

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LUIZ CARLOS DE CERQUEIRA CESAR FILHO

**EFEITOS DO ÁCIDO JASMÔNICO E DO SULFATO DE
COBRE SOBRE OS TEORES DAS LIGNANAS DE**
Phyllanthus amarus Schum. & Thonn

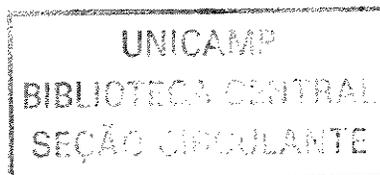
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luiz Carlos de Cerqueira
Cesar Filho
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para
a obtenção do título de Mestre em Biologia
Vegetal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Garcia Rehder

2003

i



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	C 337 e
V	EX
TOMBO BC	56591
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00192B63-3

Bib id 307085

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

C337e

Cesar Filho, Luiz Carlos de Cerqueira

Efeitos do ácido jasmônico e do sulfato de cobre sobre os teores das lignanas de *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn / Luiz Carlos de Cerqueira Cesar Filho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientadora: Vera Lúcia Garcia Rehder
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Bioquímica. 2. Fisiologia vegetal. 3. Biosíntese. 4. Metabolismo.
5. Desenvolvimento. I. Rehder, Vera Lúcia. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela benção da vida.

A Jesus Cristo, o Mestre que me ensina a viver e me dá forças morais para superar os embates da Vida.

A todas as pessoas que já passaram pela minha vida e que me influenciaram de alguma maneira, contribuindo para o meu aperfeiçoamento.

Aos meus antepassados, pela herança moral e cultural que me deixaram e, particularmente aos meus pais, pelos seus exemplos e esforços que fizeram por mim.

À minha esposa Crista e meus filhos João e Anália pelo amor, compreensão e pelas horas que me doaram para que pudesse realizar este trabalho.

À Profª Drª Vera Lúcia Garcia Rehder pela orientação, paciência e amizade.

Aos professores que participaram da pré-banca de defesa da dissertação: Eduardo Caruso Machado, Jorge Vega e Pedro Melillo de Magalhães, pelas sugestões que aperfeiçoaram este trabalho.

Aos amigos do CPQBA, da Divisão de Agrotecnologia e da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, que tanto me ajudaram, particularmente às amigas Marili Villa Nova Rodrigues e Adriana da Silva Santos, pelo valioso auxílio nas análises cromatográficas.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Norman G. Lewis, da Universidade de Washington, pelo material graciosamente enviado a respeito da biossíntese das lignanas.

ÍNDICE

Abreviaturas	vi
Resumo	vii
Summary	ix
1. Introdução Geral	1
2. Objetivos Gerais	17
3. Referências Bibliográficas	79
Capítulo I: Efeitos do ácido jasmônico nos teores das lignanas de <i>Phyllanthus</i>	18
<i>amarus</i> Schum. & Thonn	
1. Introdução	18
2. Objetivos	25
3. Material e Métodos	26
4. Resultados	32
5. Discussão	51
6. Conclusão	58
Capítulo II: Efeitos do sulfato de cobre nos teores das lignanas de <i>Phyllanthus</i>	59
<i>amarus</i> Schum. & Thonn	
1. Introdução	59
2. Objetivos	63
3. Material e Métodos	64
4. Resultados	68
5. Discussão	76
6. Conclusão	78

ABREVIATURAS

AJ	Ácido jasmônico
AS	Ácido salicílico
CAT	Catalase
CHS	Chalcona sintase
CLAE/ UV (HPLC)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com detector ultravioleta
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
MeJa	Metiljasmonato
PAL	Fenilalanina amonia-liase
POD	Peroxidase
PPO	Polifenoloxidase
PS 1/2	Fotossistemas 1 e 2
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUBISCO	Ribulose-1,5-bifosfato
SAR	Resistência sistêmica adquirida
SIR	Resistência sistêmica induzida
SKDH	Chiquimato dehidrogenase

RESUMO

Phyllanthus amarus Schum. & Thonn é uma planta que habita regiões tropicais e subtropicais, sendo utilizada como medicamento por diversos povos. Sua ação medicinal é consequência dos distintos metabólitos secundários produzidos por ela, que, dentre estes, contém grande variedade de lignanas, dímeros provenientes da via fenilpropanóide, substâncias que agem contra diferentes microrganismos e participam das defesas vegetais.

Os objetivos deste trabalho foram examinar os efeitos dos eliciadores ácido jasmônico e sulfato de cobre sobre os teores das lignanas filantina, filtetralina, hipofilantina, nirantina e nirtetralina presentes nesta planta, através de análises feitas por CLAE-UV, e empregá-los para diferenciar as duas amostras desta planta.

O tratamento com ácido jasmônico apresentou resultados distintos, de acordo com cada amostra: na amostra A, com teor de filantina 0,16% usada no primeiro ensaio, houve a indução e o acúmulo das lignanas, particularmente da hipofilantina e nirtetralina, elevando o teor médio de hipofilantina em 36,46% após 24 horas, 15,75% depois de 48 horas, e 40,08% após 168 horas; o teor médio de nirtetralina elevou-se em 11,10%, 31,93% e 44,14% após 24, 48 e 168 horas, respectivamente; na amostra B, com teor de filantina 0,76% empregada no segundo ensaio, houve a indução de filantina. Somando-se a isto, houve clorose e abscisão foliar, causando a diminuição da massa fresca, massa seca e massa seca foliar.

O emprego da análise dos teores das lignanas para diferenciar as amostras de *Phyllanthus amarus* mostrou-se eficaz pois elas apresentam perfis bioquímicos diferentes: a amostra com teor de filantina 0,16% apresenta concentrações elevadas de hipofilantina e nirtetralina, enquanto que a amostra com teor de filantina 0,76 apresenta teor elevado desta lignana e de nirantina.

O sulfato de cobre, na concentração utilizada, provocou uma intoxicação aguda das plantas, ocorrendo desidratação e descoloração foliar, culminando com a abscisão das folhas e morte das plantas. Os teores das lignanas foram severamente afetados, ocorrendo a sua diminuição. Concluiu-se que seriam necessários outros pré-testes com concentrações gradativamente menores de sulfato de cobre para se determinar a concentração apropriada para analisar se haveria um efeito indutor do sulfato de cobre sem destruir as plantas.

SUMMARY

Phyllanthus amarus Schum. & Thonn is a plant that lives in tropical and subtropical regions, and it's used as medicine by a number of people. Its medicinal action is the consequence of several secondary metabolites produced by the plant itself, and among them it further contains a large variety of lignans, dimers deriving from the phenylpropanoid via, substances which act against different microorganisms and take part in the defense of plants.

The objectives of this work were to look into the influence of the elicitors jasmonic acid and copper sulfate over the contents of the lignans phyllanthin, phytetralin, hipophyllanthin, niranthin and nirtetralin present in this plant, through analyses carried out by HPLC, and use them to differentiate the two samples of this plant.

The treatment with jasmonic acid has shown distinct results, according to each vegetal sample: in the sample A, with phyllanthin contents 0.16 % used for the first essay, has caused the induction and accumulation of substances, particularly hipophyllanthin and nirtetralin, thus raising the average content of hipophyllanthin at 36.46 % after 24 hours, 15.75 % after 48 hours, and 40.08% after 168 hours; the average content of nirtetralin raised 11.10%, 31.93% and 44.14% after 24, 48 and 168 hours, respectively; in the sample B, with phyllanthin contents 0.76 % used for the second essay, has caused the induction of phyllanthin. In addition, chlorosis and foliar abscission have been noticed, thus causing decrease in the fresh mass, dry mass and dry leaves mass.

The use of the analysis of lignan contents to differentiate the samples has shown to be effective as they show different biochemical profiles: the phyllanthin contents 0,16% sample shows high concentrations of hipophyllanthin and nirtetralin, while the other sample shows a high content of phyllanthin and niranthin.

Copper Sulfate at the concentration used has caused an acute intoxication of the plants with dehydration and foliar discoloration, and culminating with the small leaves abscission and the plants death. Lignan biosynthesis has been seriously affected, and a decrease of their contents has occurred. The conclusion is that it would be necessary other pre-testing with gradually lower concentrations of copper sulfate in order to find out the appropriate concentration, and then check whether it would have an inducing effect over the lignan biosynthesis, thus increasing its contents without destroying the plants.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas são uma fonte rica de substâncias químicas usadas em larga escala na indústria farmacêutica, sendo que muitos destes compostos com propriedades medicinais são metabólitos secundários (Neill *et al.*, 1994). Nas plantas do gênero *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) verificou-se uma significativa variedade destes metabólitos e o seu potencial de aplicação no tratamento de patologias complexas como a hepatite B, cirrose crônica e carcinoma hepatocelular (Ott *et al.*, 1997).

Um grande número de medicamentos atualmente utilizados veio diretamente do uso popular ou tem precedentes nas práticas tradicionais que tiveram atividade medicinal confirmada. Assim, é mais provável encontrar atividades biológicas demonstráveis entre plantas com uso medicinal popular do que entre aquelas que foram selecionadas ao acaso (Unander *et al.*, 1995). De 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são de origem exclusivamente vegetal, além de muitas drogas sintéticas terem sido obtidas de precursores naturais (Rates, 2001).

As plantas do gênero *Phyllanthus* são amplamente distribuídas nos países tropicais e subtropicais, usadas há muito tempo para tratar distúrbios das vias urinárias, digestivas e processos infecciosos. No Brasil, a medicina popular tem usado estas plantas na forma de infusão das folhas, caules e raízes. As espécies mais utilizadas são *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. corcovadensis*, *P. tenellus*, *P. caroliniensis*, *P. fraternus*, *P. stipulatus*, e *P. sellowianus* (Calixto *et al.*, 1998). Os usos populares foram classificados de acordo com a sua ação: antiviral (para hepatite B), antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatória, analgésica, antiespasmódica e diurética (Unander *et al.*, 1991; Unander *et al.*, 1995).

Dentre os vegetais de interesse farmacológico do gênero *Phyllanthus*, a espécie *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn tem ação contra o vírus da hepatite B e propriedades

antineoplásicas (Unander *et al.*, 1992). Testes realizados com *P. amarus* em pacientes portadores de hepatite B mostraram perda de antígenos de superfície para o vírus causador desta doença (Thyagarajan *et al.*, 1988); extratos inibiram a DNA polimerase do vírus B *in vitro* (Blumberg *et al.*, 1990), reduziram ou eliminaram os antígenos superficiais deste vírus em humanos ou os antígenos superficiais do vírus da hepatite da marmota nestes mamíferos (Unander, 1991; Unander & Blumberg, 1991). Recentemente, constatou-se que *P. amarus* suprimiu a transcrição do RNAm do vírus da hepatite B *in vitro* (Ott *et al.*, 1997).

