolica podem ser as únicas formas de produção de energia nas células vegetais. A produção de lactato, seguida de etanol favorece o abaixamento do pH citossólico, sendo que o lactato pode ser armazenado no vacúolo ou ser liberado para o meio (Souza, 2001).

A síntese de prolina, é conhecida por estar relacionada com o abaixamento de pH citossólico, sob condições de estresses severos (Kurkdjan & Guern, 1989). O acúmulo de prolina, nas plantas em hipoxia, pode ter ocorrido como forma de amenizar os danos causados pela falta de O₂. Tais resultados podem ser comparados com os obtidos por Elhaak *et al.* (1993).

Um dos principais parâmetros que afeta a coloração das flores e tecidos vegetais é o pH vacuolar, que é regulado por fatores genéticos e ambientais, podendo variar de 2,8 a 5,5, sendo que nestas condições a síntese de antocianinas é muito favorecida (Cooper – Driver, 2001; Farzad *et al.*, 2002).

Atividade antioxidante tem sido atribuída às antocianinas, devido à sua ação no seqüestro de peróxido de hidrogênio e outras formas de radicais livres (Cooper-Driver & Bhattacharya, 1998). A produção do sistema antocianina – peroxidase no vacúolo pode contribuir para o mecanismo de proteção das plantas contra danos oxidativos (Yamasaki, 1997).

As plantas mantidas em condição de alagamento apresentaram acúmulo de MDA, sugerindo a ocorrência de elevada peroxidação lipídica nas membranas. Resultados semelhantes foram encontrados em outras espécies (Hurng & Kao, 1994; Kalashnikov *et al.*, 1994; Bennicelli *et al.*, 1998; Blokhina *et al.*, 2001). Nas mesmas plantas, também observou-se elevada concentração de antocianinas, quando comparadas com as plantas controle, sugerindo que a síntese deste flavonóide pode ter ocorrido como um mecanismo de defesa das plantas contra o estresse oxidativo, gerado pela deficiência de O₂.

5.4.3. Produção de compostos fenólicos e ácido betulínico

Em plantas de tabaco, a hipoxia proporcionou aumento no conteúdo de fenóis totais em relação às plantas controle (Hurng & Kao, 1994), resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

A produção de compostos fenólicos, geralmente é regulada por fatores ambientais e genéticos, uma vez que estão envolvidos em muitas interações de origem biótica e abiótica das plantas: patógenos, alta luminosidade, UV, baixas temperaturas, herbicidas, etc (Weidner *et al.*, 2000).

Muitas plantas superiores respondem a vários estímulos ambientais, pela ativação de vias de síntese de metabólitos secundários, como a via dos compostos fenólicos. Geralmente em condições de estresse, há aumento na transcrição de genes que codificam as correspondentes enzimas biossintéticas, resultando no aumento dos produtos finais (Estrada *et al.*, 1999).

O estresse hídrico tem um grande efeito no metabolismo das plantas, ocasionando aumento de muitos metabólitos secundários, pelo re-direcionamento de carbono, devido à redução no crescimento (Herms & Mattson, 1992). Isto foi

observado neste trabalho, em relação à produção de compostos fenólicos e ácido betulínico.

Em condições de déficit hídrico, verificou-se aumento na produção de todos os metabólitos estudados em relação às plantas controle, demonstrando que a metodologia utilizada foi eficiente para ajustar o metabolismo das plantas à síntese destes compostos. Houve acúmulo de quercetina e rutina em proporções superiores aos de xantonas e acilfloroglucinol, demonstrando que pode ter ocorrido um particionamento de carbono entre as diferentes vias. Este particionamento também foi verificado em condições de hipoxia, entre antocianinas, xantona e quercetina. O mesmo foi verificado em relação à produção de ácido betulínico, que foi superior em condições de déficit hídrico, uma vez que pode ter sido um reflexo do “status” fotossintético em que as plantas se encontravam, uma vez que o isopreno pode ser sintetizado como forma de amenizar danos causados pelo estresse oxidativo das células (Niyogi *et al.*, 1997).

Diversos compostos, como os ácidos fenólicos, geralmente ocorrem na forma conjugada e os níveis de formas livres nos tecidos são estritamente controlados, demonstrando que eles convertem-se de um tipo para outro durante os diferentes processos fisiológicos (Weidner *et al.*, 2000). O mesmo foi verificado entre a síntese de quercetina e rutina, onde foi constatada a ocorrência de uma correlação inversa entre as duas substâncias nas plantas controle e as mantidas em condição de hipoxia. Essa correlação também foi verificada em plantas de *H. perforatum* (Buter, 1998).

Apesar dos conteúdos de acilfloroglucinol e xantona terem sido proporcionalmente menores aos de quercetina e rutina, verifica-se que são substâncias que responderam aos tratamentos impostos, demonstrando que as vias

de síntese dos diferentes compostos fenólicos respondem positivamente aos tratamentos de estresse hídrico, seja por hipoxia ou falta de água.

Outros estudos já haviam demonstrado que o déficit hídrico ocasiona aumento da síntese de IPP, com resultante síntese de ácido abscísico, carotenóides e xantofilas (Milborrow, 2001). No entanto, até o momento não há trabalhos sobre a produção de triterpenos em condições de estresse hídrico. Dessa forma, é possível utilizar os resultados obtidos em plantas de *H. brasiliense*, quando em condição de estresse hídrico, como um modelo para estudos da regulação de compostos fenólicos e ácido betulínico em outras espécies de *Hypericum*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akihisa, T.; Ogihara, J.; Kato, J.; Yasukawa, K.; Ukiya, M.; Yamanouchi, S.; Oishi, K., 2001. Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus – 1 reverse transcriptase. *Lipids*, 5(36): 507 – 512.
- Alexieva, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24(12): 1337-1344.
- Aviram, M.; Fuhrman, B., 2002. Wine Flavonoids Protect against LDL Oxidation and Atherosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 957: 146 – 161.
- Bates, L.S.; Waldren, R.P., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Beerhues, L.; Berger, U., 1995. Differential accumulation of xanthones in methyl – jasmonate treated and yeast extract treated cell cultures of *Centaureum erythraea* and *Centaureum littorale*. *Planta* 197 (4): 608-612.
- Beggs, C.J.; Huhn, K.; Bocker, R.; Wellmann, E., 1987. Phytochrome – induce flavonoid biosynthesis in mustard (*Sonapsis alba* L.) cotyledons. Enzymatic control and differencial regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* 172: 121 – 126.
- Beniston, R.G.; Morgan, I.M.; O'Brien, V.; Campo, M.S., 2001. Quercetin, E7 and p53 in papillomavirus oncogenic cell transformation. *Carcinogenesis* 22:1069 – 1076.
- Bennett, G.J. & Lee, H.H., 1988. The biosynthesis of mangostin - the origin of the xanthone skeleton. *J. Chem. Soc. Chem Comm.* 9:619-620.

- Bennicelli, R.P.; Stepniewski, W.; Zakrzhevsky, D.A., 1998. The effect of aeration on superoxide dismutase activity, malondialdehyde level, pigment content and stomatal diffusive resistance in maize seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 39 (3): 203-211.
- Bergonzi, M.C.; Bilia, A.R.; Gallori, S.; Guerrini, D.; Vincieri, F.F., 2001. Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 27 (6): 491-497.
- Bialczyk, J.; Lechowski, Z., 1999. Tannin concentration in water – stressed tomato seedlings. *Z. Pflanzenkr Pflanzensch.* 106(4): 372-379.
- Blokhina, O.B.; Chirkova, T.V.; Fagerstedt, K.V., 2001. Anoxic stress leads to hydrogen formation in plant cells. *J. Exp. Bot.* 52 (359): 1179-1190.
- Bowler, C.; Van Montagu, M.; Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiology.* 43: 83-116.
- Briskin, D.P.; Leroy, A.; Gawienowski, M., 2000. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. *Plant Physiol. Biochem.* 38(5): 413-420.
- Briskin, D.P.; Margaret, C.; Gawienowski, M., 2001. Defferential affects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 1075-1081.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L., 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland, 1367p.
- Buter, B.; Orlacchio, C.; Soldati, A.; Berger, K., 1998. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation on *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 64: 431-437.

- Chaitanya, K.V.; Sundar, D.; Reddy, A.R., 2001. Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. *Biol. Plant.* 44 (3): 379-384.
- Chalker – Scott, L., 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70(1): 1-9.
- Chang, C.H.; Lin, C.C.; Kadota, S., 1995. Flavonoids and a prenylated xanthone from *Cudrania-Cochinchinensis* var *Gerontogea*. *Phytochemistry* 40(3):945-947.
- Chang, Y.C.; Lee, T.M., 1999. High temperature – induced free proline accumulation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40(04):289-294.
- Choi, D.; Ward, B.L.; Bostock, R.M., 1992. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell.* 4 (10): 1333-1344.
- Chowdhury, S.R.; Choudhuri, M.A., 1985. Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Physiol. Plant.* 65:503-507.
- Christie, P.J.; Alfenito, M.R.; Walbot, V., 1994. Impact of low – temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways – enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194(4):541-549.
- Close, D.C.; Beadle, C.L.; Brown, P.H.; Holz, G.K., 2000. Cold-induced photoinhibition affects establishment of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. *Trees-Struct Funct.* 15 (1): 32-41.
- Conroy, J.P.; Seneweera, S.; Basra, A.S.; Rogers, G.; Nissenwooller, B., 1994. Influence of rising atmospheric CO₂ concentrations and temperature on growth, yield and grain quality of cereal. *Crops. Aust. J. Plant Physiol.* 21 (6): 741-758.

- Cooper-Driver, G.; Bhattacharya, M., 1998. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* 49:1165-1174.
- Cooper-Driver, G.A., 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* 56:229-236.
- Cordel, G.A., 2000. Biodiversity and drug discovery — a symbiotic relationship. *Phytochemistry* 55(6):463-480.
- Cortez, D.A.G.; Young, M.C.M.; Marston, A., 1998. Xanthonenes, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry* 47(7):1367-1374.
- Criddle, R.S.; Hansen, L.D., 1991. Metabolic-rate of barley root as a continuous function of temperature. *J. Plant Physiol.* 138 (4): 376-382.
- Davies, K.R.; Ausubel, F.M., 1989. Characterization of elicitor induced defence responses in suspension-cultured cells of *Arabidopsis*. *Mol. Plant- Microbe Interac.* 02:363-368.
- De Clercq, E., 2000. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal Res. Rev.* 20(5):323-349.
- Demmig-Adams, B.; Adams, W.W., 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1(1): 21-26.
- Dewick, P.M., 1997. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic Approach.*, Toronto, John Wiley & Sons. 466p.
- Dey, P.M.; Harborne, J.B., 1997. *Plant Biochemistry.* Academic Press, London, 554p.
- Di Carlo, G.; Borrelli, F.; Ernst, E.; Izzo, A.A., 2001. St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(6): 292-7.
- Dixon, R.A.; Paiva, N., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.

- Draper, S.R., 1972. Amino acid changes associated with low temperature treatment of *Iolium perenne*. *Phytochemistry* 11: 639-641.
- Edenharder, R.; Tang, X., 1997. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food Chem. Toxicol.* 35(3-4):357-372.
- El – Iklil, Y.; Karrou, M.; Mrabet, R.; Benichou, M., 2002. Salt stress on metabolite concentrations of *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon sheesmanii*. *Can. J. Plant Sci.* 82(1):177-183.
- Elhaak, M.A.; Eldin, A.S.; Sammour, R.H., 1993. Response of *Phragmites – australis* to water – stress from flooding to drought. *Pakistan J. Bot.* 25:41-46.
- Estrada, B.; Pomar, F.; Diaz, J.; Merino, F.; Bernal, M.A., 1999. Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply. *Sci. Horticul.* 81(4):385-396.
- Farzad, M.; Griesbach, R.; Weiss, M.R., 2002. Floral color change in *Viola cornuta* L. (Violaceae): a model system to study regulation of anthocyanin production. *Plant Sci.* 162:225-231.
- Feild, T; Lee, D.W.; Holbrook, N.M., 2001. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red – osier Dogwood. *Plant Physiol.* 127:566-574.
- Fitter, A.H.; Hay, R.K., 1981. *Environment physiology of plants*. Academic press, New York, 355p.
- Fosket, D.E. ed, 1994. *Plant Growth and development: a molecular approach*. San Diego – Academic Press. 580p.
- Foyer, C.H.; Leandais, M.; Kunert, K.J., 1994. Stress photooxidative in plants. *Physiol. Plant.* 92:696-717.

- França, S.C., 1999. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias bioativas. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento (Simões, C.M.O., eds), 2 ed, Ed. Da Universidade, 821p.
- Galgon, T.; Hoke, D.; Drager, B., 1999. Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochem. Anal.* 10:187-190.
- Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Bioch. Biophys. Act.* 990 (1): 87-92.
- Gershenzon, J., 1983. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. IN: *Phytochemical adaptations to stress*. vol.18, 334p.
- Grace, S.C.; Logan, B.A.; Adams, W.W., 1998. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antiosidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell Environ.* 21(5):513-521.
- Guha, S.; Chattopadhyay, U.; Ghosal, S., 1993. Activation of Peritoneal-Macrophages by Mangiferin, a naturally-occurring xanthone. *Phytother. Res.* 7(2):107-110.
- Hagerman, A.E., 1987. Phenolic Biosynthesis: pathways and regulation. In: Newman, D.W. e Wilson, K.G. *Models in plant physiology and biochemistry*, 425p.
- Hale, M.G.; Orcutt, D.M., 1987. *The Physiology of plants under stress*. John Wiley & Sons, New York, 205p.
- Hallgren, J.E.; Oquist, G., 1990. Adaptions to low temperature. In: *Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms*, Wiley – Liss, Inc., pp. 265-293.
- Harborne, J.B., 1989. *Methods in plant biochemistry*. Academic Press, London, vol 1, pp. 493-507.