As plantas mais estudadas do gênero *Phyllanthus* foram *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. emblica*, *P. flexuosus*, e *P. sellowianus*, sendo que diferentes classes de metabólitos secundários foram encontrados, e, entre estes, as lignanas, os alcalóides e os taninos foram os mais abundantes. Dentre as lignanas, as que mais amiúde se apresentam são a filantina, hipofilantina, nirantina, fletetralina, hinoquinina e isolintetralina (Calixto *et al.*, 1998).

1.1. Caracterização geral das espécies

A família Euphorbiaceae, uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreende cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Os maiores centros de dispersão encontram-se nas Américas e na África. São vegetais de hábito bastante variado, existindo ervas, arbustos, árvores e trepadeiras. Suas flores são sempre de sexos separados, em geral monoclamídeas, ocorrendo também diclamídeas em plantas monóicas (Joly, 1983). No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, de hábitos e habitat diferentes, difundidas em todos os tipos de vegetação (Barroso, 1991).

Este gênero foi descrito por Linnaeus em 1737, é numeroso, apresentando, aproximadamente, 550 a 750 espécies subdivididas em 11 subgêneros: *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca*, *Emblica*, *Conami*, *Gomphidium*, *Phyllanthodendron*, *Xylophylla*, *Botryanthus*,

Ericocus, e *Phyllanthus*. Acredita-se que cerca de 200 espécies estejam amplamente distribuídas nas Américas, principalmente no Caribe e no Brasil. No Brasil, estas plantas são conhecidas popularmente como quebra-pedra, erva pombinha, arrebeta pedra, etc. (Calixto *et al.*, 1998).

As espécies têm porte herbáceo; a altura varia entre 10 e 50 cm; ramificações filantóides decíduas, com aproximadamente 10 a 25 folhas; folhas membranáceas, elípticas, agudas na extremidade, agudas ou arredondadas na base, com 6 a 25 mm de comprimento; címulas proximais com duas a três flores masculinas, com aproximadamente 3,0 mm de diâmetro, com cinco a seis segmentos de disco nectário, carnosos, papiloso, com três estames soldados até a metade; e três a sete flores femininas, com aproximadamente 4,0 mm de diâmetro, disco pateliforme; ovário tricarpelar, liso; estiletos livres ou unidos na base; o fruto é uma cápsula de 3,5 mm de diâmetro, com sementes papilosas (Becker, 1997).

As sementes de *P. amarus* necessitam de luz para germinar, as mais novas germinam mais lentamente do que as mais velhas (Unander *et al.*, 1995). O crescimento das plantas é relativamente lento no inverno, chegando ao seu tamanho e vigor máximos entre o 5º e o 7º mês depois da sementeira. É aconselhável semeá-las no fim do inverno para se obter a maior biomassa no verão. Em regiões tropicais, cresce espontaneamente em lugares úmidos, rochosos, de preferência ricos em calcáreo (Unander *et al.*, 1993). Todavia, no Brasil, seu crescimento é mais rápido, atingindo o ponto de transplante com 2 meses e o de corte aos 4 meses (Magalhães, P. M., comunicação pessoal).

1.2. Definição e estrutura molecular das lignanas

A primeira definição, dada na passagem do século XIX para o século XX, foi que as lignanas seriam dímeros formados por unidades precursoras C_6C_3 com ligações $\beta - \beta'$ (8-8'),

mas, posteriormente, descobriu-se que existem outros tipos de ligação química (8-5', 8-3', 8-1', etc.). Atualmente sabe-se que as lignanas englobam um largo espectro de modelos estruturais e tamanhos moleculares, constituindo um grupo de compostos fenilpropanóides encontrados em diversas partes da planta, incluindo caules, rizomas, raízes, sementes, óleos e resinas exsudadas, flores, folhas e casca, e as suas quantidades variam de acordo com os tecidos e as espécies (Lewis *et al.*, 1998).

Das cinco lignanas analisadas presentes em *P. amarus*, a filantina e a nirantina pertencem à classe das diarilbutanas, enquanto que a filtetralina, hipofilantina e nirtetralina pertencem à classe das ariltetralinas (Satyanarayana & Venkasterwalu, 1991). As suas estruturas moleculares podem ser visualizadas na figura 1.

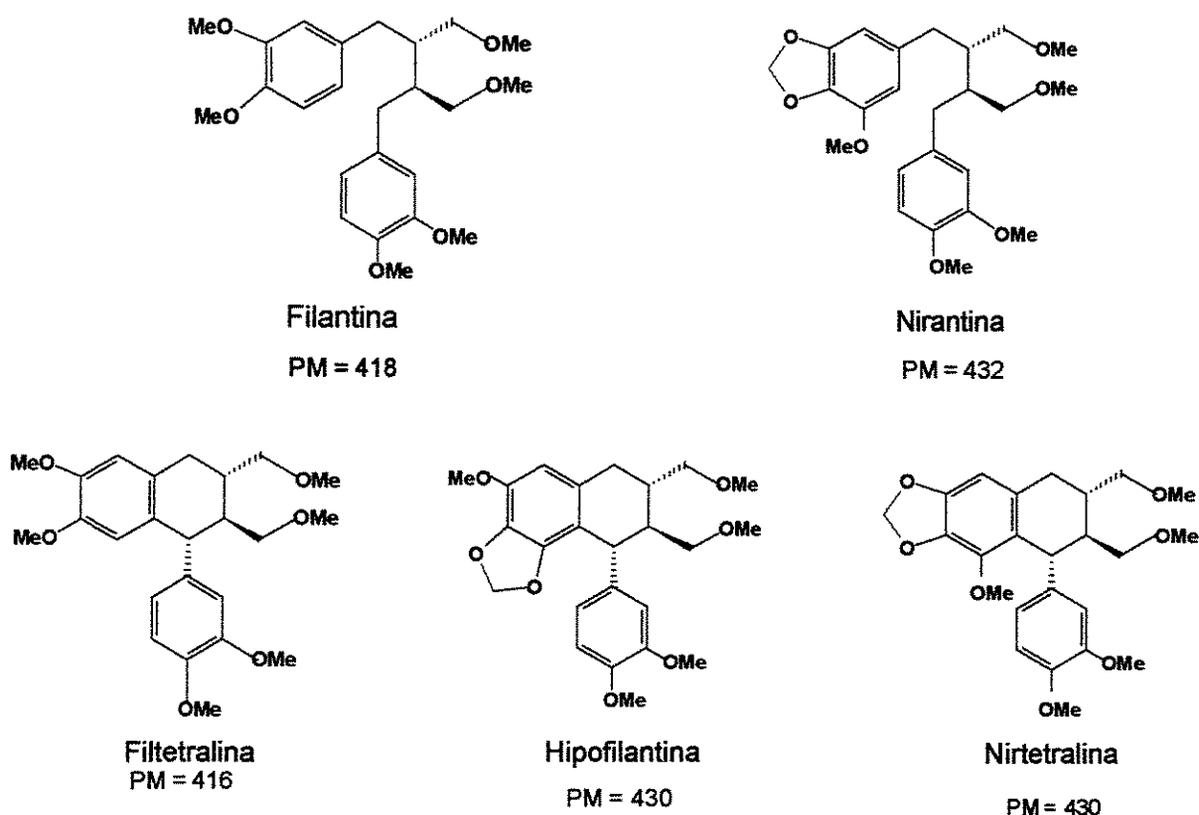


Figura 1. Estrutura molecular das lignanas filantina, filtetralina, hipofilantina, nirantina e nirtetralina presentes na planta *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn.

As lignanas são classificadas segundo a sua estrutura molecular. As mais comuns são as diarilbutanas, tetralinas, furofuranas e 1-fenilnaftalenas. A sua principal característica química é a atividade óptica: a maior parte das lignanas é opticamente ativa (Umezawa *et al.*, 1991). Frequentemente são encontradas em uma espécie de planta uma forma óptica e o seu antípoda é observado em outra espécie. Por exemplo, (+) piroresinol está presente nas espécies de *Forsythia*, enquanto que o seu antípoda (-) ocorre em *Daphne tangutica* (Lewis *et al.*, 1998).

Segundo MacRae & Towers (1984), suas principais atividades farmacológicas são:

1. antitumoral: atividade citostática e citotóxica, tanto *in vivo* como *in vitro*, particularmente provocado pelos derivados da podofilotoxina e análogos, e antimetabólica.

2. ácidos nucleicos: inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em cultura de células, por inibir a difusão facilitada de timidina, uridina, adenosina e guanosina para dentro da célula, além de provocar danos aos cromossomos das células tratadas.

3. antiviral: esta atividade é observada através do uso de extratos de plantas ricas nestas substâncias em pacientes com herpes, condiloma acuminado, sarampo e gripe.

4. antimicrobiana e antimicótica: as lignanas podem inibir o crescimento de certas espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, e *Bacillus subtilis*. Atividade antimicótica foi observada contra *Rhizoctonia solani*, *R. oxysporum*, *Pythium sp.* e *Rhizopus nigrans*.

Elas teriam, ainda, atividade antialérgica, antiinflamatória, hipolipidêmica e alimentos ricos em lignanas diminuiriam a possibilidade do desenvolvimento do câncer de mama, em virtude da sua atividade antiestrogênica (Ward, 1997).

1.3. Distribuição, funções e biossíntese

Elas estão amplamente distribuídas tanto em gimnospermas como em angiospermas. Em 1978, foram citadas em 46 famílias, 87 gêneros e 146 espécies, tendo sido isoladas em

todas as partes da planta, principalmente nos tecidos lenhosos. Não se sabe exatamente o seu local de acúmulo, mas supõe-se que sejam acumuladas no vacúolo e secretadas na parede celular (Umezawa *et al.*, 1991).

Suas funções estão relacionadas primariamente à defesa vegetal, sendo a sua formação constitutiva ou induzida por estresse; seus depósitos contribuem para a durabilidade, cor e qualidade dos tecidos vegetais (Burlat *et al.*, 2001). Assim, suas funções seriam antioxidante, anti-herbívoros, bactericida, fungicida, antiviral, e fitotóxica para outras espécies vegetais (Chu *et al.*, 1993). Existem evidências de que o acúmulo de lignanas em locais lesados inibe as enzimas secretadas por fungos, impedindo a degradação da lignina (Ward, 1997).

Quanto à sua biossíntese, esta ocorre em diferentes etapas, iniciando-se no metabolismo primário, na via do ácido chiquímico, onde se formam os aminoácidos aromáticos a partir de carboidratos provenientes da glicólise e da via da pentose fosfato. A partir da fenilalanina, inicia-se a via fenilpropanóide, que originará os compostos fenólicos e, entre estes, as lignanas e os seus precursores (Lewis *et al.*, 1998).

1.3.1. Via do ácido chiquímico

Ela se inicia com a condensação da D-eritrose-4-fosfato com o fosfoenolpiruvato, cujo produto, sofrendo a ação da enzima bifuncional chiquimato dehidrogenase (SKDH), transforma-se em o ácido chiquímico. Depois de algumas reações, surgirá o ácido prefênico, que, após sofrer uma transaminação, formará o aminoácido fenilalanina (Simões *et al.*, 1999).

Nesta via, a SKDH tem um papel fundamental no controle da biossíntese de compostos fenólicos. Díaz *et al.* (1997) observaram em plântulas de *Capsicum annuum* L. que, quando houve falha da atividade desta enzima nos cotilédones, ocorreu decréscimo na concentração de ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido caféico durante o desenvolvimento de folhas

primárias. Díaz & Merino (1998) constataram que, ao promover ferimentos em plântulas de *Capsicum annuum* L., ocorria aumento na atividade da SKDH, causando acúmulo de lignina.

1.3.2. Via fenilpropanóide

A via fenilpropanóide inicia-se com a eliminação de uma molécula de amônia da fenilalanina produzida na via do ácido chiquímico, originando o ácido cinâmico, primeira substância desta via (fig. 2). A enzima fenilalanina amonialiase (PAL) catalisa esta reação de deaminação, que é um ponto de separação entre o metabolismo primário e secundário, passo fundamental na regulação da biossíntese destas substâncias (Dixon & Paiva, 1995). A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixo teor de nutrientes, luz e infecções. As infecções desencadeiam a transcrição de RNAm que codifica a PAL na planta, assim estimulando a síntese de compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 1998). Observou-se em plantas de alface feridas experimentalmente aumento de 12 vezes da atividade da PAL e acúmulo de compostos fenólicos em 3 dias, alterando, também, a cor das folhas (Saltveit, 2000); constatou-se que folhas de alface cortadas passaram a produzir um sinal molecular a partir do ferimento que induziu a síntese de PAL e acúmulo de compostos fenólicos nas células até 2,0 cm do local do ferimento (Campos-Vargas & Saltveit, 2002). Verificou-se que o aumento da suberização de tubérculos de batata e da lignificação de células de *Pinus taeda* em cultura era acompanhado por aumento da atividade da PAL (Bernards *et al.*, 2000).

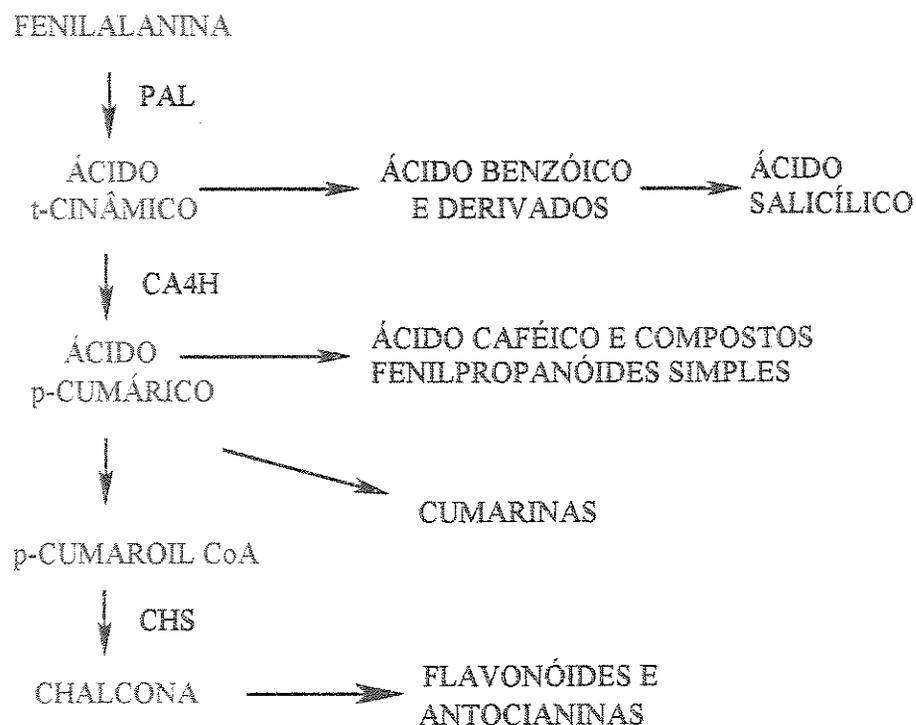


Figura 2. Via fenilpropanóide (azul) e os metabólitos derivados.

Paiva (2000) expôs a relação das substâncias da via fenilpropanóide com os seus derivados e suas respectivas funções nas plantas como segue abaixo:

a) Os derivados benzoatos do ácido cinâmico têm ação antimicrobiana e fitotóxica, podendo estar envolvidos nas interações alelopáticas entre as plantas. O ácido salicílico (AS), um dos seus derivados, tem ação antimicrobiana e participa da transdução de sinais na planta durante o ataque de patógenos.

b) A hidroxilação do ácido cinâmico pela enzima cinamato-4-hidroxilase (CA4H) origina o ácido p-cumárico, que será hidrolisado e metilado para formar os ácidos caféico, ferúlico e sinápico. Estes compostos fenilpropanóides simples servirão de blocos para a construção de polímeros complexos, a suberina e a lignina, com a função de formar barreiras polifenólicas formadas após ferimentos mecânicos ou infecção por patógenos.

c) A partir do ácido cinâmico formam-se compostos fenilpropanóides simples que, dimerizados pela “proteína dirigente”, originarão as lignanas.

d) A orto-hidroxilação do ácido cinâmico produz o ácido orto-cumárico, precursor das cumarinas, que têm ação antimicrobiana e contra herbívoros.

e) Os fenilpropanóides, pela ação da enzima chalcona sintase (CHS), servem como ponto de partida para a síntese de chalconas e flavonóides através da via de condensação do p-cumariol-CoA e malonil-CoA. Estas substâncias protegem as plantas contra a luz ultravioleta, influenciam os estágios iniciais da fixação biológica do nitrogênio nos nódulos das raízes de leguminosas, e desempenham ação antibacteriana e antifúngica.

1.3.3. Biossíntese das lignanas

As unidades fenilpropano formadas na via fenilpropanóide são acopladas, formando dímeros que originarão a estrutura molecular básica das lignanas. Ocorre que estes processos ainda não foram devidamente elucidados nas plantas do gênero *Phyllanthus*. Assim, utilizaremos o modelo de biossíntese de lignanas descoberto na espécie *Forsythia intermedia*, mas que parece servir como um modelo geral da biossíntese destas substâncias (Lewis & Davin, 1998; Lewis *et al.*, 1998).

Segundo este modelo (fig. 3), a biossíntese inicia-se no ácido cinâmico, que é transformado em ácido p-cumárico pela enzima CA4H. O ácido p-cumárico originará o álcool p-cumarílico, o ácido ferúlico, precursor do álcool coniferílico, e o ácido sinápico, precursor do álcool sinapílico. Estes álcoois são os precursores das lignanas derivadas dos monolignóis, assim como da lignina.

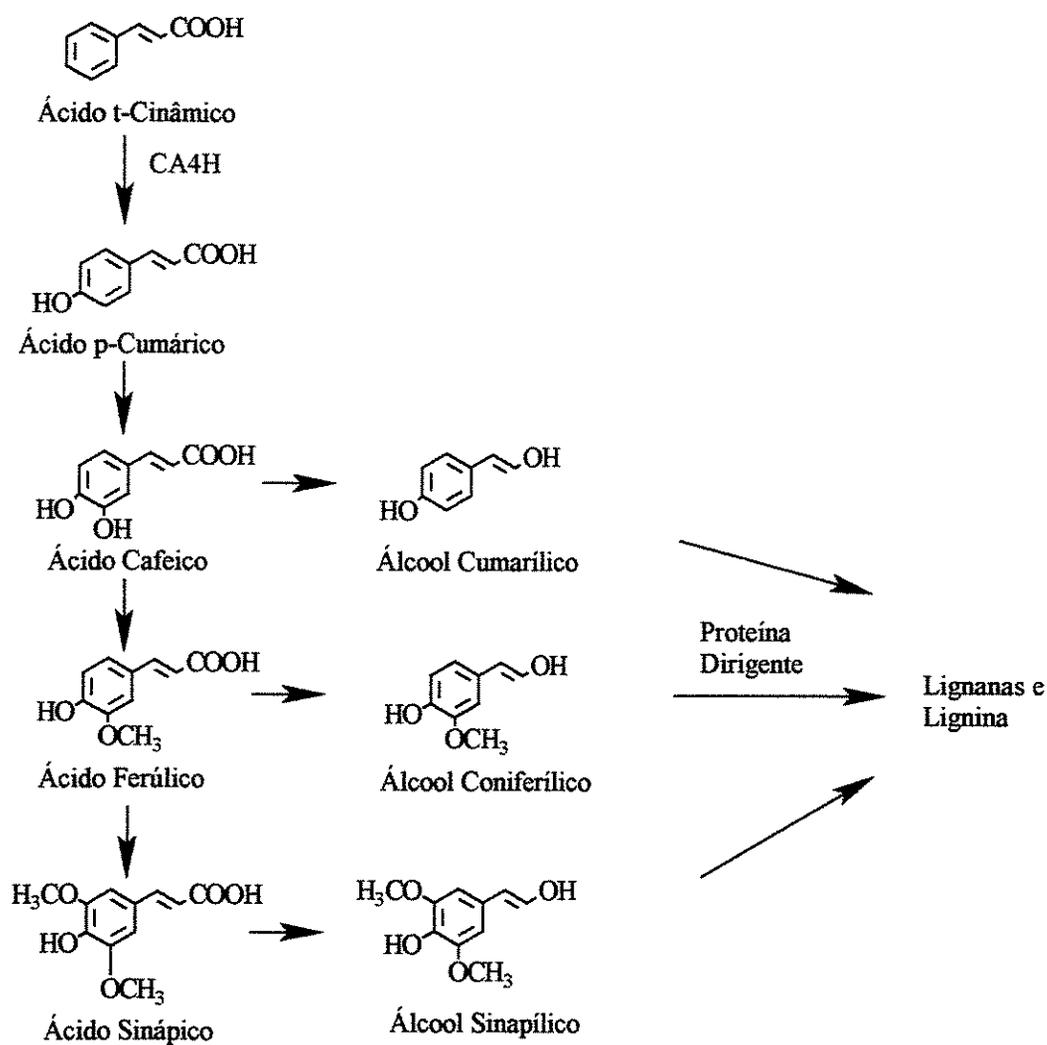


Figura 3. Biossíntese das lignanas derivadas dos monolignóis.