- Harborne, J.B., 1983. Introduction to ecological biochemistry. 4ed, Academic Press, London, 316p.
- Hare, P.D.; Cress, W.A., 1997. Metabolic implications of stress – induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21:79-102.
- Haridas, V.; Higuchi, M.; Jayatilake, G.S., 2001. Avicins: Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10(98):5821 – 5826.
- Haslam, E., 1983. Naure's palette. *Chemistry in Britain.* 875-878.
- He, C.Y., Wang, W.Q.; Dongfang, Y.; Zhang, J.S.; Gai, J.Y.; Chen, S.Y., 2002. Transcription regulation of Soybean ribulose – 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene by external factors. *Chin. Sci. Bull.* 47(1):37-43.
- Herms, D.A.; Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Ver. Biol.* 67:283 – 335.
- Hess, S.C.; Brum, R.L.; Honda, N.K.; Cruz, A.B.; Moretto, E.; Cruz R.B.; Messana, I.; Ferrari, F.; Cechinel, V.; Yunes, R.A., 1995. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). *J. Ethnopharm.* 47(2):97-100.
- Heuer, B., 1994. Osmoregulatory role of proline in water and salt stressed plant. In: Pessarakli, M. *Handbook of plant and Crop stress.* Marcel Dekker, New York, pp.363 – 381.
- Hoch, W.A.; Zeldin, E.L.; McCown, B.H., 2001. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiol.* 21(1):1-8.
- Holz, J.; Demisch, L.; Gollnik, B., 1989. Investigations about antidepressant and mood changing effects of *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* 55:643.

- Hostettmann, K.; Hostettmann, M., 1989. Xanthones. In: Methods in plant biochemistry (J.B. Harborne). vol 1, pp. 493-507.
- Hostettmann, K.; Marston, A., 1994. Search for new antifungal compounds from higher plants, Pure & Appl. Chem. 66(10/11): 2231-2234.
- Hurng, W.P.; Kao, C.H., 1994. Effect of flooding on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism, the levels of antioxidants and lipid peroxidation in senescing tobacco leaves. Plant Growth Regul. 14:37-44.
- Inze, D.; Van Montagu, M., 1995. Oxidative stress in plants. Curr. Opin. Biotechnol. 6:153-158.
- Isoet, J.R.; Marston, A.; Gupta, M.P., 1998. Antifungal xanthones from roots of *Marila laxiflora*. Pharm Biol. 36(2):103-106.
- James, J.S., 2000. St. Johns's wort warning: do not combine with protease inhibitors, NNRTIs. AIDS treat News. 18(337):3 – 5.
- Janas, K.M.; Cvikrova, M.; Palagiewicz, A.; Eder, J., 2000. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. Plant Physiol. Biochem. 38:587-593.
- Jiang, Y.; Huang, B., 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season Turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Sci. 41:436-442.
- Kaehler, S.T.; Sinner, C.; Chatterjee, S.S.; Philippu, A., 1999. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. Neurosci Lett. 262(3):199-202.

- Kalashnikov, Y.E.; Kalakhinina, T.I.; Zakrzhevskiida., 1994. The effect of soil hypoxia on oxygen activation and the enzyme-system protecting barley roots and leaves against oxygen destruction. Russ. J. Plant Physiol. 41 (4): 512-516.
- Kim, D.O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y., 2002. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. J. Agric. Food Chem. 50(13):3713-7.
- Kinghorn, A.D.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R., 1998. Cancer chemopreventive agents discovered by activity-guided fractionation: A review. Curr. Org. Chem. 2(6):597-612.
- Kohl, D.H.; Lin, J.J.; Shearer, G.; Schubert, K.R., 1990. Activities of the pentose phosphate pathway and enzymes of proline metabolism in legume root nodules. Plant Physiol. 94: 1258-1264.
- Kooi, L.T.; Keng, C.L.; Hoe, C.T.K., 1999. In vitro rooting of sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. In Vitro Cell Dev-Pl. 35 (5): 396-400.
- Kramer, P.J.; Boyer, J.S., 1983. Water relations of plant and soils. Academic Press, San Diego, 495p.
- Kubasek, W.L.; Shirley, B.W.; Mckillop, A.; Goodman, H.M.; Briggs, W.; Ausubel, F.M., 1992. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. Plant Cell 4:1229-1236.
- Kurkdjan, A.; Guern, J., 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. Ann. Rev. Plant Physiol. 40:271-303.
- Kutchan, T.M., 1995. Alkaloids Biosynthesis – The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. Plant Cell. 7:1059-1070.

- Lafta, A.M.; Lorenzen, J.H., 1995. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. *Plant Physiol.* 109 (2): 637-643.
- Levy, A.; Jarillo, J.A.; Salinas, J.; Martinezzapater, J.M., 1995. Low-temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase messenger-rnas of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* 108(1):39-46.
- Lichtenthaler, H.K., 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 50: 47-65.
- Lichtenthaler, H.K.; Rohmer, M.; Schwender, J., 1997. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant.* 101 (3): 643-652.
- Lingakumar, K.; Kulandaivelu, G., 1993. Regulatory role of phytochrome on ultraviolet – B (280-315 nm) induced changes in growth and photosynthetic activities of *Vigna sinensis* L. *Photosynthetica* 29(3): 341-351.
- Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B., 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer – Verlag, New York, 354p.
- Mahabusarakam, W.; Proudfoot, J.; Taylor, W., 2000. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin. *Free Rad. Res.* 33(5):643-659.
- Mahabusarakam, W.; Wiriyaichitra, P.; Phongpaichit, S., 1986. Antimicrobial activities of chemical-constituents from *Garcinia-mangostana* linn. *J. Sci. Soc. Thailand.* 12(4):239-243.
- Mahato, S.B.; Sen, S., 1997. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry* 7(44):1185-1236.

- Mancinelli, A.L.; Scharz, O.M., 1984. The Photoregulation of anthocyanin synthesis IX. The photosensitivity of the response in dark and light – grown Tomato seedlings. *Plant Cell Physiol.* 25(1):93-105.
- Mckersie, B.D.; Leshem, Y.Y., 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer, Doldrecht, pp.79-103.
- Milborrow, B.V., 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52 (359): 1145-1164.
- Monk, L.S.; Fagerstedt, K.V.; Crawford, R.M.M., 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.* 76:456-459.
- Moore, L.B.; Goodwin, B.; Jones, S.A.; Wisely, G.B.; Serabjit-Singh, C.J.; Willson, T.M.; Collins, J.L.; Kliewer, S.A., 2000. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane x receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(13):7500-502.
- Morand, C.; Crespy, V.; Manach, C.; Besson, C.; Demigne, C.; Remesy, C., 1998. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275:212 – 219.
- Moscovici, S.; Moalem-Beno, D.; Weiss, D., 1996. Leaf – mediated light responses in *Petunia* flowers. *Plant Physiol.* 110:1275-1282.
- Muller, W.E.; Singer, A.; Wonnemann, M.; Hafner, U.; Rolli, M.; Schafer, C., 1998. Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry* 31 (suppl):16-21.
- Muruganandam, A.V.; Ghosal, S.; Bhattacharya, S.K., 2000. The role of xanthenes in the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* involving dopaminergic and serotonergic systems. *Biogenic Amines.* 15(5):553-567.

- Nakamura, A.; Shimada, H.; Masuda, T.; Ohta, H.; Takamiya, K. 2001. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stress in tobacco. *FEBS Letters*. 506 (1): 61-64.
- Nandi, S.K.; Palni, L.M.S.; Rikhari, H.C., 1996. Chemical induction of adventitious root formation in *Taxus baccata* cuttings. *Plant Growth Regul.* 19 (2): 117-122.
- Niyogi, K.K.; Bjorkman, O.; Grossman, A.R., 1997. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *P. Natl. Acad. Sci. Usa.* 94 (25): 14162-14167.
- Nooden, L.D.; Hillsberg, J.W.; Schneider, M.J., 1996. Induction of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* by long days through a light-dosage effect. *Physiol. Plant.* 96:491-495.
- Oliveira, B.H.; Santos, Cid. A. M.; Espíndola, A.P.D.M., 2002. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Dolioscarpus schottianus* by HPLC. *Phytochem. Anal.* 13: 95-98.
- Oliveira, J.G., 2000. Efeitos fisiológicos da fotoinibição de fotossíntese em plantas jovens de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, Tese de doutorado.
- Oquist, G., 1983. Effects of low-temperature on photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 6 (4):281-300.
- Paolacci, a.R.; Badiani, M.; Dannibale, A.; Fusari, A.; Matteucci, G., 1997. Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *Triticum durum* seedlings acclimated to non – stressing high temperature. *J. Plant. Physiol.* 150:381-387.
- Pengsuparp, T.; Cai, L.; Constant, H.; Fong, H.H.S., 1995. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit hiv-1 reverse-transcriptase. *J. Nat. Prod.-LL.* 58(7):1024-1031.

- Pérez, D.D.; Strobel, P.; Foncea, R.; Diez, M.S.; Vasquez, L.; Urquiaga, I.; Castillo, O.; Cuevas, A.; San Martín, A.; Leighton, F., 2002. Wine, Diet, Antioxidant Defenses, and Oxidative Damage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 957:136 – 145.
- Pérez-Vizcaíno, F.; Ibarra, M.; Cogolludo, A.L.; Duarte, J.; Zaragoza-Arnaez, F.; Moreno, L.; Lopez-Lopez, G.; Tamargo, J., 2002. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:66 – 72.
- Picq, M.; Cheav, S.L.; Prigent, A.F., 1991. Effect of two flavonoid compounds on central nervous system analgesic activity. *Life Sci.* 49(26):1979-88.
- Pietta, P.; Gardana, C.; Pietta, A., 2001. Comparative evaluation of St. John's wort from different Italian regions. *Il Farmaco.* 56:491-496.
- Piscitelli, S.C.; Burstein, A.H.; Chaitt, D.; Alfaro, R.M.; Falloon, J., 2000. Indinavir concentrations and St John's Wort. *Lancet* 12 (355):547-548.
- Prasad, T.K., 1996. Mechanism of chilling – induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: change in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10:1017-1026.
- Purvis, A.C.; Shewfelt, R.L., 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant – tissues. *Physiol. Plant.* 88(4):712-718.
- Rabino, I.; Mancinelli, A.L., 1986. Light, temperature and anthocyanin production. *Plant Physiol.* 81(3): 922-924.
- Razal, R.A.; Ellis, S.; Singh, S.; Lewis, N.G.; Towers, G.H.N., 1996. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry* 41(1):31-35.
- Rensburg, L.V.; Kruger, G.H.J., 1994. Evaluation of components of oxidative stress metabolism for use in selection of drought tolerant cultivars of *Nicotiana tabacum* L.J. *Plant Physiol.* 143:730-737.

- Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M.; Stoecklievans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K., 1994. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 36(6):1381-1385.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Evans, H.; Hostettmann, K., 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoid from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40(5):1447-1452.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Hostettmann, K., 1996. More Phoroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 42(1):185-188.
- Running, G.W.; Read, C.P., 1980. Soil temperature influences on root resistance of *Pinus cortorta* seedlings. *Plant Physiol.* 65:635-640.
- Sahai, O.P.; Shuler, M.L., 1984. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of nicotiana-tabacum. *Biotechnol Bioeng.* 26 (2): 111-120.
- Santis, A.D.; Landi, P.; Genchi, G., 1999. Changes of mitochondrial properties in Maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome C oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. *Plant Physiol.* 119:743-754.
- Schindler, C.; Lichtenthaler, H.K., 1994. Is there a correlation between light-induced zeaxanthin accumulation and quenching of variable chlorophyll-a fluorescence. *Plant. Physiol. Bioch.* 32 (6): 813-823.
- Schuhly, W.; Heilmann, J.; Calis, I.; Sticher, O., 1999. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Med.* 65(8):740-743.

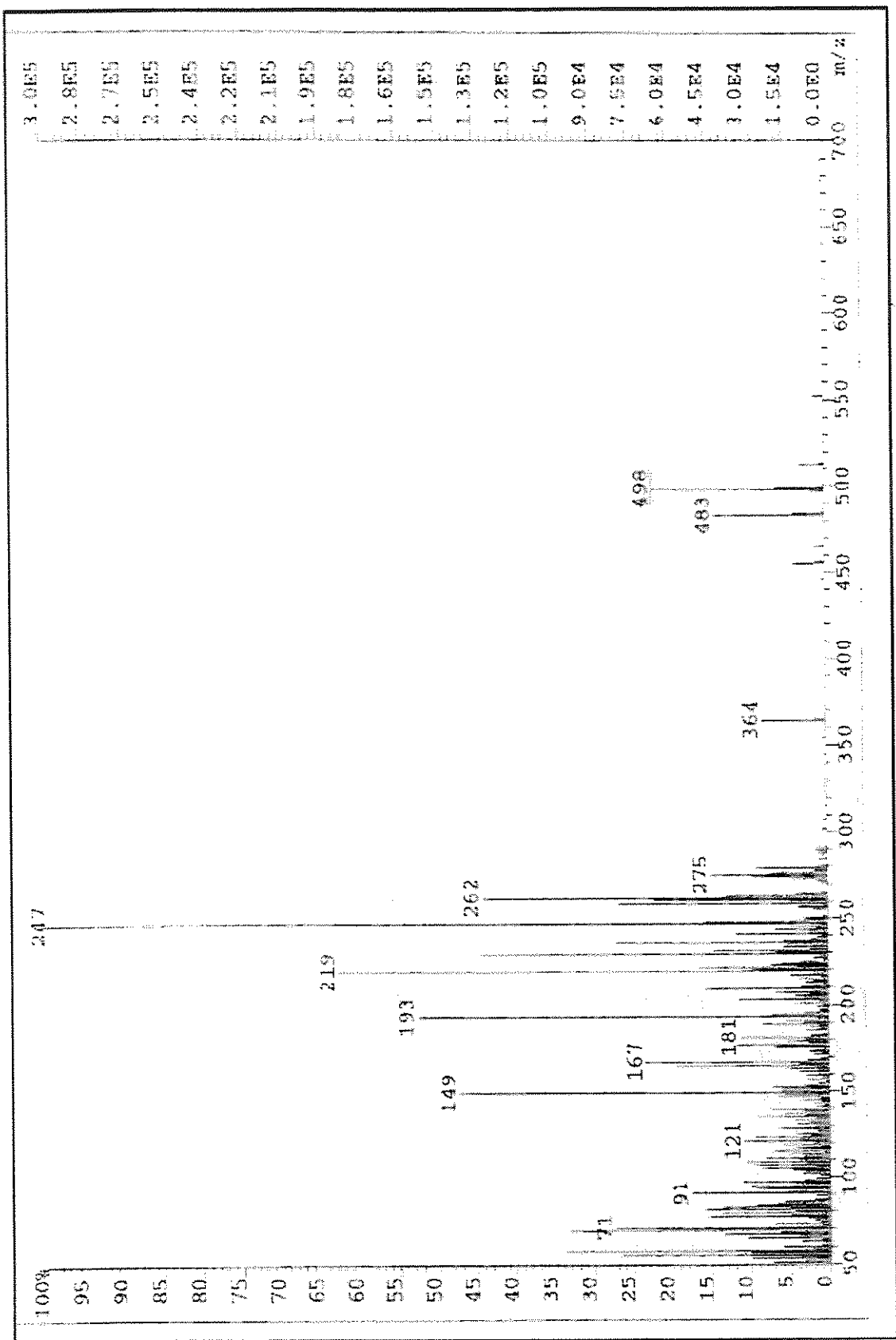
- Silva, K.L.; Santos, A.R.; Mattos, P.E., 2001. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Therapie* 56(4):431-4.
- Smirnoff, N., 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: *Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation* (Smirnoff, N.). Bios Scientific Publisher, Oxford, UK, pp.217-243.
- Solecka, D.; Boudet, A.M.; Kacperska, A., 1999. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 37(6):491-496.
- Solecka, D.; Kacperska, A., 1995. Phenylalanine ammonia-lyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low-temperature. *Plant. Physiol. Biochem.* 33(5):585-591.
- Southwell, I.A.; Bourk, C.A., 2001. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry* 56(5):437-441.
- Souza, C.A.F., 2001. Metabolismo de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr. cv. IAC-17) submetidas à deficiência de O₂ no sistema Radicular. Tese de Doutorado, IB – UNICAMP – SP.
- Steponkus, P.L., 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:543 – 584.
- Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A., 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 43(14): 2923-25.
- Sugimura, T., 2000. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 21:387 – 395.
- Sundaram, B.M.; Gopalakrishnan, C; Subramanian, S., 1983. Anti-microbial activities of *Garcia mangostana*. *Planta Med.* 48 (1):59-60.