Estes álcoois precursores são as unidades que serão acopladas, processo denominado dimerização, que é controlado pela “proteína dirigente”, uma proteína de 78 Kilodaltons que faz a ligação 8-8’ entre duas unidades fenilpropano. Esta proteína não tem capacidade oxidativa, mas possui sítios que ligam os monômeros com orientação específica, guiando o acoplamento. Esta proteína foi primeiramente isolada na planta *Forsythia intermedia*, a qual produz o enantiômero puro (+) piroresinol, uma lignana dimérica formada a partir de duas moléculas do álcool t-coniferílico. Ela acopla compostos fenólicos simples, gerando o esqueleto básico das moléculas das lignanas. A descoberta desta proteína explica a

especificidade de acoplamento na biossíntese das lignanas e da lignina, um passo fundamental na formação destas substâncias (Lewis *et al.*, 1998). Segundo Lewis (1998) “é evidente que existe uma nova classe de proteínas que é capaz de acoplar de modo específico os distintos monômeros, formando os diferentes esqueletos das lignanas presentes em várias outras espécies de plantas”. Após o acoplamento dos monômeros, ocorrerão outras transformações bioquímicas, tais como oxidações, reduções, demetilações, reações de clivagem de ligações carbono-carbono, etc., que determinarão a estrutura final da molécula. Como a proteína dirigente controla a síntese de lignina e das lignanas, estas substâncias são produzidas e acumuladas nos mesmos tecidos, a lignina para dar rigidez e as lignanas para proteger a planta contra os microrganismos.

1.4. Sistema de defesa nas plantas

As lignanas sintetizadas na via fenilpropanóide têm um papel protetor, sendo elementos participantes da defesa das plantas. Quanto ao sistema de defesa vegetal, ele é dividido em dois tipos de mecanismos: a defesa mecânica pré-formada e a resistência induzida (Menezes & Jared, 2002).

As defesas mecânicas pré-formadas são compostas por barreiras físicas e químicas que detêm o ataque de microrganismos, insetos e herbívoros. O enrijecimento geral da superfície da planta é a forma mais simples desta se defender. Os vegetais também apresentam estruturas especializadas, tais como a cutícula, tricomas e espinhos, que restringem o acesso de insetos e herbívoros às partes mais nutritivas da planta (León *et al.*, 2001). Associadas às barreiras macroscópicas, existem defesas pré-formadas, nas células e tecidos, compostas por estruturas físicas e químicas que buscam impedir a invasão dos microrganismos. A parede celular é a primeira e a principal barreira física, rica em celulose, com uma rede organizada de polissacarídeos, proteínas, e polímeros fenilpropanóides que formam uma camada resistente

em volta da membrana plasmática. As barreiras químicas pré-formadas têm um amplo espectro de substâncias químicas participantes, tais como terpenóides, ácidos hidroxicinâmicos, glicosídeos cianogênicos, peptídeos e compostos fenólicos, agindo contra microrganismos e insetos (Menezes & Jared, 2002).

Além das defesas mecânicas pré-existentes, as plantas também possuem barreiras de defesa bioquímica induzida em resposta a herbívoros e patógenos que tentem invadir a planta. Estas respostas de defesa induzida envolvem a ativação de genes por agentes eliciadores, resultando em duas formas de resposta, local e sistêmica (Menezes & Jared, 2002). Por causa da sua imobilidade, as células vegetais tiveram que se tornar competentes para cada uma fazer as suas respostas de defesa quando lesadas, através da ativação da transcrição de genes específicos. A ativação destas respostas a lesões é dirigida à cura dos tecidos lesados e para a ativação dos mecanismos de defesa que previnam danos futuros. A maioria das respostas induzidas ocorre entre poucos minutos até muitas horas após o ferimento, inclusive a geração, percepção e transdução de sinais específicos para a subsequente ativação dos genes de defesa relacionados ao ferimento. Estes genes de defesa desempenham as seguintes funções: (i) reparação do tecido lesado; (ii) produção de substâncias que inibem o crescimento do inseto predador, como aquelas que diminuem a digestibilidade do tecido vegetal; (iii) participação na ativação de vias de sinais de defesa a ferimentos (León *et al.*, 2001).

1.5. Resistência induzida contra patógenos

A resistência induzida contra patógenos é dividida em dois sistemas distintos: a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e a Resistência Sistêmica Induzida (SIR).

1.5.1. Resistência sistêmica adquirida

A SAR é uma forma de resistência que se desenvolve no local e sistemicamente em resposta ao patógeno que se inicia através de uma lesão necrótica local, que pode ser resultado de uma infecção bem-sucedida ou de uma reação de hiperssensibilidade (HR). A HR acontece em células imediatamente vizinhas ao local da infecção, que morrem imediatamente, privando o patógeno de nutrientes e impedindo a sua passagem para partes não-contaminadas da planta. Esta resistência é efetiva contra uma grande variedade de patógenos e está associada à produção das proteínas PR, enzimas hidrolíticas (quitinases, glucanases, etc.) que atacam a parede celular do fungo ou da bactéria. Além da produção das proteínas PR na resposta local, ocorre, nos primeiros instantes após a lesão, a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) nos tecidos lesados. As ROS servem para matar diretamente o patógeno e contribuem para a morte celular em virtude da peroxidação lipídica e degradação dos ácidos nucleicos.. A SAR envolve também reações sistêmicas, que são feitas através da formação de AS, que age como sinalizador para que todas as demais células produzam fitoalexinas (León *et al.*, 2001).

1.5.2. Resistência sistêmica induzida

A SIR é um fenômeno no qual a resistência aos patógenos é induzida sistemicamente por uma infecção localizada, pelo tratamento com componentes ou produtos microbianos, ou por um grupo diverso de compostos orgânicos ou inorgânicos não-relacionados. O processo pelo qual a planta se torna resistente é ativo: após o estímulo, a planta sintetiza e acumula compostos que contribuem para o aumento da resistência, respondendo rapidamente às infecções (Kué, 2000). Um exemplo de resistência induzida é a resposta à colonização das raízes das plantas por certas bactérias rizóforas, conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento da planta. Este tipo de resistência é mediado pela via do AJ/Etileno, e não envolve a expressão das proteínas PR (Hammerschmidt, 1999).

Todavia, alguns pesquisadores observaram que patógenos diferentes ativam vias diferentes e específicas para cada patógeno. Em ensaios feitos por Thomma *et al.* (1998), verificou-se que em *Arabidopsis thaliana* deu-se a ativação de genes diferentes após a infecção por patógenos distintos, ocorrendo, também, a síntese de AJ pelas plantas para alguns patógenos e de AS para outros, demonstrando que estas vias são ativadas de acordo com o patógeno infectante.

1.6. Resistência induzida contra herbívoros

As lesões locais provocadas por herbívoros ativam os mecanismos de defesa em toda a planta, tanto nos tecidos diretamente danificados (resposta local) e nas áreas não-danificadas (resposta sistêmica). Enquanto a cura ou a reparação do tecido lesado é uma função relacionada a respostas locais, as defesas contra o herbívoro são locais e sistêmicas, com mudanças metabólicas e indução da expressão de genes (León *et al.*, 2001).

As plantas se defendem contra herbívoros através da produção de proteínas inibidoras de proteinase, que bloqueiam a ação proteolítica das enzimas digestivas do predador (Taiz & Zeiger, 1998). A aplicação tópica de ácido linolêico, de intermediários da via octadecanóide, ou de AJ e seus derivados ativam os genes de defesa, expressando estas proteínas (Doares *et al.*, 1995). Cohen *et al.* (1993) confirmaram que a aplicação de AJ e MeJA em folhas de tomateiro e batateira causou aumento dos níveis de duas proteínas inibidoras da proteinase. O MeJA é, também, uma molécula sinalizadora volátil, produzida na planta afetada, e que atingirá outras plantas não-afetadas. Constatou-se que o MeJA, aplicado na superfície de folhas de tomateiro, induziu a síntese de proteínas inibidoras da proteinase, tanto nas plantas tratadas como nas que estavam ao redor, não-tratadas (Farmer & Ryan, 1990).

A resposta sistêmica das plantas contra a ação de herbívoros envolve a ação de duas moléculas sinalizadoras: o oligopeptídeo sistemina e o AJ. Todavia, apesar das evidências de

que a sistemina é um sinal primário transmissível a longa distância, a sua existência e função estão bem documentadas somente em solanáceas (León *et al.*, 2001). A sistemina é liberada pela célula lesada e, rapidamente, se difunde por toda a folha e, pelo floema, atinge as demais folhas da planta, atuando sobre receptores que ativam a via octadecanóide, iniciando a síntese de AJ que induzirá a produção das proteínas inibidoras da proteinase (Ryan & Pearce, 1998).

O papel da sistemina na ativação das respostas a ferimentos está fortemente ligado, em plantas solanáceas, ao acúmulo local e sistêmico de altas concentrações de AJ e ácido abscísico (ABA), hormônios vegetais que medeiam a expressão de genes ativados por ferimentos, através de uma via de transdução de sinais aparentemente unificada. Estes aumentos dos teores de AJ e ABA estão provavelmente relacionados à indução pelo ferimento, provocando nova síntese destes hormônios, que, no caso do ABA, possivelmente estará relacionado com a dessecação da folha lesada, apesar de não ser conhecido qual passo na sua biossíntese é ativado pelo ferimento mecânico. Por outro lado, AJ é sintetizado através da via octadecanóide, tendo como precursor o ácido linolêico. Desde que a aplicação deste ácido em tomateiros produziu resultados semelhantes aos da indução dos genes de AJ, deduziu-se que a liberação de ácidos graxos da membrana lipídica é um ponto fundamental na biossíntese de AJ (León *et al.*, 2001). Mutantes de *Arabidopsis* deficientes em ácido linolêico apresentaram mortalidade de 80% após o ataque da larva do inseto *Bradysia impatiens*. Com a aplicação exógena de MeJa, a mortalidade foi reduzida para aproximadamente 12% (McConn *et al.*, 1997). Uma vez ativadas as vias de sinalização de defesa, os genes de defesa serão ativados, promovendo a síntese das proteínas inibidoras da proteinase e síntese das enzimas polifenoxidase (PPO), peroxidase (PODs) e PAL (Walling, 2000).