- Swain, T.; Hillis, W.E., 1959. The Phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. J.Sci.Food Agric. 10:63-68.
- Taiz, L.; Zeiger, E., 1998. Plant Physiology. Massachusetts, Sinauer Associates Inc. Publishers, 2ed, 792p.
- Tekel'ová, D.; Repcak, M.; Zemková, E.; Tóth, J., 2000. Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. Planta Med. 66:778 – 780.
- Thatte, U.; Bagadey, S.; Dahanukar, S., 2000. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. Cell. Mol. Biol. 46(1):199-214.
- Torssel, K. B. G., 1997. Natural Product Chemistry: a mechanistic, biosynthetic and ecological approach. Stockholm, Sweden, Apotekarsocieteten. 2ed, 480p.
- Towers, G.H.N.; Singh, S.; Razal, R.A.; VanHeerden, P.S.; Lewis, N.G., 1997. Ammonium reassimilation in phenylpropanoid metabolism: a new nitrogen cycle in plants. Plant Physiol. 114(3):208-208 (Suppl.).
- Urchei, M.A., 1992. Status de água em plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.), submetidas à diferentes potenciais de água no solo. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Tese de Doutorado.
- Varis, T., 2000. Studies on drug interactions between CYP3A4 inhibitors and glucocorticoids. University of Helsinki, Finlandia, Dissertation.
- Wakabayashi, K.; Hoson, T.; Kamisaka, S., 1997. Osmotic stress suppresses cell wall stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. Plant Physiol. 113(3):967 – 973.
- Walker, T.S.; Bais, H.P.; Vivanco, J.M., 2002. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). Phytochemistry 60: 289-293.

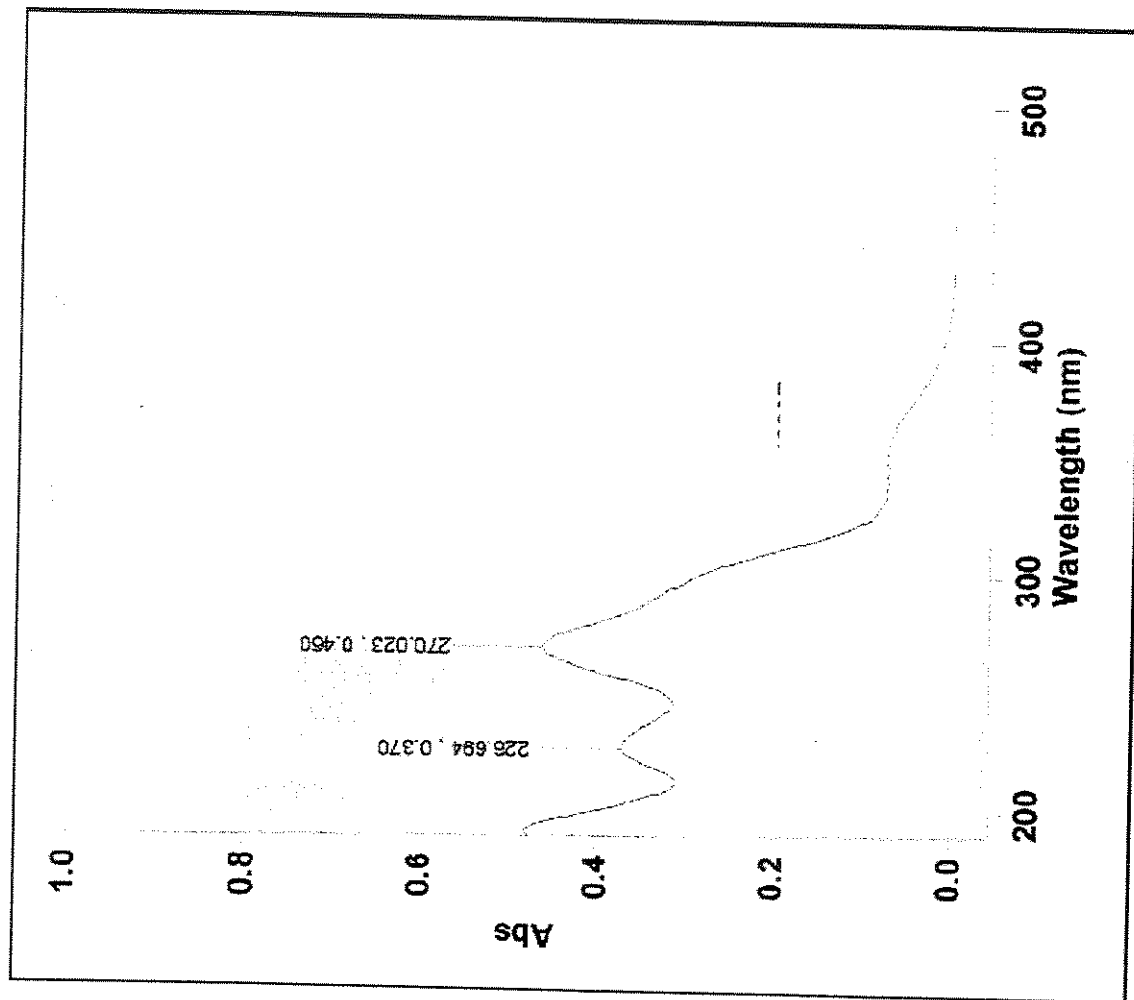
- Wang, S.Y.; Camp, M.J., 2000. Temperatures after bloom effect plant growth and fruit quality of strawberry. *Sci. Horticul.* 85:183-199.
- Wanner, L.A.; Juntilla, O., 1999. Cold – induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120:391-399.
- Wei, y.Q.; Zhao, X.; Kariya, Y.; Fukata, H.; Teshigawara, K.; Uchida, A., 1994. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res.* 54(18):4952-7.
- Weidner, S.; Amorowicz, R.; Karamac, M.; Fraczek, E., 2000. Changes in endogenous phenolic acids during development os *Secale cereale* caryopses and after dehydration tretment of unripe rye grains. *Plant Physiol. Biochem.* 38 (7-8): 595-602.
- Wentworth, J.M.; Agostini, M.; Love, J.; Schwabe, J.W., 2000. St. John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor. *J. Endocrinol.* 166(3):11-16.
- Werner, J.E.; Finkelstein, R.R., 1995. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol. Plant.* 93: 659-666.
- Whitehead, D.; Jarvis, P.G., 1981. Coniferous forests and plantations. In: *Water deficits and plant growth* (Kozlowski, T.T.). Academic Press, New York, vol.6, pp. 49-152.
- Wills, R.B.H.; Bone, K.; Morgan, M., 2000. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *Nutr Res Rev.* 13 (1) : 47-77.
- Xing,N.; Chen, Y.; Mitchell, S.H.; Young, C.Y.F., 2001.Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 22:409 – 414.

- Xu, S.C.; Sun, Z.Y.; Ai, X.C., 2000. Ultrafast spectral studies of the primary processes of photosynthesis in spinach and water hyacinth leaves . *Acta Bot. Sin.* 42 (12): 1235 – 1242.
- Yamagushi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K., 1994. A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *Plant Cell* 6: 251–264
- Yamasaki, H.A., 1997. A function of color. *Trends in Plant Sci.* 02:7-9.
- Yang, C.S.; Landau, J. M.; Huang, M.; Newmark, H.L., 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21:381 – 406.
- Yoshizumi, M.; Tsuchiya, K.; Kirima, K.; Kyaw, M.; Suzaki, Y.; Tamaki, T., 2001. Quercetin inhibits shc - and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-jun n-terminal kinase activation by angiotensin ii in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 60:656 – 665.
- Yu, X.H.; Perdue, T.D.; Heimer, Y.M.; Jones, A.M., 2002. Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Different.* 9(2):189-198.
- Zabotin, A.I.; Barissheva, T.S.; Zabolina, O.L.; Larskaya, I.A.; Lozovaya, V.V.; Beldman, G.; Voragen, A.G.J., 1998. Alterations of cell walls of winter wheat roots during low temperature acclimation. *J. Plant Physiol.* 152:473-479.
- Zhang, W.; Seki, M.; Furusaki, S., 1997. Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Sci.* 127:207-2014.

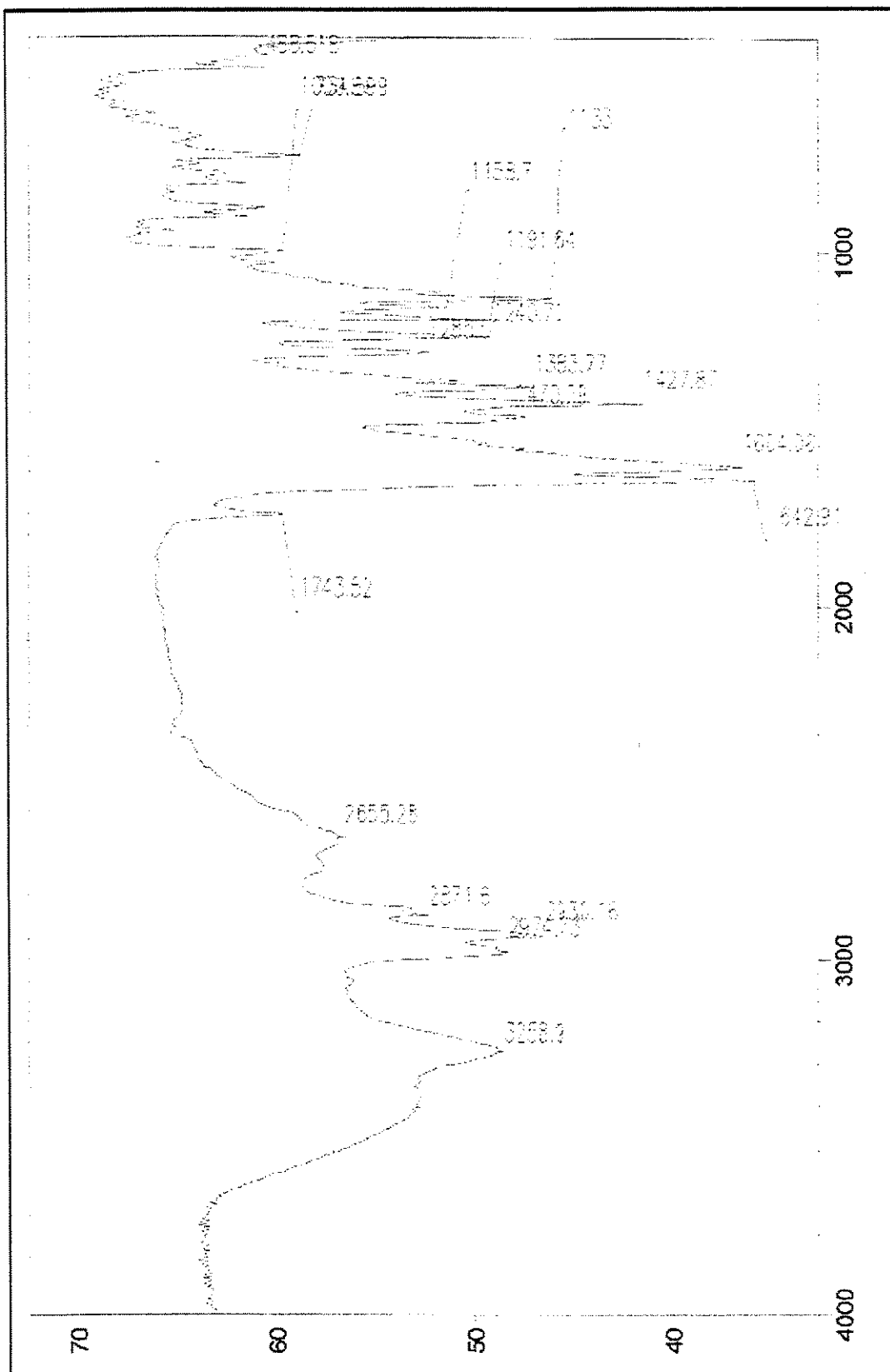
Zykova, V.V.; Kolesnichenko, A.V.; Voinikov, V.K., 2002. Involvement of reactive oxygen species in plant mitochondrial response to low – temperature stress. Russ. J. Plant. Physiol. 49(2):269 – 276.



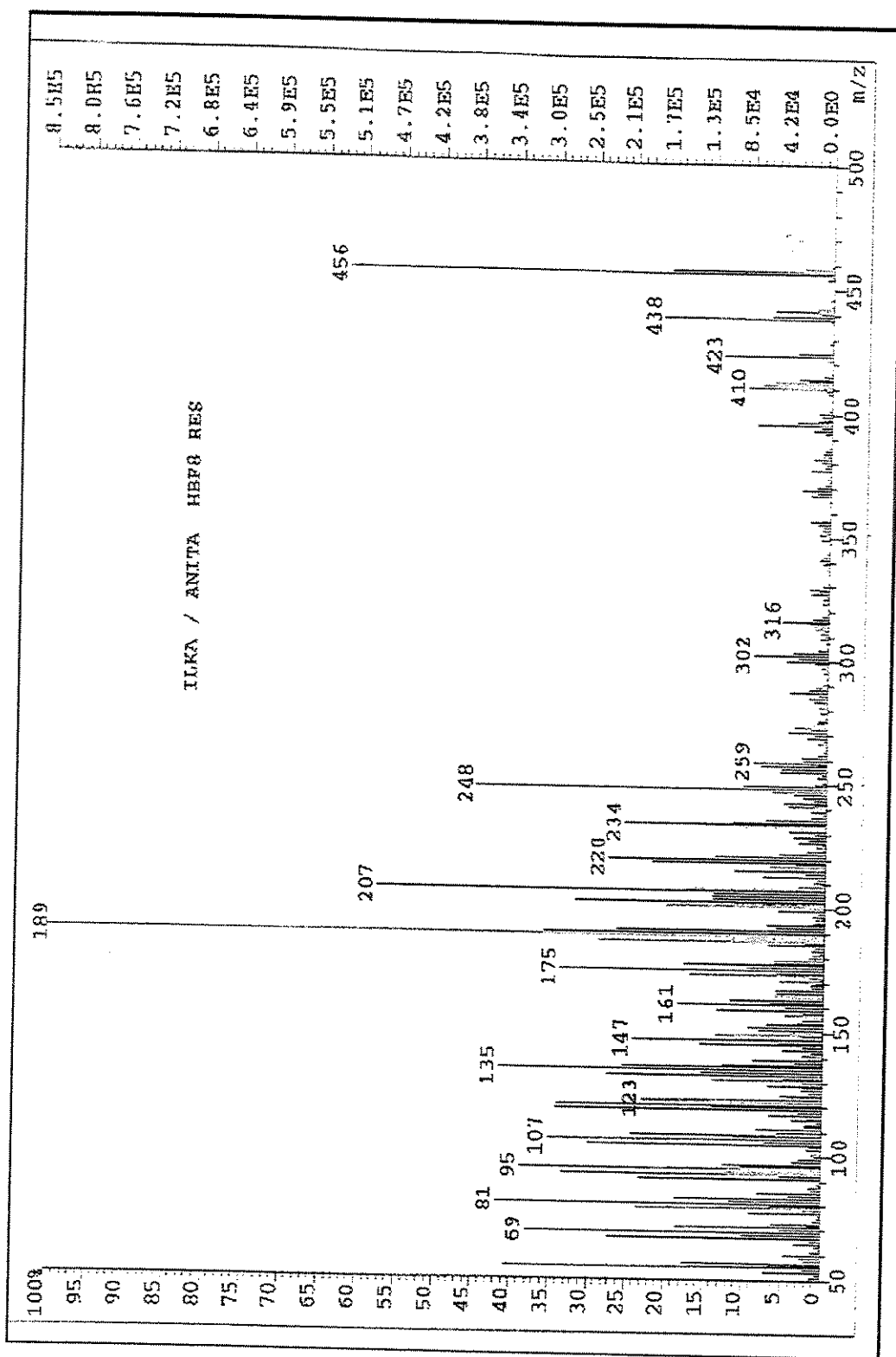
Anexo 1. Espectro de Massas do acifloroglucinol de *H. brasiliense*



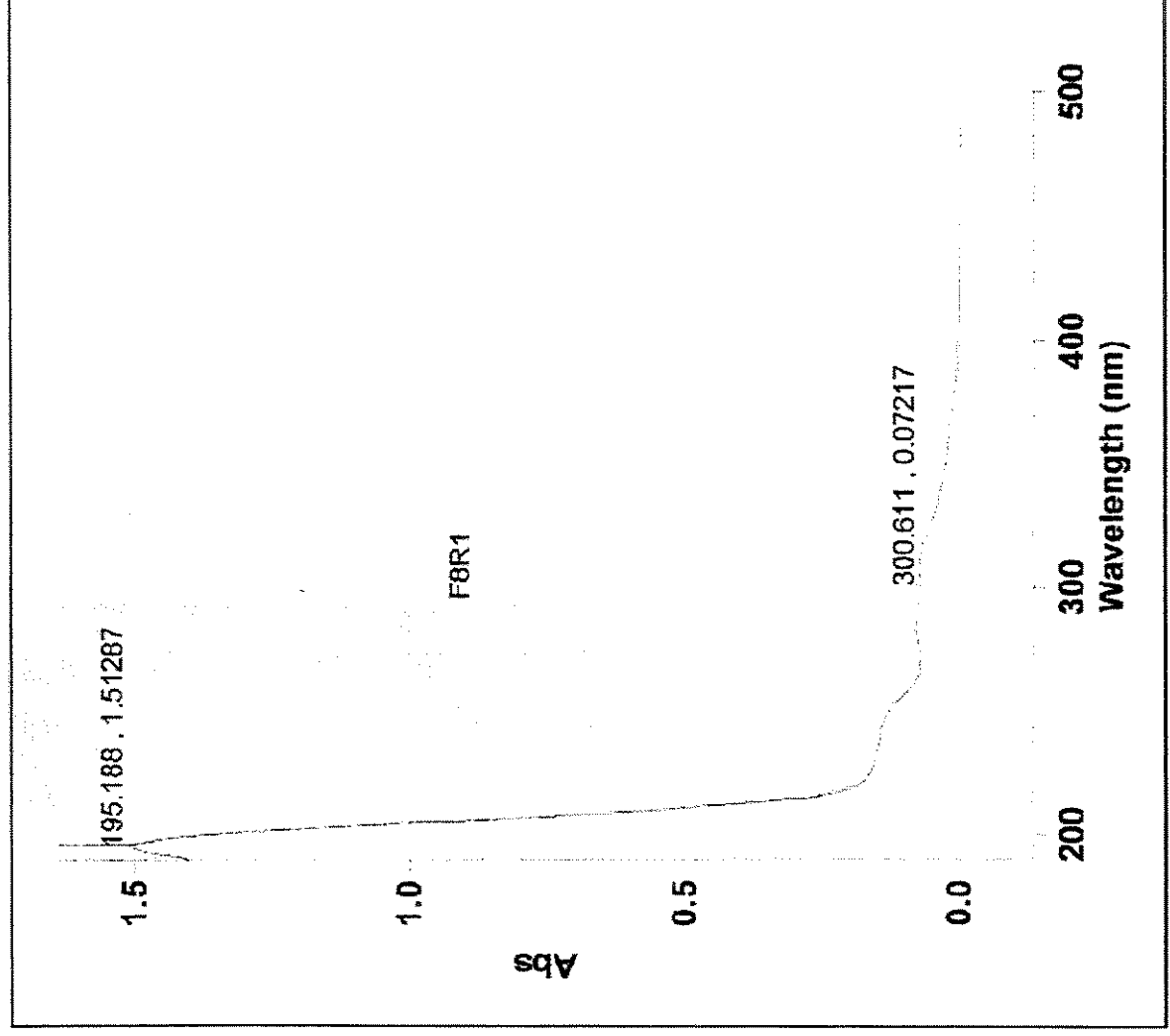
Anexo 2. Espectro no UV (Abs) do acifloroglucinol de *H. brasiliense*



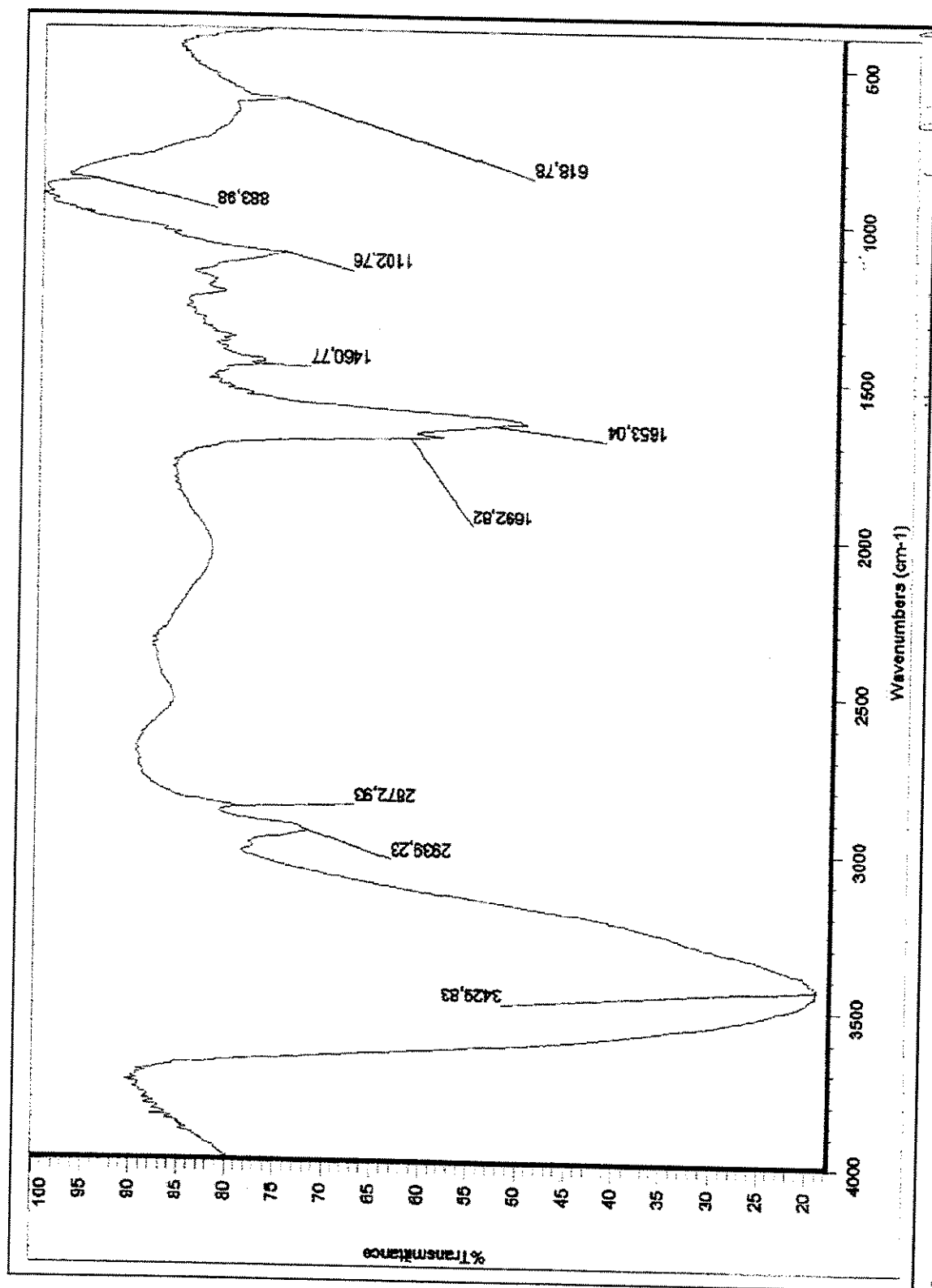
Anexo 3. Espectro no Infravermelho (filme) do acifloroglucinol de *H. brasiliense*



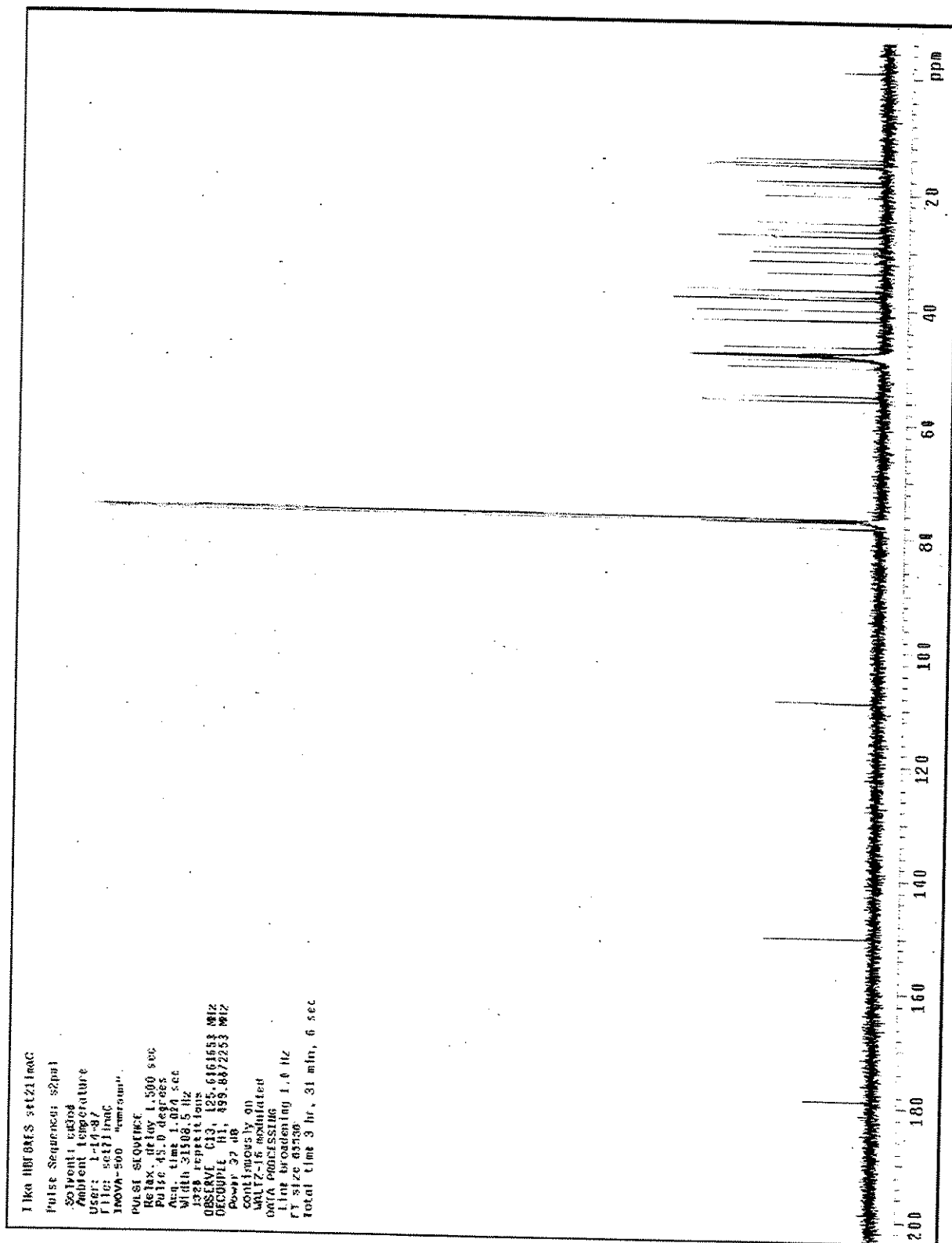
Anexo 6. Espectro de massas do ácido betulínico de *H. brasiliense*