Em resposta a injúrias mecânicas, as plantas também produzem etileno através da ativação da transcrição dos respectivos genes da sua biossíntese (León *et al.*, 2001). Xu *et al.* (1994) observaram que a combinação do etileno com MeJa apresentou uma ação sinérgica

indutora sobre os grupos 1 e 5 da superfamília dos genes de defesa relacionados à patogênese (PR), genes que não são regulados pelo MeJa, causando a indução e produção de proteínas PR em plântulas de tabaco, apresentando atividade antifúngica. Penninckx *et al.* (1998) observaram que, para a ativação do gene da defensina *PDF1.2* em *Arabidopsis* por patógenos, é necessário que as vias sinalizadoras do etileno e MeJa atuem concomitantemente, demonstrando a interdependência destas vias (León *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste trabalho foram:

- observar se os eliciadores ácido jasmônico (biótico) e o sulfato de cobre (abiótico) afetariam os teores das lignanas presentes em *P. amarus*, analisando os teores de filantina, fletetralina, hipofilantina, niranina e nirtetralina por CLAE-UV;
- utilizar a análise destas lignanas para comparar as duas amostras de *P. amarus*

CAPÍTULO I - EFEITOS DO ÁCIDO JASMÔNICO NOS TEORES DAS LIGNANAS DE *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn

1. INTRODUÇÃO

O AJ e o seu metil-éster, o MeJa, são moléculas sinalizadoras e reguladoras derivadas do ácido linoléico, amplamente distribuídas nas plantas (Binns *et al.*, 2001). Conforme a citação de Schaller (2001), Demole isolou o MeJA do jasmineiro em 1962, sendo a sua principal fragrância, e o AJ foi identificado simultaneamente em filtrados de cultura do fungo *Botryodiplodia theobromae*. A sua via metabólica foi descrita por Vick & Zimmermann (1984), e Farmer & Ryan (1990) expuseram a ação do jasmonato sobre o crescimento, a senescência e como um sinalizador na defesa induzida por ferimentos. O AJ altera a expressão dos genes de defesa, os mesmos que são ativados por ferimentos e eliciadores que causam acúmulo de AJ e MeJa (Creelman & Mullet, 1997). Seus níveis médios estão em torno de 0,01-3,0 µg/g, e é somente um dos compostos bioativos dentre a classe dos compostos octadecanóides que regulam um grande número de respostas das plantas (Schaller, 2001).

O AJ possui dois centros quirais localizados em C3 e C7, ocorrendo quatro possibilidades de estereoisômeros: (+)-7-iso-AJ e (-)-7-iso-AJ na orientação trans, (-)-AJ e (+)-AJ na orientação cis (fig. 4). A orientação cis é menos estável e epimeriza para a configuração trans, mais estável. O equilíbrio da concentração real dos isômeros na planta é desconhecido. As concentrações de AJ variam com a função do tecido, do tipo da célula, estágio de desenvolvimento e em resposta aos diferentes estímulos ambientais. Seu teor é baixo em sementes de soja e, em plântulas de soja, ele é mais elevado no epicótilo, por ser uma zona de divisão celular, e em plúmulas jovens, comparadas com a zona de alongamento celular, e regiões mais maduras do caule, folhas mais velhas e raízes. As maiores

concentrações foram encontrados em flores e tecidos do pericarpo das estruturas reprodutoras. (Creelman & Mullet, 1997).

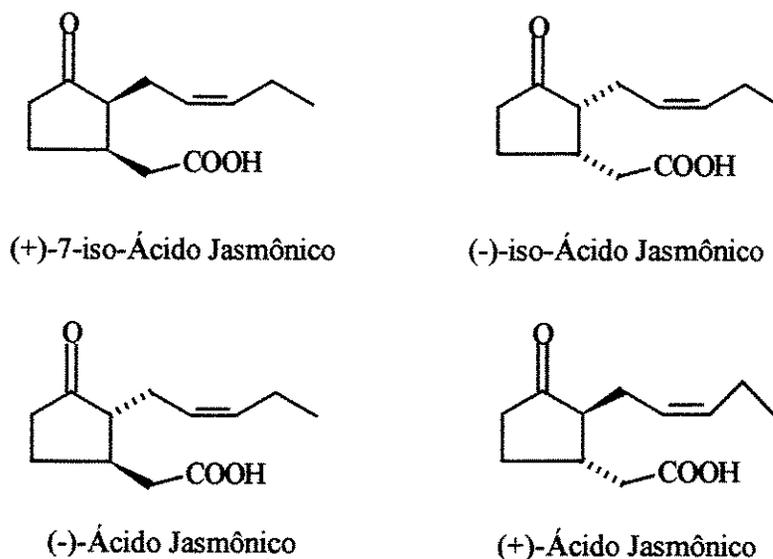


Figura 4. Estrutura molecular do ácido jasmônico e seus isômeros.

As concentrações de AJ e MeJa são rápida e transitoriamente aumentadas por perturbações mecânicas. O crescimento da raiz no solo pode induzir acúmulo de JA, causando inibição do seu crescimento. Outras perturbações mecânicas, envolvendo vento ou toque, induzem mudanças no crescimento que podem ser mediadas em parte por esta substâncias. O AJ acumula-se em resposta a ferimentos, assim como o seu acúmulo pode ser induzido em culturas de células e em plantas por oligossacarídeos derivados das paredes celulares da própria planta, por eliciadores tais como as quitosanas provenientes das paredes celulares de fungos, e por peptídeos indutores tais como a sistemina. (Creelman & Mullet, 1997).

1.1. Biossíntese e regulação

A sua biossíntese inicia-se no ácido linolêico presente nas membranas. A aplicação deste ácido provoca acúmulo de AJ na planta, indicando que a concentração, a distribuição ou a disponibilidade de ácido linolêico pode determinar a sua taxa de biossíntese. As membranas

celulares, particularmente do cloroplasto, são uma fonte deste ácido esterificado em glicerolípidios e fosfolípidios, propondo que o aumento de AJ é resultado da ativação de fosfolipases que liberam ácido linolêico destas membranas (Creelman & Mullet, 1997).

O ácido linolêico é convertido em ácido 13-hidroxi linolêico pela enzima lipoxigenase (LOX). Quando ocorre a inibição desta enzima por substâncias inibidoras ou em plantas transgênicas que têm a sua atividade enzimática reduzida, verifica-se inibição da síntese de AJ, mostrando ser este um passo decisivo na sua biossíntese. O ácido 13-hidroxi linolêico é o substrato para ação das enzimas aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC), resultando na formação do ácido 12-oxo-fitodienóico. Após sofrer redução e três β -oxidações, o (-)-7-iso-AJ é formado, podendo ser catabolizado para formar MeJa. O acúmulo de AJ, em resposta a ferimentos ou tratamentos com eliciadores e sistemina, pode ser bloqueado por inibidores da LOX (Creelman & Mullet, 1997).

1.2. Funções do Ácido Jasmônico na planta

O AJ modula a expressão de numerosos genes que influenciam aspectos específicos do crescimento e desenvolvimento da planta, assim como as respostas destes genes a estresses abióticos e bióticos. Suas funções são as seguintes:

a) **Germinação e crescimento:** tanto AJ como MeJa inibem a germinação de sementes não-dormentes e estimulam a germinação de sementes dormentes. O seu aumento está relacionado com a peroxidação lipídica; isto sugere que a produção de AJ é antes uma consequência de um dano da membrana celular que um regulador da germinação. Ele também inibe o crescimento da raiz por um mecanismo não-mediado pelo etileno, da mesma forma que inibe o alongamento da coleóptile estimulado pelo ácido indolacético (Creelman & Mullet, 1997). Observou-se que os jasmonatos inibem o alongamento das células da coleóptile de aveia induzido por IAA através da inibição da síntese de polissacarídeos da parede celular. A

inibição do alongamento das células só é observada em monocotiledôneas, não em dicotiledôneas (Miyamoto *et al.*, 1997).

b) Crescimento vegetativo e armazenamento: o teor de MeJa é alto no crescimento vegetativo da planta. Em plântulas de soja com 6 semanas, os maiores teores de AJ são encontrados em folhas em crescimento em virtude da sua elevada síntese protéica. Elevadas concentrações de AJ estão presentes no desenvolvimento de estruturas reprodutivas, como as vagens, e ocorre em baixas concentrações nas sementes contidas nas vagens. Presume-se que o AJ ou o ácido tuberônico, seu derivado, exerça algum papel na formação de tubérculos (Creelman & Mullet, 1997).

c) Fotossíntese e senescência: a aplicação de AJ em folhas diminui a expressão de genes nucleares e dos cloroplastos envolvidos na fotossíntese. Estes tratamentos também causam a perda de clorofila das folhas ou das culturas de células, provocando clorose, sugerindo, assim, que o AJ teria relação com a senescência. Em virtude dos seus altos níveis em sementes dormentes, ele seria, provavelmente, um indutor de senescência. O AJ pode inibir a síntese de proteínas do cloroplasto em estágios precoces da formação das folhas, quando a divisão celular e a entrada de nutrientes são muito ativas (Creelman & Mullet, 1997). Ensaio feito por Rakwal & Komatsu (2001) demonstraram drástica redução da enzima RUBISCO em plântulas de arroz tratadas com 100 μ M de AJ, além de surgirem lesões necróticas nas folhas.

d) Desenvolvimento de flores e frutos: os jasmonatos têm, possivelmente, um papel na formação de flores, frutos e sementes por causa dos altos teores desta substância nos tecidos reprodutivos da planta em desenvolvimento. A presença dos jasmonatos e derivados de ácidos graxos voláteis podem estar envolvidos na atração de insetos para a dispersão do pólen. Outros aspectos do desenvolvimento de flores, frutos e sementes podem ser modulados pelo AJ, tais como o amadurecimento de frutos, a composição dos carotenóides nas frutas, e a expressão de

genes que determinam o acúmulo de proteínas nas sementes. O aumento de AJ em tomates e maçãs estimula o seu amadurecimento por estimular a síntese de etileno (Creelman & Mullet, 1997). Plantas mutantes de *Arabidopsis*, defectivas na deiscência da antera 1 (*dad1*), mostram defeitos na deiscência das anteras, na maturação do pólen e na abertura das flores. Estes defeitos desapareceram após a aplicação de AJ ou de ácido linolêico (Ishiguro *et al.*, 2001).