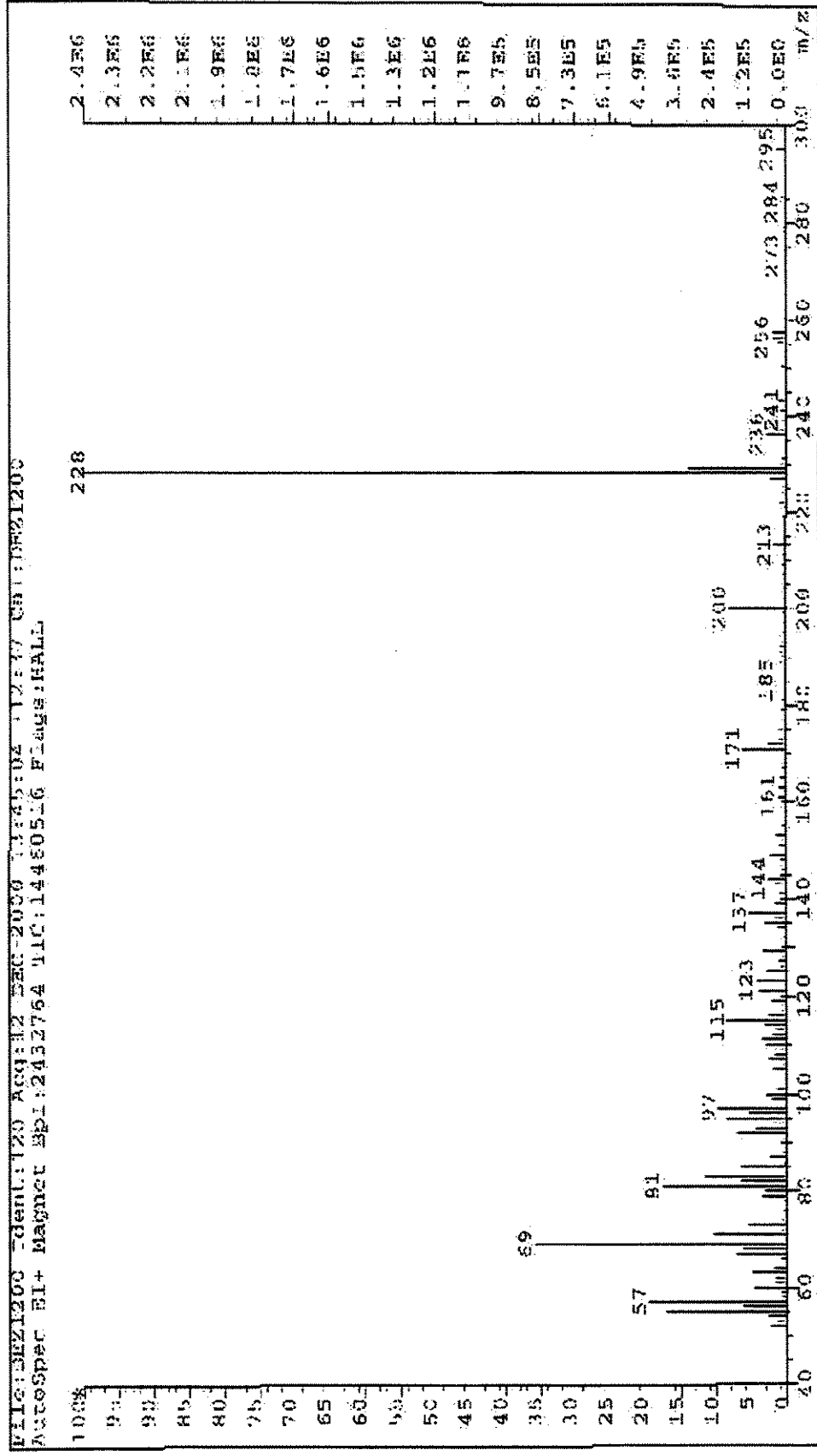
Anexo 7. Espectro no UV (Abs) do ácido betulínico de *H. brasiliense*



Anexo 8. Espectro no Infravermelho (filme) do ácido betulínico de *H. brasiliense*



Anexo 10. Espectro de RMN de C¹³ do ácido betulínico de *H. brasiliense*



Anexo 11. Espectro de Massas da xantona de *H. brasiliense*

Capítulo 2

Variabilidade genética e florescimento *in vitro* de *Hypericum brasiliense*

1. INTRODUÇÃO

A exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa, através do extrativismo nos ecossistemas tropicais, tem levado a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. Assim, a domesticação e cultivo aparecem como opção para obtenção da matéria prima de interesse farmacológico e redução do extrativismo nas formações diversas (Reis e Mariot, 1999).

O gênero *Hypericum* compreende mais de 400 espécies agrupadas em 31 seções. O gênero é variável em muitos caracteres e há poucas informações sobre os sistemas de reprodução (Mártonfi & Brutovská, 1996).

H. brasiliense é uma espécie com ampla distribuição nos estados brasileiros, em regiões com elevadas altitudes, desde a Bahia (Serra da Barra do Choca - Itapetinga), Espírito Santo (Pico da Bandeira e Serra do Caparaó), Minas Gerais (Ouro Preto, Parque de Ibitipoca, Monte Verde, Serra do Caraça, Maria da Fé), Rio de Janeiro (Serra dos Órgãos, Serra de Itatiaia e Petrópolis), São Paulo (Campos do Jordão e Ibiúna), Paraná (Laranjeiras do Sul e Balsa Nova) até Santa Catarina (Chapecó) (Jimenez, 1980; Robson, 1987).

Já foi verificado que diferentes populações de *H. perforatum* podem ter variações genotípicas intra e inter populacional (Matzk *et al.*, 2001). Entretanto, o pré-requisito para uma espécie medicinal ser explorada como fonte de metabólitos secundários com qualidade é a reprodução de variedades homogêneas e o seu

cultivo ser realizado em condições controladas, como forma de controle da qualidade do produto final (Steck *et al.*, 2001).

Os avanços científicos na área biológica, após a metade do século XX, proporcionaram o desenvolvimento de dezenas de técnicas, que estão facilitando a realização de estudos de genética e melhoramento de plantas. Neste contexto, podem ser empregadas ferramentas biotecnológicas associadas ao uso de marcadores moleculares para caracterização e monitoramento da diversidade genética. O estudo da estrutura genética de populações naturais, de interesse farmacológico, é imprescindível para o sucesso do melhoramento de características desejáveis (Nodai & Guerra, 1999).

No melhoramento genético de plantas medicinais deve-se considerar os recursos genéticos disponíveis, bem como o conhecimento prévio do sistema reprodutivo e da variabilidade genética das espécies consideradas, como forma de se definir detalhes dos programas de melhoramento. Estudos sobre a identificação e caracterização da variabilidade genética em plantas medicinais concentram-se em diversos aspectos, tais como os caracteres morfológicos, aspectos do DNA e seus fragmentos, genes mutantes, cromossomos, isozimas, PCRs, RAPDs, RFLPs e microssatélites (Martins, 1996; Lopes, 1998).

A vantagem no uso de marcadores bioquímicos e moleculares, em detrimento dos marcadores morfológicos, está na possibilidade de serem identificáveis em qualquer idade da planta (Alfenas, 1998).

No gênero *Hypericum*, a espécie mais estudada é *H. perforatum* e, no intuito de selecionar indivíduos geneticamente superiores para a produção de fitofármacos, a variabilidade genética de diferentes populações tem sido descrita na literatura com o uso de marcadores moleculares, bem como a utilização de técnicas

biotecnológicas de clonagem das linhagens selecionadas (Mártonfi *et al.*, 1996; Halusková & Cellarová, 1997; Brutovská *et al.*, 1998; Arnholdt-Schmitt, 2000; Matzk *et al.*, 2001; Steck *et al.*, 2001).

Uma vez definida a variabilidade genética de uma população, o passo seguinte é a seleção de genótipos superiores em detrimento aos inferiores (levando-se em consideração alguma característica desejável). Para a fixação dos genótipos selecionados, dá-se preferência à reprodução assexuada no intuito de evitar perdas dos caracteres desejados (Palevitch, 1991).

Em trabalhos experimentais, realizados com espécies que ainda não foram domesticadas, os resultados são expressos em médias e mesmo levando-se em consideração o erro experimental (1 ou 5%), pode-se estar super ou subestimando-os, quando a variabilidade entre indivíduos é muito alta (Pimentel Gomes, 1987).

Portanto, o conhecimento da variabilidade genética de uma população específica, em estudo, é de extrema importância para a homogeneidade de resultados experimentais. Por exemplo, no capítulo 1 deste trabalho foi verificado um aumento na produção de compostos fenólicos sob condições de estresse hídrico e térmico em plantas de *H. brasiliense*. Entretanto, não há informações na literatura sobre as formas de reprodução ou sobre a variabilidade genética desta espécie.

A abordagem biotecnológica tem sido direcionada para a obtenção de cultivares com elevado conteúdo de metabólitos secundários, uma vez que compreende técnicas que permitem ampliar a multiplicação clonal de genótipos de interesse (Urbanová *et al.*, 2002).

A micropropagação de várias espécies medicinais tem sido descrita por vários autores durante as quatro últimas décadas (Carew & Staba, 1965; Cook *et al.*, 1988; McCartan & Van Staden, 1998; Zschocke & Van Staden, 2000). Do ponto de vista

prático e farmacológico, a propagação de meristemas pré-existent não é tecnologicamente difícil, proporcionando a produção de plantas geneticamente idênticas à planta mãe (Rout *et al.*, 2000).

A capacidade de um explante regenerar uma plântula, num curto intervalo de tempo, é dependente do seu potencial morfogenético. A morfogênese *in vitro* é consequência dos processos de divisão e diferenciação celular integrados. Tais processos dependem do grau de diferenciação do tecido e da regulação hormonal interna ou externa, os quais agem direta ou indiretamente ao nível gênico, desencadeando processos específicos de síntese e, como consequência, alterações bioquímicas e metabólicas diversas. Tais processos são dependentes, além do tipo de explante, das condições de desenvolvimento em que as plantas matrizes se encontram (Abreu, 1998).

Sendo assim, a partir do conhecimento sobre a variabilidade genética e do ajuste de uma metodologia de propagação *in vitro* de *H. brasiliense*, será possível conduzir os trabalhos de otimização da regulação do metabolismo secundário desta espécie *in vitro* ou *in vivo*, de forma a se obter resultados homogêneos.

2. OBJETIVOS

- Estudar a variabilidade genética de plantas de *H. brasiliense*, oriundas de Ibiúna/SP, através da técnica de eletroforese de isozimas.
- Verificar o potencial morfogenético *in vitro* de gemas apicais oriundas de plantas juvenis e adultas de *H. brasiliense*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Sementes de diversas plantas de *H. brasiliense*, coletadas em 2000 na cidade de Ibiúna (SP), foram misturadas e colocadas para germinar em vermiculita, a 20°C, na luz. As plântulas obtidas, num período de 30 dias, foram transferidas para casa de vegetação e mantidas em condições de crescimento naturais, sob sombrite, proporcionando 50% de luminosidade, e irrigação diária.

Quando as plantas atingiram 5 cm de altura, elas foram transferidas para vasos com capacidade para 5 litros, contendo terra e areia, na proporção 2:1.

Plantas com 15 (juvenis) e 30 cm (adultas) foram utilizadas como fornecedoras de explantes para os experimentos de cultura de tecidos.

As análises isozimáticas foram realizadas em plantas com dois anos de idade.

3.2. Análise da variabilidade genética através do uso de isozimas.

Para tentar caracterizar a diversidade genotípica das plantas de *H. brasiliense*, pertencentes à população de Ibiúna (SP), foram utilizadas 10 plantas adultas (com 2 anos de idade), provenientes de sementes e mantidas em de casa de vegetação.

Pequenos pedaços de tecido do ápice foliar de cada planta, foram macerados em aproximadamente 20 µl de tampão de extração (modificado de Sun & Ganders, 1990): Tris HCl 0,1M, pH 7,0; sacarose 0,02M; 0,6g de PVP, EDTA 0,13mM; 0,15% de BSA; 0,13% de DIECA; 0,6% de Borax e 10% de β-mercaptoetanol.

Os extratos foram absorvidos em retângulos (0,4 x 10 mm) de papel Whatmann 3 MM , que foram aplicados em gel de amido Sigma (8,5%), de 1 cm de espessura.

Foram realizados vários testes com diferentes sistemas gel/eletrodo, para definir em quais ocorriam as melhores separações das enzimas:

a) Sistema 1(Clayton & Tretiak, 1972):

Solução do Eletrodo: ácido cítrico 0,04M, pH ajustado para 6,1 com N-(3-aminopropil)-morfolina;

Solução do Gel: a mesma solução do eletrodo na diluição de 1:20

Condição da corrida: 150 V

b) Sistema 2 (modificado de Stuber *et al*, 1977).

Solução do Eletrodo: histidina 0,065 M, pH ajustado para 6,5 com ácido cítrico

Solução do Gel: a mesma solução do eletrodo na diluição de 1:4.

Condição da corrida: 150 V.

c) Sistema 3

Solução do Eletrodo: 0,6g de hidróxido de lítio; 5,9g de ácido bórico e 1,1g de EDTA em 1000 mL de água (pH8,0).

Solução do gel: a mesma do eletrodo na diluição de 1:10.

Condição da corrida: 30 mA.

d) Sistema 4 (Clayton & Tretiak, 1972 modificado):

Solução do eletrodo: ácido cítrico 0,04M, pH ajustado para 7,5 com N-(3-aminopropil)-morfolina.

Solução do gel: a mesma solução do eletrodo na diluição de 1:20.

Condição da corrida: 30 Ma.

e) Sistema 5:

Solução do eletrodo: 37g de ácido bórico; 4,8g de NaOH em 1000 mL de água, pH 8,0 (ajustado com HCl).

Solução do gel: (2,4g/1000 mL) Tris com pH 8,5 ajustado com HCl (1N).

Condição da corrida: 50 mA.

Todo o processo desde a extração até o final da corrida foi realizado a 4°C.

A eletroforese foi conduzida até o marcador de corrida (azul de bromofenol) atingir aproximadamente 9 cm do local de aplicação.

Os sistemas eletroforéticos foram testados para coloração nos sistemas enzimáticos apresentados na tabela 1.

A partir dos melhores resultados (tabela 1) foram selecionados os seguintes sistemas com as respectivas enzimas: sistema 1 (MDH, PGI, GOT, IDH); sistema 2 (SKDH, IDH, MDH) e sistema 3 (PGM, AK, EST).

Decorrente dos resultados obtidos com ápices foliares, foi realizada a coleta de um fruto da planta matriz número 10 e todas as sementes (do mesmo fruto) foram colocadas para germinar em placa de Petri, contendo papel de filtro umedecido, a 20°C e na luz.

Após 30 dias, de 80 sementes apenas 6 haviam germinado e as plântulas originadas, com aproximadamente 0,3 cm de comprimento total, foram utilizadas para as análises isozimáticas. Cada plântula foi macerada em 5 µL de tampão de extração. Os extratos foram absorvidos em papel Whatmann 3MM (0,4 x 5 mm) e aplicados em gel de amido Sigma (8,5 %), de 0,5 cm de espessura. O sistema 3 foi

utilizado na corrida, nas mesmas condições descritas anteriormente. Testaram-se dois sistemas enzimáticos: PGI e MDH.

Tabela1: Sistemas enzimáticos testados em ápices foliares de *H. brasiliense*.

Enzima	Sigla	Código da enzima (EC)	Sistemas	Melhor Sistema
Adenilato quinase	AK	2.7.4.3	3 e 4	3
Alanina desidrogenase	ALDH	1.4.1.1	1, 3 e 5	-
Álcool desidrogenase	ADH	1.1.1.1	3	3
Enzima málica	ME	1.1.1.40	1 e 2	-
Esterase	EST	3.1.1.1	3	3
Fosfatase ácida	ACPH	3.1.3.2	3 e 5	3
Fosfogluco isomerase	PGI	5.3.1.9	1, 2 e 3	1 e 3
Fosfoglucomutase	PGM	2.7.5.1	1 e 3	3
Fumarase	FUM	4.2.1.2	2	-
Glicose-6-fosfo desidrogenase	G6PDH	1.1.1.49	1	-
Glutamato – oxalacetato transaminase	GOT	2.6.1.1	4 e 1	1
Glutamato desidrogenase	GDH	1.4.1.2	5	5
Hexocinase	HK	2.7.1.1	3	-
Isocitrato desidrogenase	IDH	1.1.1.42	1 e 2	1
Leucina aminopeptidase	LAP	3.4.11.1	1 e 3	-
Malato desidrogenase	MDH	1.1.1.37	1,2 e 4	1,2 e 3
Chiquimato Desidrogenase	SKDH	1.1.1.25	1,2 e 5	2

As soluções de coloração dos sistemas enzimáticos foram preparadas segundo Alfenas (1998).

3.2.1. Análise dos resultados

Os padrões de bandas encontrados para cada indivíduo foram interpretados geneticamente a partir de observação direta nos zimogramas.

3.3. Estabelecimento da cultura de gemas apicais *in vitro*

Gemas apicais, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento, coletadas de plantas com 15 e 30 cm de altura (denominadas doravante como juvenis a adultas), foram utilizadas como explantes.

3.3.1. Assepsia do material vegetal

Os explantes foram submetidos ao seguinte processo de assepsia: água corrente por 30 minutos, imersão em etanol 70 % por 30 segundos e, em seguida, em hipoclorito de sódio comercial (20 %) por 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados por seis vezes em água destilada e autoclavada, excisados e inoculados em meio de cultura.

3.3.2. Meio de cultura e condições de incubação

Os explantes oriundos de plantas adultas e juvenis foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), contendo 3 % de sacarose, pH ajustado para 5,8, sem a adição de reguladores de crescimento, na presença e ausência de ágar (0,7 %). Foram utilizados tubos de ensaio (25 x 150mm), contendo 10 mL de meio de cultura. Nos tratamentos sem a adição de ágar, para evitar a imersão do

explante no meio de cultura, foram utilizadas pontes de papel como suporte. Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria ($25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os experimentos foram conduzidos com aproximadamente 30 repetições durante 20 dias.

Após o encerramento do experimento, analisou-se: número de gemas, altura e presença ou ausência de florescimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de isozimas em plantas de *H. brasiliense*

Os sistemas isozimáticos examinados para os dez indivíduos da população de *H. brasiliense* oriundos de Ibiúna-SP são mostrados na figura 1.

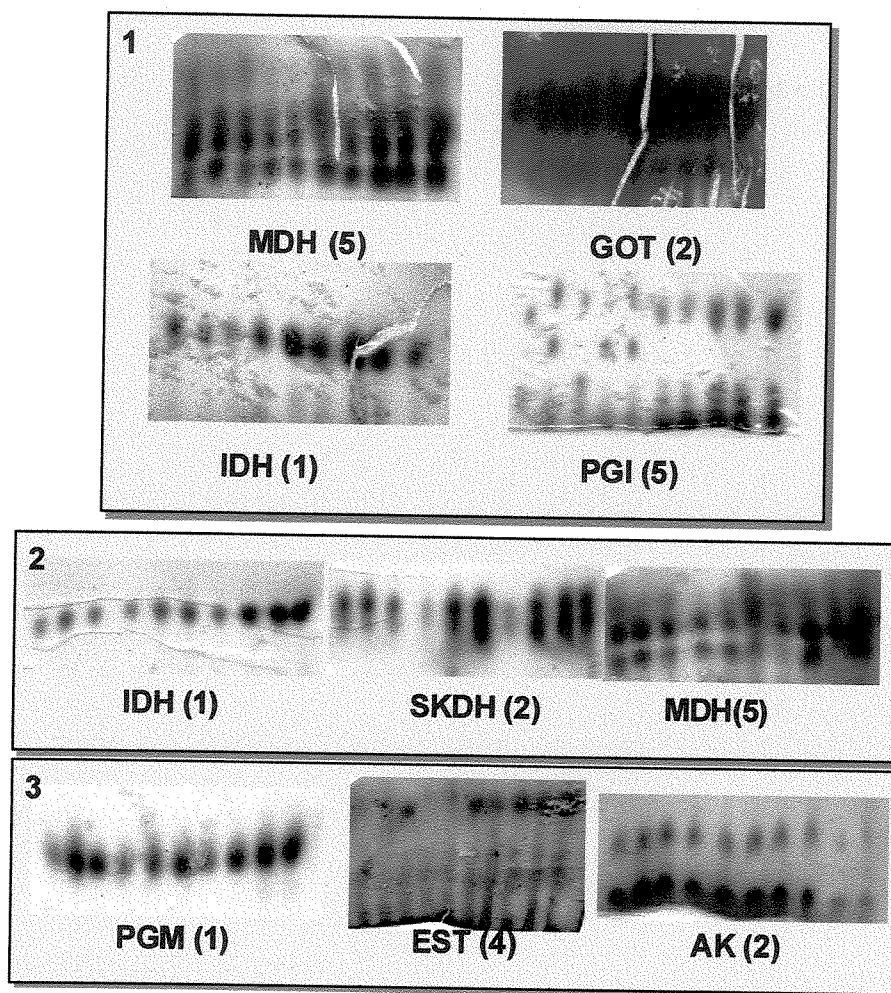


Figura 1. Zimogramas de diferentes isozimas de ápices foliares de plantas adultas de *H. brasiliense*, com os respectivos números de locus, realizados nos sistemas 1, 2 e 3.

Verifica-se que, com exceção da PGI, todas as demais enzimas mostraram ser monomórficas. Entretanto, a variação de locus ocorrida na PGI não pode ter os seus alelos analisados.

De todos os locus das isozimas analisadas, apenas 0,09% demonstraram ser polimórficos, o qual ocorreu apenas na PGI.

Para tentar verificar com que freqüência ocorria a variação de locus da PGI, procedeu-se à análise da enzima em plântulas de *H. brasiliense* formadas a partir de sementes oriundas de um mesmo fruto, proveniente do indivíduo 10 (figura 2).

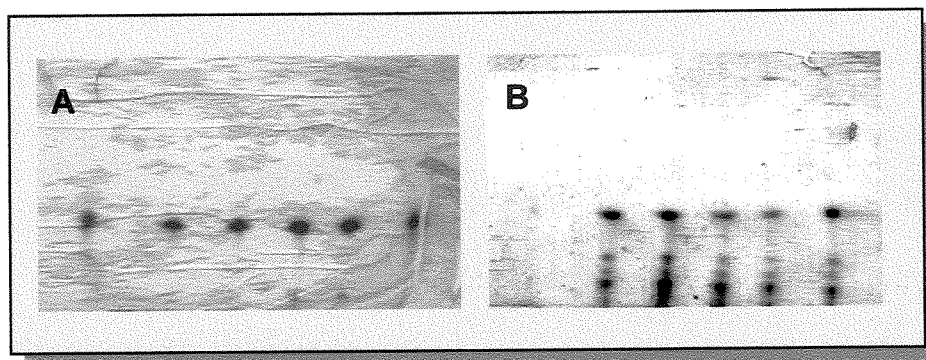


Figura 2. Zimogramas das isozimas de MDH (A) e PGI (B) analisadas em plântulas germinadas a partir de sementes do mesmo fruto (indivíduo número 10) de *H. brasiliense*.

Os zimogramas dos ensaios enzimáticos realizados tanto para a PGI como MDH demonstram que as enzimas são monomórficas nas plântulas analisadas e que o material proveniente de sementes é idêntico ao da planta-mãe, demonstrando a baixa variabilidade genética tanto nas plantas adultas como no material proveniente de sementes ou seja, na população em estudo.

Esse é o primeiro estudo sobre a variabilidade genética em *H. brasiliense*, não havendo informações sobre as possíveis maneiras de reprodução dessa espécie que justifiquem tais resultados. Entretanto, alguns estudos tem sido realizados como

forma de caracterizar as formas de reprodução de algumas espécies do gênero *Hypericum* (Marfonti *et al.*, 1996; Matzk *et al.*, 2000, 2001).

A reprodução de *H. perforatum* foi descrita por Noack em 1939 (citado por Brutovská *et al.*, 1998), o qual verificou que a célula-mãe dessa espécie é capaz de desenvolver partenocarpia e que o núcleo polar poderia ser fertilizado (pseudogamia). Também relatou que ao redor de 97% das sementes se desenvolvem apomiticamente e que apenas 3% se formam a partir de fusão sexual. Trabalhos posteriores, utilizando contagens de cromossomos, relataram que o número é variável ($2n = 16, 32$ e 48), provavelmente em consequência da ocorrência de apomixia facultativa na espécie (Robson & Adams, 1968; Robson, 1981).

Entretanto, Brutovská *et al.* (1998) não confirmaram a elevada frequência de apomixia em *H. perforatum*, quando estudaram a variabilidade citogenética em plântulas regeneradas *in vitro*. Então, utilizando técnicas de fluxo de citometria, Matzk *et al.* (2000) verificaram as possíveis formas de reprodução em *H. perforatum* e *H. patulum*, demonstrando que a formação de sementes na primeira espécie ocorria sexualmente, por pseudogamia (apomixia) e partenocarpia, e na segunda espécie se formavam a partir de fusão sexual e apomixia. Posteriormente, Matzk *et al.* (2001) analisou sementes de espécies apomíticas de *H. perforatum* e verificou a existência de um controle gênico para tal evento.

Sendo assim, os resultados do presente trabalho demonstraram que a provável baixa variabilidade da população em estudo possa ser decorrente de algum tipo de reprodução assexual, como observado em outras espécies do gênero. Entretanto, estudos mais detalhados seriam necessários para comprovar definitivamente tal sugestão.

Os resultados também sugerem que, face à baixa variabilidade genética das plantas de *H. brasiliense* pertencentes à população de Ibiúna (SP), os resultados obtidos em experimentos sobre a regulação metabólica nestas plantas são representativos, uma vez que são homogêneos e, portanto, possivelmente podem ser extrapolados para outras espécies do gênero.

4.2. Florescimento *in vitro* de *H. brasiliense*

A cultura de gemas apicais, realizada em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento, promoveu o crescimento de plântulas, cujo desenvolvimento ocorreu com dominância apical e enraizamento. O desenvolvimento foi semelhante ao obtido em cultura nodal de *H. brasiliense* (Cardoso & Oliveira, 1996) e *H. perforatum* (Cellarová *et al.*, 1992; Murch *et al.*, 2000), em meio sólido.

Quando crescidas em meio líquido, as plântulas oriundas de explantes juvenis apresentaram crescimento superior às plântulas crescidas em meio sólido, tendo maior altura e número de gemas, mas estes resultados não foram observados nas plântulas originadas a partir de explantes de tecido adulto (figura 3).

Os explantes oriundos de plantas matrizes juvenis, quando em meio líquido, proporcionaram a formação de plântulas com maior altura e número de gemas, quando comparadas àquelas provenientes de matrizes adultas, sendo que em meio sólido esta diferença foi menor.

As plântulas de *H. brasiliense* formadas a partir da cultura de ápice vegetativo (provenientes de plantas juvenis) tanto em meio sólido como líquido, apresentaram, de maneira geral, maiores internódios do que as plântulas de *H. brasiliense*, formadas a partir de cultura nodal em meio sólido (Cardoso & Oliveira, 1996).

Maiores internódios facilitam o manuseio durante as fases de repicagens para a obtenção de grandes quantidades de plântulas, uma vez que o desempenho de um explante, para a regeneração de plântulas, em condições controladas, depende não só da idade, mas também do tamanho (Abreu, 1998).