e) Resistência a doenças e insetos: o AJ tem papel importante na resistência a doenças e a insetos. Observa-se o seu acúmulo em plantas feridas, em cultura de células tratadas, e em plantas tratadas com eliciadores feitos de patógenos; ativa os genes que codificam os inibidores da protease, que ajudam na proteção da planta contra insetos; ativa os genes que expressam proteínas antifúngicas como a tionina, osmotina; modula a expressão de proteínas da parede celular que estão envolvidas na síntese de barreiras para a infecção; induz a biossíntese de fitoalexinas (ativando a PAL, CHS e PPO) envolvidos na defesa da planta (Creelman & Mullet, 1997). Células de *Rauvolfia canescens* em suspensão acumularam rápida e transitoriamente AJ e MeJa depois da ação de um eliciador proveniente de levedura, sendo que os jasmonatos ativaram os genes que expressam a PAL (Gundlach *et al.*, 1992). Observou-se a síntese de AJ em *Vicia faba* após ataque de lagartas, e em cultura de células de *Agrostis tenuis* depois da adição de um eliciador microbiano (Blechert *et al.*, 1995). Outras evidências quanto ao papel do AJ na resistência a pragas vem da análise de plantas que têm seus níveis de AJ alterado: o tratamento da batata com AJ aumenta a sua resistência contra o *Phytophthora infestans*; o tomateiro mutante JL5, que tem inibição das enzimas AOC e AOS, é mais suscetível a *Manduca sexta*.; um mutante de *Arabidopsis thaliana*, deficiente em ácido linolêico, que contém quantidades ínfimas de AJ, é muito suscetível a fungos. O tratamento destes mutantes com AJ restaurou a resistência destas plantas, demonstrando o seu papel essencial na resistência a patógenos (Creelman & Mullet, 1997). Mutantes de *Arabidopsis*, *fad3-2 fad7-2 fad-8*, que não acumulavam jasmonato, eram extremamente suscetíveis a

infecções por fungos em suas raízes, mas, após a aplicação de AJ, a sua suscetibilidade reduziu-se ao das plantas selvagens usadas como controle (Vijayan *et al.*, 1998). Observou-se que mutantes de *Arabidopsis* deficientes em AJ apresentavam alta mortalidade após o ataque de larvas, mas que, ao receber AJ, o índice de mortalidade reduziu-se significativamente pela ativação de genes de defesa (McConn *et al.*, 1997).

f) Ferimentos mecânicos: experimentos com plantas que sofreram lesões mecânicas apresentaram acúmulo de MeJa e AJ. Creelman *et al.* (1992) relataram que plantas de soja, que sofreram ferimentos no caule, apresentaram rápido acúmulo de AJ e MeJa, e em cultura de células de soja em suspensão, após a adição de MeJa, houve aumento dos níveis de RNAm de três genes que respondem a lesões (Creelman & Mullet, 1997).

1.3. O ácido jasmônico como eliciador

Eliciação é um fenômeno que ocorre quando vegetais são submetidos a estresses ambientais, havendo aumento transitório da produção de metabólitos secundários específicos para cada espécie vegetal. Os eliciadores são compostos capazes de induzir respostas de defesa contra infecções, através da produção de fitoalexinas, compostos antibióticos de baixo peso molecular formados e acumulados em células vegetais em resposta à infecção por microrganismos (Verpoorte & Maraschin, 2001). O AJ e MeJa atuam como compostos envolvidos na via de transdução de sinais ativada por efeito de agentes eliciadores, imitando a ação destes últimos (Farmer & Ryan, 1990; Gundlach *et al.*, 1992).

A ação eliciadora dos jasmonatos tem sido estudada tanto em plantas como sobre cultura de tecidos: em plantas, Farmer & Ryan (1990) constataram que o MeJa induziu a síntese de proteínas inibidoras da proteinase em tomateiros, tanto nas plantas tratadas como nas plantas vizinhas; Thaler (1999), após aplicar AJ em tomateiros, observou aumento da resistência das plantas tratadas contra insetos herbívoros, em virtude das plantas passarem a

produzir enzimas oxidativas e proteínas inibidoras da proteinase; Tamogami *et al.* (1997) verificaram que a aplicação de AJ em folhas de arroz aumentou a síntese de fitoalexinas; Clériveret & Alami (1999) observaram que um eliciador glicoprotéico proveniente do fungo *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* induziu o acúmulo de fitoalexinas (cumarinas) em folhas destacadas das plantas *Platanus occidentalis* e *Platanus acerifolia*, tratadas previamente com a aspersão de AJ. A aplicação de MeJa em *Catharanthus roseus* aumentou a síntese de alcalóides monoméricos (Aerts *et al.*, 1996); o MeJa induziu a síntese do alcalóide vindolina em plântulas de *Catharanthus roseus* (Vázquez-Flota & De Luca, 1998).

Em cultura de tecidos, Dittrich *et al.* (1992) verificaram que a aplicação do ácido 12-oxo-fitodienóico, precursor do AJ, induziu a síntese de fitoalexinas em cultura de células de *Petroselinum crispum*; Nojiri *et al.* (1996), aplicando AJ em células de arroz em suspensão, induziram a síntese de momilactona A, a principal fitoalexina do arroz; Sharan *et al.* (1998) observaram a ativação da PAL e acúmulo de escopoletina e escopolina em cultura de células de tabaco após a aplicação de AJ e um eliciador proveniente do fungo *Fusarium solani*.

2. OBJETIVOS

Os objetivos destes ensaios foram:

- observar se o eliciador ácido jasmônico (biótico) afetaria os teores das lignanas presentes em *P. amarus*, analisando as concentrações de filantina, filtetralina, hipofilantina, nirantina e nirtetralina por CLAE-UV;
- utilizar a análise destas lignanas para comparar e distinguir duas amostras de origens distintas de *P. amarus*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ensaio 1: Efeitos do ácido jasmônico em uma amostra de *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn com teor médio de filantina de 0,16%

3.1.1. Material Vegetal

Este ensaio foi conduzido na Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/ UNICAMP, situado na cidade de Paulínia/ SP. A espécie utilizada foi *P. amarus* (fig. 5), sendo que uma exsicata desta planta (número UEC 127.411) está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

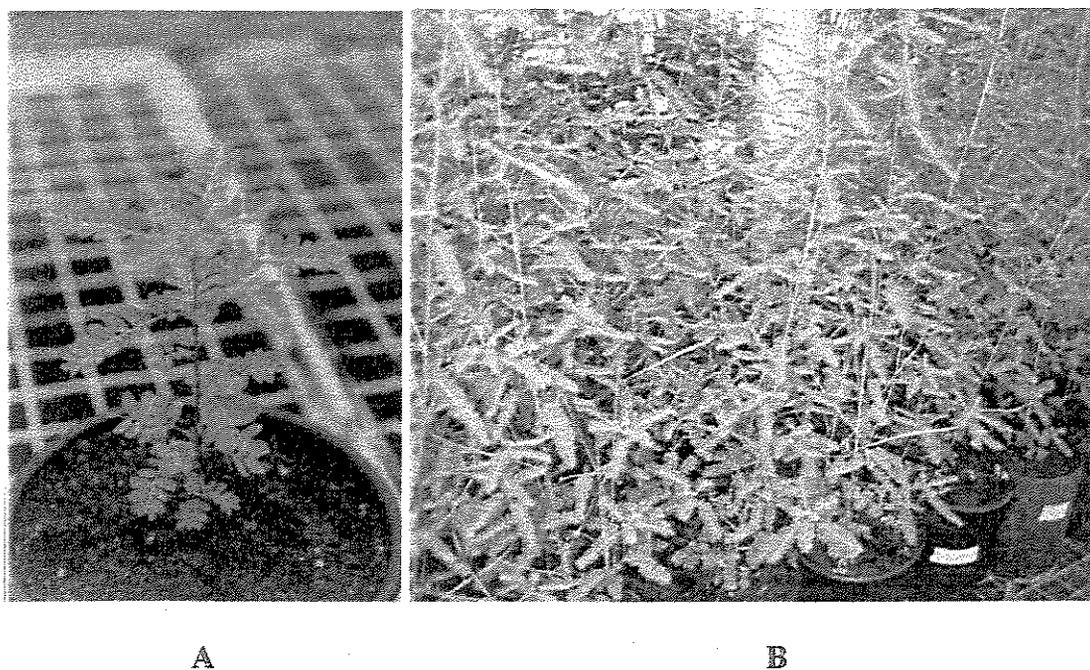


Figura 5. Fotos das plantas *P. amarus*, amostra A, usadas nos experimentos. (A) As plantas após os transplantes para os vasos, com 2 meses; (B) as plantas antes da aplicação do tratamento, com aproximadamente 110 dias.

A amostra A utilizou plantas do Brasil, provenientes do estado do Maranhão, cultivadas no campo experimental do CPQBA. Dentre as diferentes amostras cultivadas e analisadas neste centro de pesquisa, esta é a de menor teor médio de filantina: 0,16%.

A semeadura foi realizada no dia 02/08/2001, sendo colocadas, em média, 5 sementes por tubete, que foram acomodados em um viveiro de sombrite 50%. As temperaturas máxima e mínima médias, no local, nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro, foram, respectivamente: 27,0 °C/ 11,0 °C; 29,0 °C/ 12,0 °C; 30,0 °C/ 14,0 °C; e 32,0 °C/ 19,0 °C.

O material recebeu 5 regas diárias por aspersão. Após 20 dias, as plantas apresentavam 3,0 cm de altura, sofrendo, então, o desbaste. Após 2 meses da semeadura (02/10/2001), as plantas foram transplantadas para vasos que continham uma mistura de partes iguais de terra de superfície (latossolo vermelho escuro-argiloso) e esterco bovino curtido (submetido à ação de minhocas da Califórnia durante 30 dias) e mantidas no mesmo viveiro, onde receberam os tratamentos após 53 dias do transplante.

Um dia antes da aplicação dos tratamentos, elas foram separadas aleatoriamente e divididas em dois grupos denominados AJ e Ct (controle). Foram feitas 4 repetições de cada tempo da coleta, cada repetição com 3 plantas. Ao todo, cada tratamento continha 60 plantas.

3.1.2. Tratamento com ácido jasmônico

Os tratamentos foram feitos na manhã do dia 24/11/2001, através da pulverização das soluções de AJ e acetona. Utilizou-se um pulverizador de pressão acumulada com capacidade de 2,0 L.

As plantas do tratamento Ct receberam uma solução aquosa de 10,0 mL de acetona em 1,0 L de água bidestilada estéril e as plantas do tratamento AJ receberam uma solução aquosa de (\pm) AJ 0,5 mM (Sigma) e 10,0 mL de acetona em 1,0 L de água bidestilada estéril conforme

trabalho de Thaler (1999). O volume das soluções foi de 1,0 L para as 60 plantas de cada tratamento. A pulverização foi feita manualmente, de forma homogênea.