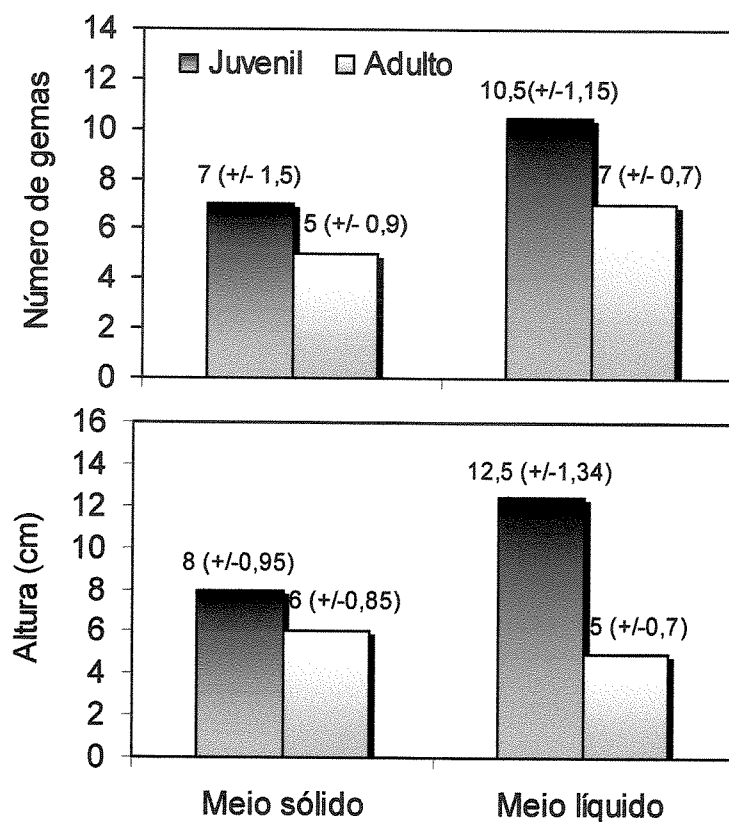


Figura 3. Número de gemas e altura de plântulas de *H. brasiliense*, cultivadas em meio sólido e líquido *in vitro* durante 20 dias, oriundas de gemas apicais de plantas em estágio de desenvolvimento juvenil e adulto.

Na figura 4 é possível visualizar as plântulas formadas a partir de explantes oriundos de matrizes juvenis (figura 4a) e adultas (figura 4b). Os explantes provenientes de plantas adultas tiveram as suas gemas diferenciadas em gemas florais, resultando no florescimento. Já os explantes retirados de plantas juvenis, resultaram na formação de plântulas com crescimento vegetativo. Por isso, as

plântulas provenientes de material adulto, tanto no meio sólido como no líquido, apresentaram menor altura e número de gemas.

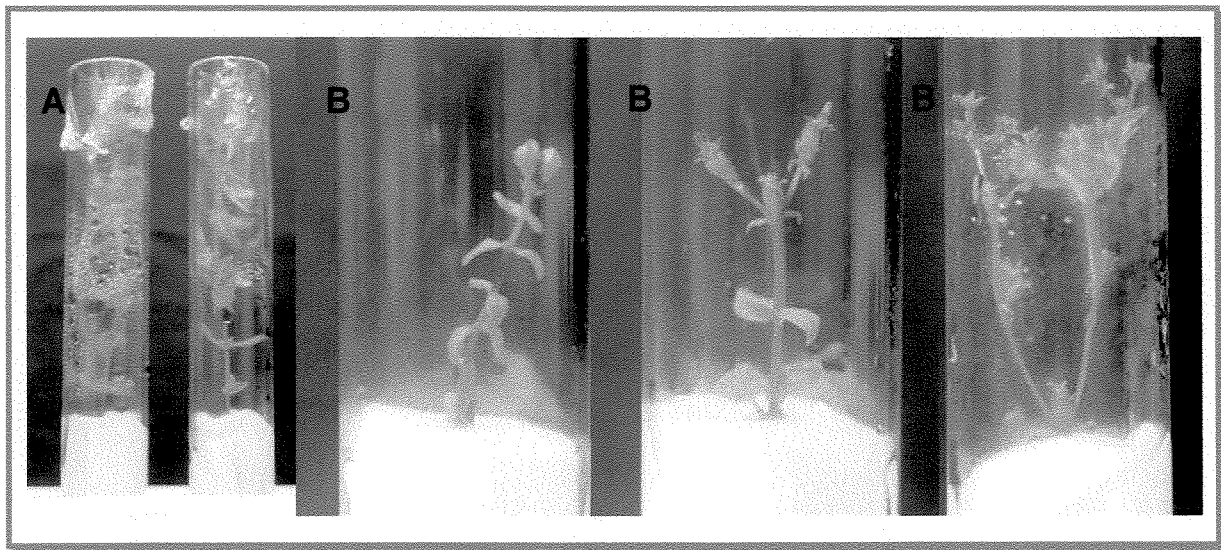


Figura 4. Desenvolvimento de plântulas de *H. brasiliense* *in vitro*, aos 20 dias: (A) plântulas formadas a partir de gemas apicais provenientes de matrizes juvenis; (B) florescimento de plântulas formadas a partir de gemas apicais oriundas de matrizes adultas.

O florescimento *in vitro* já havia sido demonstrado em outras espécies (Margara, 1969; Sehgal *et al.*, 1993; Jumin & Nito, 1995; Franklin *et al.*, 2000). Resultados semelhantes também foram encontrados por Gulati *et al.* (1996), que verificaram a ocorrência de florescimento em plântulas de *Artemisia annua* cultivadas *in vitro* e formadas a partir de explantes oriundos de plantas adultas.

A capacidade de regeneração de um explante *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica da planta-mãe, sob o controle de diversos fatores endógenos (Grattapaglia & Machado, 1998). Em espécies lenhosas, a passagem do estado juvenil para o adulto resulta em alterações

na capacidade morfogenética dos tecidos, a qual é marcante na diferenciação inicial dos explantes (Bonga, 1987; Hackett, 1987).

Sehgal *et al.* (1993) relataram que na espécie *Polypleurum stylosum* o florescimento *in vitro* ocorria apenas quando as plântulas eram transferidas do meio líquido para o semi-sólido, sugerindo que o estresse hídrico poderia ter uma importante função regulatória nesse evento. Tais resultados discordam dos encontrados no presente trabalho, uma vez que houve florescimento quando os explantes foram estabelecidos diretamente em meio líquido.

Para diversas espécies do gênero *Hypericum* já foram definidos protocolos de propagação *in vitro* (Cardoso & Oliveira, 1996; Moura, 1998; Murch *et al.*, 2000; Pretto & Santarem, 2000); entretanto, este é o primeiro relato sobre a ocorrência de florescimento *in vitro* neste gênero.

A ocorrência de florescimento *in vitro* pode ser uma vantagem no estudo das bases moleculares da regulação hormonal do florescimento e os fatores fisiológicos que controlam as transformações do meristema vegetativo em meristema floral (Dickens & Van Staden, 1990). Também, há possibilidades de se realizarem estudos ecológicos e genéticos, e estudos sobre a polaridade, citologia, bioquímica, e determinar os fatores internos e externos que afetam o florescimento (Lang & Halery, 1989), assim como é uma técnica que poderia ser utilizada nos programas de hibridização (Franklin *et al.*, 2000).

No capítulo 1 deste trabalho, verificou-se que a maior produção de compostos fenólicos ocorria quando as plantas de *H. brasiliense* encontravam-se em florescimento. Então, a ocorrência do florescimento *in vitro*, nesta espécie, também permite o estabelecimento de um modelo para a realização de trabalhos sobre a

regulação dos diferentes metabólitos secundários produzidos por esta espécie, durante o florescimento.

Os explantes oriundos de matrizes juvenis proporcionaram o desenvolvimento de plântulas com aproximadamente 12 cm, num prazo de 20 dias. Em condições de casa de vegetação, leva-se em torno de seis meses para uma planta atingir em torno de 15 cm (dados observados durante a condução das plantas em casa de vegetação). Portanto, a utilização da técnica seria muito viável para a produção de mudas de *H. brasiliense* em grande escala, num curto período de tempo, com posterior aclimação *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, I.N., 1998. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Tese de mestrado. Universidade Federal de Lavras – Lavras – MG/ Brasil.
- Alfenas, A.C., 1998. Eletroforese de isozimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Editora Viçosa. 2 ed., 574p.
- Arnholdt-Schmitt, B., 2000. RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum*. L.Theor. Appl. Genet. 100: (6) 906-911.
- Bonga, J.M.; Durzan, D.J. (ed), 1987. Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 422p.
- Brutovská, R.; Cellorová, E.; Dolezel, J., 1998. Cytogenetic variability of *in vitro* regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. Plant Sci. 133: 221-229.
- Cardoso, M.A.; Oliveira, D.E., 1996. Tissue culture of *H. brasiliense* Choise: shoot multiplication and callus induction. Plant Cell Tissue Organ Cult. 44(2):91-94.
- Carew, D.P.; Staba, E.J., 1965. Plant Tissue Culture - Its fundamentals application and relationship to medicinal plant studies. Lloydia 28(1):1.
- Cellarová, E.; Kimakova, K.; Brutovska, R., 1992. Multiple shoot formation and phenotypic changes of R0 regenerants in *Hypericum perforatum*. Acta Biotechnol. 12(6):445-452.

- Clayton J.; Tretiak, D., 1972. Amine - citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. J. Fisheries Res. Board Can. 29:1169 - 1172.
- Cook, E.L.; Cunningham, A.; Vanstaden, J., 1988. The Tissue-Culture of an exploited Zulu Medicinal Plant, *Bowiea volubilis*. South Afric. J. Bot. 54(5):509-510.
- Dickens, C.W.S.; Van Staden, J., 1990. The induction and invocation of flowering *in vitro*. South Afric. J. Bot. 54:325-344.
- Franklin, G.; Pius, P.K.; Ignacimuthu, S., 2000. Factors *in vitro* flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.). Euphytica 115(1):65-73.
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A., 1998. Micropropagação. IN: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas (Torres, A.C., *et al*). ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, p.183.
- Gulati, A.; Bharel, S.; Jain, S.K.; Abdin, M.Z.; Srivastava, P.S., 1996. *In vitro* micropropagation and flowering in *Artemisia annua*. J. Plant Biochem. Biotechnol. 5(1):31-35.
- Hackett, W.P. Juvenility and maturity., 1987. IN: Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology (Bonga, J.M.; Durzan, D.J. ed.). Dordrecht: Martinus Nijhoff. Pp. 216-231.
- Halusková, J.; Cellarová, E., 1997. RFLP analysis of *Hypericum perforatum* L somaclones and their progenies. Euphytica 95: (2) 229-235.
- Jimenez, C.R., 1980. Hipericáceas. Flora Ilustrada Catarinense (Reitz, R. ed). CNPq/IBDF/HBR, Itajaí, pp.1-33.
- Jumin, H.B.; Nito, N., 1995. Embriogenic protoplast cultures of orange jessamine (*Murraya-paniculata*) and their regeneration into plants flowering *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 41(3):277-279.

- Lang, A.; Halery, A.H., 1989. Handbook of flowering. Vol. VI, pp.427-483.
- Lopes, R.C., 1998. Caracterização isozimática, diversidade genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell. Viçosa, MG. Dissertação de Mestrado – UFV, 88p.
- Margara, J., 1969. Tissue aptitude for budding and flowering *in vitro*. Cr. Acad. Sci. D. Nat. 268(5):803.
- Martins, E.R., 1996. Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth. Viçosa, MG. Dissertação de Mestrado – UFV, 97p.
- Mártonfi, P.; Brutovská, R., 1996. Apomixis and Hybridity in *Hypericum perforatum*. Folia geobot. Phytotax. 31: 389-396.
- Matzk, F.; Meister, A.; Brutovska, R.; Schubert, I., 2001. Reconstruction of reproductive in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. The Plant J. 26 (3): 275-282.
- Matzk, F.; Meister, A.; Schubert, I., 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocccots and dicots. The Plant J. 21(1):97-108.
- McCartan, S.A.; Van Staden, J., 1998. Micropropagation of the medicinal plant, *Scilla natalensis* Planch. Plant Growth Regul. 25(3):177-180.
- Moura, M., 1998. Conservation of *Hypericum foliosum* Aiton, an endemic Azorean species, by micropropagation. *In vitro* Cell. Develop. Biol. - Plant 34(3):244-248.
- Murashige, T.; Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

- Murch, S.J.; Choffe, K.L.; Victor, J.M.R.; Slimmon, T.Y., 2000. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*, cv 'Anthos'). *Plant Cell Rep.* 19(6):576-581.
- Nodai, R.O.; Guerra, M.P., 1999. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. IN: *Farmacognosia da planta ao medicamento* (Simões, C.M.O., *et al.*), ed. Da Universidade, pp.25-38.
- Palevitch, D., 1991. Agronomy applied to medicinal plant conservation. IN: *Conservation of medicinal plant* (Akerlele, O. *et al.*). New York, Cambridge University Press, p.167-178.
- Pimentel Gomes, F., 1987. *Curso de Estatística Experimental*. 12ed, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, 467p.
- Pretto, F.R.; Santarem, E.R., 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 62(2):107-113.
- Reis, M.S.; Mariot, A., 1999. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. IN: *Farmacognosia da planta ao medicamento* (Simões, C.M.O., *et al.*), ed. Da Universidade, pp.39-60.
- Robson, N.K.B., 1981. Studies in the genus *Hypericum* L. (Gutiferae). Characters of the genus. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 8(2):55-226.
- Robson, N.K.B., 1987. Studies in the genus *Hypericum* L. (Gutiferae) 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 20(1):1-151.
- Robson, N.K.B.; Adams, P., 1968. Chromosome numbers in *Hypericum* and related genera. *Brittonia* 20: 95-106.
- Rout, G.R.; Samantaray, S.; Das, P., 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plant. *Biotech. Adv.* 18: 91-129.

- Sehgal, A.; Ram, H.Y.M.; Bhatt, J.R., 1993. *In vitro* germination, growth, morphogenesis and flowering of an aquatic angiosperm, *Polypleurum-stylosum* (Rodostemaceae). Aquatic Bot. 45(4):269-283.
- Steck, N.; Messmer, M.; Schaffner, W.; Bueter, K.B., 2001. Molecular markers as a tool to verify sexual and apomictic off-spring of intraspecific crosses in *Hypericum perforatum*. Planta Med. 67: 384-385.
- Stuber C. W.; Goodman M. M.; Johnson F. M., 1977. Genetic control and racial variation of β -glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). Biochem. Genet. 15:383-394.
- Sun M.; Ganders F. R. 1990. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. Heredity 64:139-143
- Urbanova, M.; Cellarova, E.; Kimakova, K., 2002. Chromosome number stability and mitotic activity of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. meristems. Plant Cell Rep. 20 (11): 1082-1086.
- Zschocke, S.; Van Staden, J., 2000. *In vitro* propagation of *Tulbaghia simmLeri*. South Afric. J. Bot. 66(1):86-89.

Capítulo 3

Composição do óleo essencial de *Hypericum brasiliense*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, existe grande interesse em se estudar a composição do óleo essencial de *H. perforatum*, uma vez que ele apresenta efeitos comprovados no tratamento de machucados, queimaduras, mialgia (Schempp *et al.*, 2002), além das atividades antifúngica e bactericida (Gudzic *et al.*, 1997; Nahrstedt & Butterweck, 1997). O óleo é atualmente comercializado nos Estados Unidos e Europa, chegando a custar U\$ 10,00/mL do óleo puro (www.tobinfarms.com/st-johns-wort-oil).