As plantas foram colhidas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 168 horas, seus caules foram cortados à cerca de 1,0 cm acima da terra e, em seguida, foram secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de $40,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Após este período, as folhas, frutos e sementes foram separados e moídos em um moinho com malha tamanho 40. O material resultante foi guardado em frascos de vidro.

Após a colheita e antes da secagem, obteve-se a massa fresca de cada repetição. Após o período de secagem, as repetições foram pesadas com as suas folhas e caules, obtendo-se a massa seca; finalmente, após a separação, as folhas, frutos e sementes foram pesados, obtendo-se a massa seca foliar de cada repetição.

3.2. Ensaio 2: Efeitos do ácido jasmônico em uma amostra de *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn com teor médio de filantina de 0,76%

3.2.1. Material Vegetal

Este ensaio também foi conduzido na Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/ UNICAMP, situado na cidade de Paulínia/ SP. A espécie utilizada foi *P. amarus* (exsicata número UEC 127.411).

Esta amostra foi chamada B, é proveniente de coleta aleatória em diversos países para se caracterizar a variabilidade genética; porém, não foram reveladas, pelos coletores, as regiões de origem desta planta (Magalhães *et al.*, 2001). Seu teor médio de filantina é 0,76%, considerado elevado quando comparado com outras amostras cultivadas no campo experimental do CPQBA.

A semeadura foi feita no dia 14/08/2002, nas mesmas condições do ensaio 1. As temperaturas médias máxima e mínima foram, nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro, respectivamente: 30,0 °C/ 14,0 °C; 29,0 °C/ 12,0 °C; 34,0 °C/ 17,0 °C; e 30,0 °C/ 19,0 °C. As plantas receberam 5 regas diárias por aspersão. Após 20 dias, as plantas tinham 3,0 cm de altura, sofrendo o desbaste. Após 2 meses da semeadura (14/10/2002), houve o transplante para vasos que continham uma mistura de partes iguais de terra de superfície (latossolo vermelho escuro-argiloso) e esterco bovino curtido (submetido à ação de minhocas da Califórnia durante 30 dias), sendo mantidas no mesmo viveiro onde ocorreram os tratamentos após 54 dias.

Um dia antes da aplicação, as plantas foram divididas aleatoriamente em dois tratamentos denominados AJ e Ct (controle). Foram feitas 5 repetições de cada tempo da coleta (0, 24, 48 e 72 horas), cada repetição com 4 plantas. Ao todo, cada tratamento continha 80 plantas.

3.2.2. Tratamento com ácido jasmônico

Os tratamentos foram feitos na manhã do dia 07/12/2002, através da pulverização das soluções de AJ e acetona. Utilizou-se o mesmo pulverizador do primeiro ensaio. As plantas do tratamento Ct receberam uma solução aquosa de 10,0 mL de acetona em 1,0 L de água bidestilada estéril, e as do tratamento AJ receberam uma solução aquosa de (\pm) AJ 0,5 mM (Sigma) e 10,0 mL de acetona em 1,0 L de água bidestilada estéril conforme trabalho de Thaler (1999). Cada planta recebeu 12,5 mL desta solução, em média. A pulverização foi feita manualmente, de forma homogênea.

As plantas foram colhidas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, repetindo-se os procedimentos do primeiro ensaio quanto à coleta, secagem e moagem.

Após a colheita e antes da secagem obteve-se a massa fresca de cada repetição. Após o período de secagem, as repetições foram pesadas com as suas folhas, caules e pecíolos, obtendo-se a massa seca; após a sua separação, as folhas, frutos e sementes de cada repetição foram pesados, obtendo-se a massa seca foliar.

3.3. Extração

O procedimento abaixo descrito foi utilizado para as plantas dos dois ensaios.

Foram colocados 200,0 mg do material seco e moído de cada repetição em tubos contendo 5,0 mL de metanol, extraído-se com extrator Polytron por 1 minuto, a 15.000 rpm, a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 1087,44 g e o sobrenadante vertido em um balão volumétrico de 25,0 mL. O resíduo sofreu segunda extração igual a anterior e o sobrenadante foi vertido no balão volumétrico que recebeu a primeira extração, sendo o volume completado com metanol a 25,0 mL. Todas as amostras foram extraídas em duplicata.

3.4. Análise dos extratos por CLAE-UV

Este procedimento de análise foi utilizado para os extratos obtidos das plantas dos dois ensaios.

As análises dos extratos foram feitas por CLAE-UV, através do sistema cromatográfico Waters, constituído por uma bomba Waters Millipore Modelo M-45 de pistão simples, com injeção manual e vazão de 1,2 mL/min; um forno para aquecimento da coluna Waters, cuja temperatura foi mantida a 40,0°C; a separação foi realizada por uma coluna de fase reversa Supelco C18/5 μ /250x4,6 mm; a detecção foi feita no modo absorbância, em um comprimento de onda de 235 nm, sensibilidade de 0,05 AUs, através de um detector UV-Vis Waters modelo 481; a integração foi feita por um integrador Waters 745B Data Module. Como fase móvel utilizou-se o ácido acético 3% em água bidestilada, diluído em metanol, na proporção 35:65.

O volume de amostra injetada foi de 20 μ L, o tempo necessário para a análise de cada amostra foi de 20 minutos e o fluxo da fase móvel foi mantido por mais 20 minutos para a limpeza da coluna. Os padrões de filantina, fletetralina, hipofilantina, nirantina e nirtetralina usados foram obtidos na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA.

3.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita através da análise de variância simples (ANOVA) e do teste de T de “Student”.

A análise de variância foi empregada para comparar os dois tratamentos aplicados. Assim, foram utilizadas todas as médias das repetições de todos os tempos de coleta e o resultado da análise estatística foi colocado na célula do tratamento AJ na tabela. A análise de variância simples também foi usada para comparar as médias da massa fresca, massa seca, massa seca foliar e as dosagens das lignanas das repetições nos seus respectivos tempos de coleta, a fim de se saber se as diferenças entre as médias era significativa.

O teste T foi empregado para comparar as médias da massa fresca, massa seca, massa seca foliar e as dosagens das lignanas dos tratamentos AJ e Ct nos seus respectivos tempos de coleta.

A denominação acúmulo foi empregada quando as médias das repetições, de cada tempo de coleta e de cada tratamento, foram comparadas com o respectivo tempo 0 hora de cada tratamento, sendo avaliada pelo teste T.

As diferenças foram consideradas significativas quando o nível de significância foi igual a 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio 1

a) Aspectos visuais

As plantas da amostra A não apresentaram alterações visíveis após os tratamentos.

b) Dados biométricos

1) Massa fresca

Não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Evolução das médias da massa fresca (g) de *P. amarus*, plantas da amostra A (teor de filantina: 0,16%), dos tratamentos AJ e Ct em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ (g) (NS)	28,82	28,33 \pm 4,02	26,85 \pm 2,12	27,31 \pm 3,55	30,53 \pm 3,16
Ct (g)	25,54	25,93 \pm 2,88	27,56 \pm 0,62	26,48 \pm 1,11	29,15 \pm 1,96
CV (%)	---	25,8	11,5	19,6	17,6
Teste T	---	NS	NS	NS	NS

NS = não-significativo

2) Massa seca total

Não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Tabela 2)

Tabela 2. Evolução das médias da massa seca (g) de *P. amarus*, plantas da amostra A (teor de filantina: 0,16%), dos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ (g) (NS)	6,47	6,26± 0,91	6,65± 0,54	6,82± 0,92	7,28± 0,83
Ct (g)	5,49	6,50± 0,78	7,19± 0,30	7,41± 0,30	7,96± 0,60
CV (%)	---	26,6	12,6	19,3	19,0
Teste T	---	NS	NS	NS	NS

NS = não-significativo

3) Massa seca foliar

Não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Evolução das médias da massa seca foliar (g) de *P. amarus*, plantas da amostra A (teor de filantina: 0,16%), dos tratamentos AJ e Ct em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ (g) (NS)	1,90	1,75± 0,29	1,84± 0,21	1,97± 0,21	2,19± 0,34
Ct (g)	1,50	1,86± 0,27	2,08± 0,22	1,71± 0,07	2,00± 0,24
CV (%)	---	31,5	21,8	17,3	28,2
Teste T	---	NS	NS	NS	NS

NS = não-significativo

c) Determinação das concentrações médias das lignanas

Nas condições de análise anteriormente descritas, os tempos de retenção obtidos por CLAE-UV, para as substâncias analisadas no ensaio 1, foram, em ordem crescente: 8,32 para

a filtetralina, 9,06 para a hipofilantina, 10,21 para a filantina, 11,33 para a nirtetralina e 12,62 minutos para a nirantina (fig. 6).

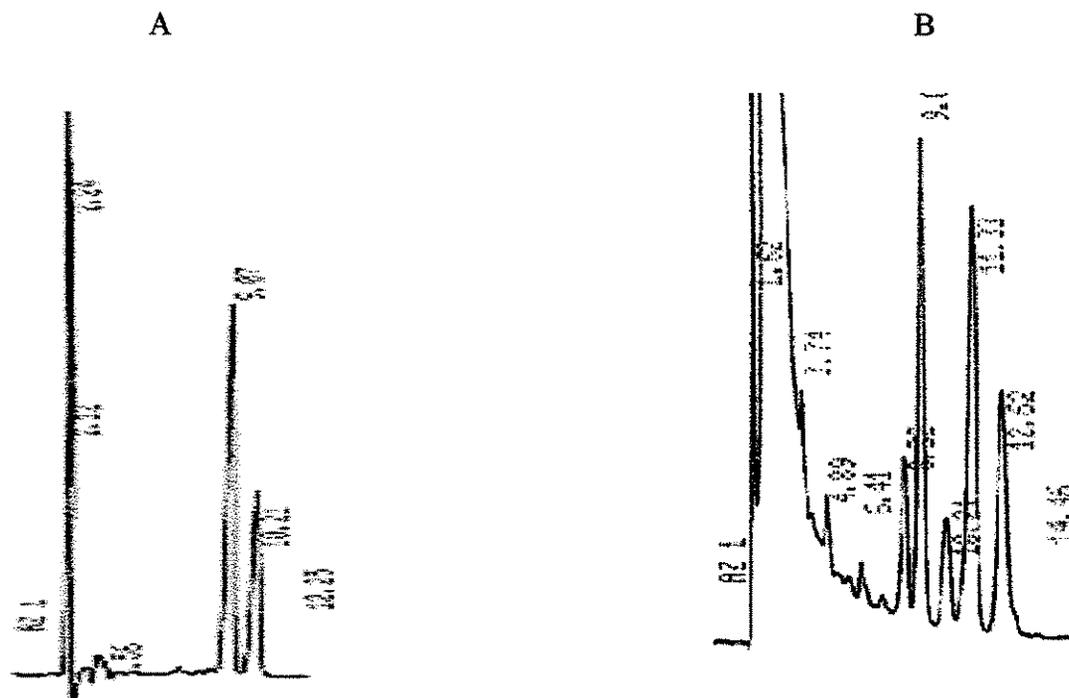
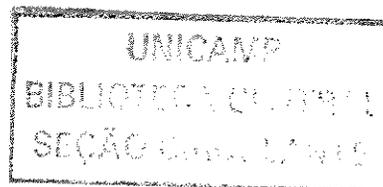


Figura 6. (A) Cromatograma em CLAE-UV (235 nm) com os padrões de hipofilantina (9,07 min) e filantina (10,21 min). (B) Cromatograma em CLAE-UV (235 nm) do extrato metanólico das folhas, frutos e sementes de *P. amarus*, amostra com teor médio de filantina 0,16%, após tratamento com solução de AJ 0,5 mM.