Com base nestes dados, outras espécies começaram a ter a composição dos seus óleos estudada, sempre tendo como base a comparação com as substâncias encontradas no óleo de *H. perforatum* (Santos *et al.*, 1999; Bertoli *et al.*, 2000; Couladis *et al.*, 2001; Gudzic *et al.*, 2001; Sajjadi *et al.*, 2001).

Apesar de serem encontrados na literatura trabalhos fitoquímicos com *H. brasiliense* (Rocha *et al.*, 1994; 1995; 1996), até o momento não existem informações sobre a composição do seu óleo essencial.

Os óleos essenciais são misturas complexas de muitas substâncias, principalmente dos grupos mono e sesquiterpenos, fenilpropanóides e substâncias alifáticas. A composição de um óleo essencial é influenciada pelas mudanças climáticas durante o crescimento da planta e da existência de quemo-tipos, que poderiam produzir óleos com a composição química totalmente diferente (Pauli, 2002).

O método mais utilizado para análise da composição química de um óleo essencial é através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os dados gerados no espectrômetro de massas podem então ser comparados com

aqueles constantes em bibliotecas, contendo os espectros de diversos padrões, permitindo certo grau de identificação. Entretanto, essa identificação ocorre a partir de uma estimativa em porcentagem que nem sempre é precisa. Então, uma outra maneira de fazer a identificação das substâncias é através da co-injeção da amostra com uma mistura de hidrocarbonetos e realizar a determinação do índice relativo de retenção (Van Den Dool, 1963), o qual pode ser comparado com o índice de Kovats (1965) (IK), encontrado na literatura, para cada substância. Desta maneira, os padrões de fragmentação podem ser comparados e o composto identificado.

2. OBJETIVO

Caracterizar a composição química do óleo essencial de *H. brasiliense*, através de análises em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

O material vegetal foi coletado em 1999, na cidade de Ibiúna – SP, do qual uma excisata foi depositada no herbário do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo.

3.2. Extração

Após secagem ao ar, o material vegetal (100 g de planta inteira) foi submetido a hidrodestilação por 3,0 horas, utilizando-se um extrator do tipo Clevenger. O óleo foi armazenado a 4°C.

3.3. Análises por cromatografia gasosa-espectrometria de massa

As análises foram realizadas utilizando um equipamento Hewlett-Packard (HP-5990/5970) munido de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 :m, J & W Scientific). As análises foram realizadas com programas de aquecimento a partir de 50°C até 290°C (4°C/min). As temperaturas do injetor e detector de ionização de chama (FID) foram mantidas a 220 e 285°C, respectivamente. Hélio foi utilizado como gás de arraste (1,16 mL/min), no modo “split”. O volume injetado foi de 0,5 :L de uma solução contendo, aproximadamente, 10 mg de óleo essencial por mL de acetato de etila. Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV e a velocidade de varredura de 0,84 scan/sec de m/z 40 para 550. Os componentes do óleo foram inicialmente identificados a partir da biblioteca Wiley MS Data Library (National Institute of Standards and Technology / Wiley Library - Wiley 275).

3.4. Identificação das substâncias

A identificação das substâncias foi realizada através de co-injeção do óleo com uma mistura homogênea de hidrocarbonetos de cadeia longa linear contendo de C₁₀ a C₂₁, onde foi possível calcular o índice de retenção relativo para cada substância, através do método de Van Den Dool & Kratz (1963), utilizando a equação:

$$IR = \frac{\Delta n \cdot 100 \cdot T_{RA} - T_{RHA}}{T_{RHD} - T_{RHA}} + N \cdot 100$$

Onde:

T_{RA}= tempo de retenção da substância da amostra na co-injeção;

T_{RHA}= tempo de retenção do hidrocarboneto que sai antes;

T_{RHD}= tempo de retenção do hidrocarboneto que sai depois;

Δn= diferença entre o número de carbono do hidrocarboneto que sai antes e depois da substância;

N= quantidade de carbono que tem o hidrocarboneto que sai antes;

A partir dos dados do índice relativo de retenção da amostra (calculado após a co-injeção) e dos espectros de massas, obtidos da biblioteca do massas (National Institute of Standards and Technology / Wiley Library - Wiley 275) foi possível fazer uma comparação com os espectro de massas e IK em coluna DB-5 fornecido pela literatura (Adams, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

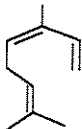
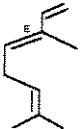
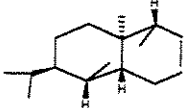
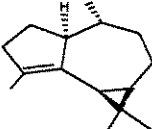
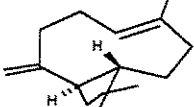
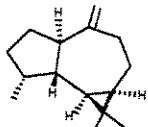
A produção de óleo essencial, a partir do material seco, foi de 0,1 %, apresentando coloração amarelada e odor específico.

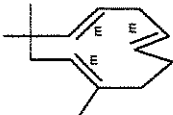
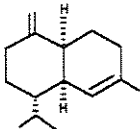
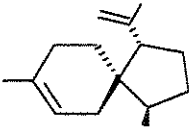
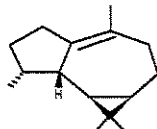
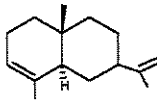
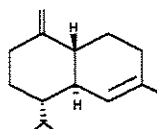
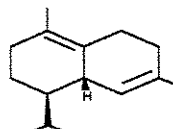
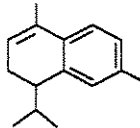
As substâncias identificadas nas análises no CG/EM estão resumidas na tabela 1, com os seus tempos de retenção (TR), índice relativo de retenção calculado (IR), IK e porcentagem (%) no total do óleo. Tais substâncias estão listadas de acordo com a sua ordem de eluição da coluna. Verifica-se que 20 substâncias foram identificadas, as quais representam 94,17 % da composição total do óleo. Aproximadamente 1 % do óleo é constituído por monoterpenos e 93,17 % de sesquiterpenos.

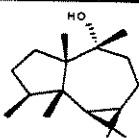
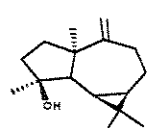
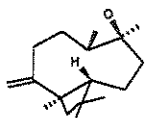
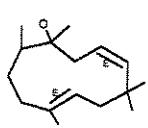
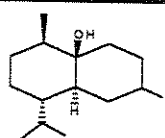
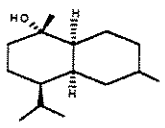
Entre os monoterpenos, o principal representante é o trans-ocimeno (0,99%) e dos sesquiterpenos, o β -Cariofileno (29,53 %), que foi a substância majoritária encontrada no óleo; este sesquiterpeno também representa a maior porcentagem no óleo de *H. perforatum* (14,2 %) (Gudzic *et al.*, 2001), mas é o menor componente do óleo de *H. olympicum* (0,3 %) e *H. foliosum* (1-7 %) (Santos, 1999; Gudzic *et al.*, 2001).

Na tabela 1, verifica-se que os sesquiterpenos oxigenados constituem 12,7 %, sendo o óxido de cariofileno (9,95 %) o maior constituinte desta fração.

Tabela 1. Substâncias identificadas no óleo essencial de *H. brasiliense*, com as suas estruturas, tempo de retenção, índice relativo de retenção calculado (IR), índice de Kovatz (IK) e a porcentagem (%) no óleo essencial.

Composto	Estrutura	TR	IR	IK	%
Cis- Ocimeno		8,286	1033	1040	0,01
Trans-Ocimeno		8,627	1044	1050	0,99
α - Copaeno		19,949	1370	1376	0,66
α -Gurjuneno		20,973	1404	1409	0,91
β -cariofileno		21,428	1418	1418	29,53
Aromadendreno		21,997	1434	1439	7,152

α - Humuleno		22,566	1454	1454	12,736
γ -Muuroleno		23,021	1465	1477	T
Acoradieno		23,192	1471	1466	1,78
Ledeno		23,704	1487	1493	6,43
α - Selineno		23,875	1493	1494	T
γ -Cadinene		24,444	1511	1513	4,41
Δ - Cadineno		24,557	1515	1524	T
α - Calacorene		25,297	1537	1542	0,60

Ledol		25,809	1559	1565	5,70
Espatuleno		26,378	1576	1576	0,01
Óxido de Cariofileno		26,492	1581	1581	9,95
Humuleno Epóxido II		27,402	1608	1606	2,75
Cubenol		28,369	1641	1642	7,46
Epi α - Muurolol		28,768	1655	1641	2,28

t = traço (<0,01%)

As substâncias γ -Muuroleno, Ledeno, Ledol e epi α -Muurolol foram identificadas por comparação dos espectros obtidos a partir da biblioteca de massas (Wiley) com os espectros encontrados na literatura para eluição em coluna DB-5 (Adams, 1995). Aproximadamente 50 % das substâncias identificadas no óleo de *H. brasiliense* diferem das encontradas no óleo de *H. perforatum*: cis-ocimeno, α -gurgujeno, aromadendreno, acoradieno, ledeno, α -selineno, α -calacoreno, ledol, óxido de cariofileno, epi-muurolol (Gudzic *et al.*, 2001). Destas, com exceção das substâncias ledol, α -selineno e acoradieno, as demais são encontradas nos óleos de

H. perfoliatum, *H. olympicum*, *H. hircinum* (Gudzic, et al., 2001; Couladis et al., 2001; Bertoli et al., 2000).

A composição dos óleos essenciais, de maneira geral, é afetada pelas condições de crescimento e desenvolvimento em que as plantas se encontram, idade, estágio de desenvolvimento, condições edafoclimáticas e interações do tipo planta-patógeno (Sangwan et al., 2001). Por essa razão, podem ocorrer variações na composição química quando são comparadas diferentes espécies cultivadas em regiões distintas.

Em torno de 52 % do óleo de *H. brasiliense* é composto por β -cariofileno (29,53 %), α -cariofileno (α -humuleno) (12,74 %) e óxido de cariofileno (9,95 %). Compostos que apresentaram elevada atividade no controle de fungos utilizados como alimento das formigas cortadeiras (*Atta cephalotes*), as quais são herbívoros causadores de grandes prejuízos na agricultura (Hubbel et al, 1983); atividade antialérgica (Tanaka et al, 1996) e anticarcinogênica (Zheng, 1992).

Os resultados obtidos a partir deste trabalho demonstram que a produção do óleo (0,1 %) nesta espécie é inferior à das demais espécies estudadas no gênero, que varia de 0,25 a 0,45 % e que, predominantemente, é composto por sesquiterpenos.

Estudos posteriores são necessários para avaliar o potencial terapêutico do óleo essencial desta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P., 1995. Identification of Essential Oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured: Carol Stream, IL, 469p.
- Bertoli, A; Pistelli, L.; Morelli, I.; Spinelli, G; Menichini, F., 2000. Constituents of *Hypericum hircinum* oils. J. Ess. Oil Res. 12(5):617-620.
- Couladis, M.; Baziou, P., Petrakis, P.V.; Harvala, C., 2001. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece. Flav. Frag. J. 16:204-206.
- Gudzic, B.; Dordevic, S.; Palic, R.; Stojanovic, G., 2001. Essential oil of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum*. Flav. Frag. J. 16:201-203.
- Gudzic, B.; Nedeljkovic, J.M.; Dordevic, S.; Comor, J.J., 1997. Composition and antimicrobial activity of essential oil of Hyperici herb (*Hypericum perforatum*) from Vlasina region. Physics, Chemistry and Technology. 1 (4):47-51.
- Hubbell, S.P.; Wiemer, D.F.; Adejare, A., 1983. An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*atta*). Oecologia 60:321-327.
- Kovats, E., 1965. Advances in Chromatography, vol.1, J.C. Giddings and R.A. Keller (eds), New York, NY, p. 229 – 247.
- Nahrstedt, A; Butterweck, V., 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. Pharmacopsychiatry 30:129-134.
- Pauli, A., 2002. AMICBASE-EssOil - update-information. ReviewScience, all rights reserved. Disponível na internet: www.reviewscience.com

- Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M.; Stoecklievans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K., 1994. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 36(6):1381-1385.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Evans, H.; Hostettmann, K., 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoid from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 40(5):1447-1452.
- Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Hostettmann, K., 1996. More Phoroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 42(1):185-188.
- Sajjadi, S.E.; Rahiminezhad, M.R.; Mehregan, I.; Poorassar, A., 2001. Constituents of essential oil of *Hypericum dogonbadanicum* Assadi. *J. Ess. Oil Res.* 13(1): 43-44.
- Sangwan, N.S.; Farooqi, A.H.A.; Shadih, F.; Sangwan, R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* 34(01):3-21.
- Santos, P.A.G.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Scheffer, J.J.C., 1999. Composition of the essential oil of *Hypericum foliosum* Aiton from five Azorean islands. *Flav. Fragr. J.* 14(5):283-286.
- Schempp, C.M.; Muller, K.A.; Winghofer, B.; Schopf, E.; Simon, J.C., 2002. Saint John's wort in dermatology. *Hautarzt* 53(5):316.
- Tanaka, S.; Akimoto, M.; Tambe, Y.; Tabata, M.; Ikeshiro, Y., 1996. Volatile antiallergic principles from a traditional herbal prescription of Kampo medicine. *Phytother. Res.* 10(3):238-241.
- Van Den Dool, H.; Kratz, P.D.J.A., 1963. *J. Chromatography.* 11:463-7.

Zheng, G.G; Kenney, P.M.; Lam, L.K.T., 1992. Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. J. Nat. Prod. 55(7):999-1003.

4. CONCLUSÕES FINAIS

Têm – se como conclusões deste estudo que o metabolismo secundário das plantas de *H. brasiliense* respondeu positivamente aos estresses, sendo que desta maneira pode-se atribuir uma correlação inversa entre o crescimento da planta e a produção dos metabólitos secundários estudados.

Estas plantas quando, em estágio de floração, promovem maior acúmulo de compostos fenólicos, porém quando em frutificação há o predomínio de ácido betulínico.

A baixa variabilidade genética na população em estudo pode ser uma vantagem em experimentações, embora futuros trabalhos visando o melhorando da mesma, tornam-se necessários como forma de selecionar indivíduos, potencialmente superiores para a produção de metabólitos secundários.

O óleo essencial da espécie estudada apresentou compostos de interesse farmacológico, mas estudos posteriores, utilizando ensaios biológicos, são necessários para a sua real comprovação.