As dosagens de filantina e hipofilantina foram obtidas através das curvas de calibração (fig. 7 e 8). A partir da curva de calibração da filantina se obteve a concentração da nirantina; através da curva de calibração da hipofilantina obteve-se as concentrações de filtetralina e nirtetralina. Relacionou-se a filantina com a nirantina, e a hipofilantina com a filtetralina e nirtetralina por serem das mesmas classes de lignanas.



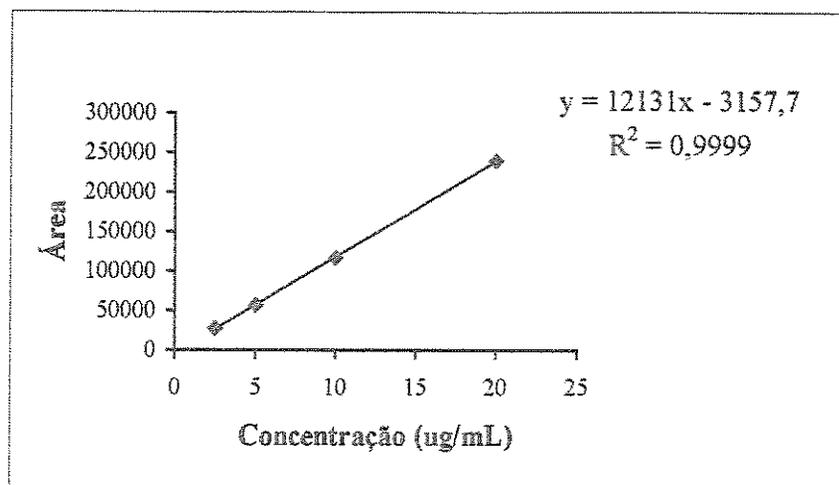


Figura 7. Curva de calibração de filantina no ensaio 1.

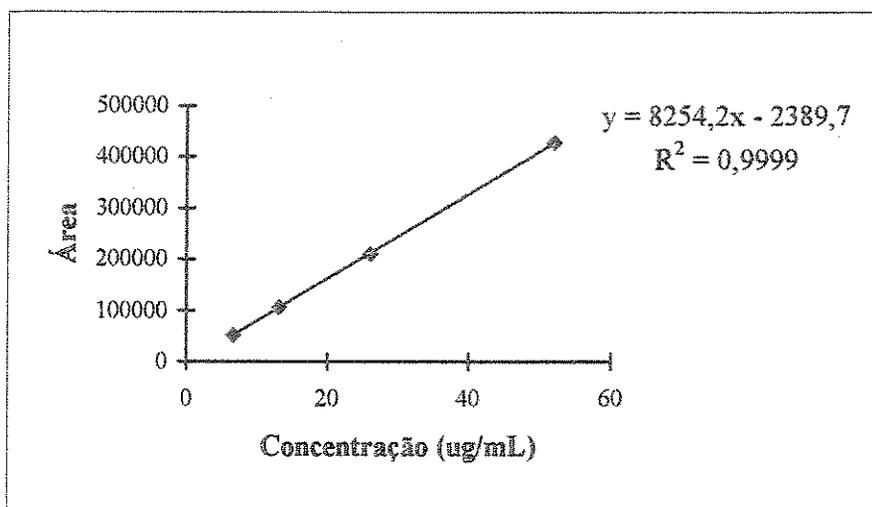


Figura 8. Curva de calibração de hipofilantina no ensaio 1.

1) Análise da concentração média de filantina

Não houve diferença significativa entre os tratamentos AJ e Ct, não houve diferença significativa entre os teores médios de filantina quando foram comparadas as médias dos tratamentos analisados nos seus respectivos tempos de coleta, porém observou-se acúmulo de filantina nos tempos 24 e 72 horas. (Tabela 4).

Tabela 4. Evolução dos teores médios de filantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (NS)	479,9	1419,3 \pm 356,0	949,2 \pm 317,8	785,6 \pm 37,5	1259,5 \pm 459,6
Ct ($\mu\text{g/g}$)	662,7	804,0 \pm 159,7	896,1 \pm 334,5	667,4 \pm 70,7	699,1 \pm 39,2
CV (%)	---	49,6	70,7	15,6	66,8
Teste T	---	NS	NS	NS	NS
Acúmulo AJ	---	*	NS	**	NS
Acúmulo CT	---	NS	NS	NS	NS

(*) nível de significância de 5% (**) nível de significância de 1% NS = não-significativo

2) Análise da concentração média de filtetralina

Não houve diferença significativa entre os tratamentos AJ e Ct, assim como quando foram comparados os teores médios de filtetralina nos seus respectivos tempos. Observou-se acúmulo significativo nos tempos 24, 72 e 168 horas em relação ao tempo 0 hora no tratamento AJ e 48, 72 e 168 horas em relação ao tempo 0 hora no tratamento Ct (Tabela 5).

Tabela 5. Evolução dos teores médios de fletetralina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (NS)	899,9	1253,0 \pm 79,3	1254,4 \pm 187,4	1359,2 \pm 54,4	1540,9 \pm 73,8
Ct ($\mu\text{g/g}$)	933,9	1162,5 \pm 125,9	1171,8 \pm 185,1	1126,9 \pm 141,3	1326,9 \pm 87,4
CV (%)	---	17,4	30,7	17,2	11,3
Teste T	---	NS	NS	NS	NS
Acúmulo AJ	---	*	NS	**	**
Acúmulo Ct	---	NS	*	*	*

(*) nível de significância de 5% (**) nível de significância de 1% NS = não-significativo

3) Análise da concentração média de hipofilantina

A comparação dos tratamentos pela análise de variância simples e pelo teste T foi positiva ao nível de significância de 1 %. Quando comparou-se os teores médios de hipofilantina do tratamento AJ com o controle, observou-se aumento dos teores médios de hipofilantina estatisticamente significativo nos tempos 24, 48 e 168 horas, respectivamente de 36,46%, 15,75% e 40,08%. Quando os teores de cada tempo de cada tratamento são comparados com o seu respectivo tempo 0 hora, observou-se acúmulo de hipofilantina em todos os tempos analisados no tratamento AJ, não se observando o mesmo no tratamento controle (Tabela 6).

Tabela 6. Evolução dos teores médios de hipofilantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (1)	2840,6	3876,2 \pm 164,6	3288,0 \pm 76,0	3573,5 \pm 73,9	3979,1 \pm 184,4
Ct ($\mu\text{g/g}$)	2977,1	3202,5 \pm 218,8	2841,9 \pm 216,5	3055,5 \pm 250,8	3465,5 \pm 203,2
CV (%)	---	10,9	6,1	11,2	10,4
Teste T	---	*	**	NS	*
Acúmulo AJ	---	**	*	**	**
Acúmulo Ct	---	NS	NS	NS	NS

(1) comparação significativa entre os tratamentos com nível de significância de 1 %

(*) nível de significância de 5% (*) nível de significância de 1% NS = não-significativo

4) Análise da concentração média de nirantina

Não houve diferença significativa entre os tratamentos AJ e Ct, a comparação entre os teores médios dos tratamentos nos respectivos tempos não foi significativa, excetuando a diferença significativa entre as médias no tempo 48 horas, elevando o teor de nirantina em 11,94%. Observou-se acúmulo significativo nos tempos 24 e 72 horas no tratamento AJ, em relação ao tempo 0 hora, não se observando o mesmo no controle (Tabela 7).

Tabela 7. Evolução dos teores médios de nirantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (NS)	1371,1	2645,5 \pm 409,2	1912,7 \pm 327,0	1707,4 \pm 47,2	2358,4 \pm 509,7
Ct ($\mu\text{g/g}$)	1899,3	2018,7 \pm 222,4	1708,6 \pm 273,5	1569,2 \pm 127,3	1694,0 \pm 117,5
CV (%)	---	28,2	33,3	11,7	36,5
Teste T	---	NS	*	NS	NS
Acúmulo AJ	---	*	NS	*	NS
Acúmulo Ct	---	NS	NS	NS	NS

(*) nível de significância de 5% NS = não-significativo

5) Análise da concentração média de nirtetralina

A comparação entre os tratamentos feita pelo teste T foi significativa, a comparação entre as médias nos seus respectivos tempos também foi significativa em 48, 72 e 168 horas, ocorrendo aumento do teor médio de nirtetralina de 11,1% após 48 horas, 31,93% após 72 horas e 44,14% após 168 horas da aplicação de AJ. As plantas apresentaram acúmulo de nirtetralina em todos os tempos quando relacionados com o tempo 0 (Tabela 8).

Tabela 8. Evolução dos teores médios de nirtetralina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	168 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (1)	3022,5	4058,0 \pm 204,4	3539,4 \pm 109,9	3987,7 \pm 66,8	4356,5 \pm 150,5
Ct ($\mu\text{g/g}$)	3254,2	3482,8 \pm 258,1	3158,0 \pm 96,6	3332,5 \pm 261,7	3838,7 \pm 270,2
CV (%)	---	12,4	6,2	10,4	10,7
Teste T	---	NS	*	*	*
Acúmulo AJ	---	**	*	**	**
Acúmulo Ct	---	NS	NS	NS	NS

(1) comparação significativa entre os tratamentos com nível de significância de 1 %

(*) nível de significância de 5% (**) nível de significância de 1% NS = não-significativo

4.2. Ensaio 2

a) Aspectos visuais

Após 24 horas da aplicação do tratamento, as plantas que receberam a pulverização de AJ apresentaram amarelecimento das suas folhas na forma de pequenas manchas arredondadas com 2,0 mm de diâmetro, em média, e que apareceram principalmente nas folhas mais velhas, situadas no terço médio e inferior da planta. Os ápices caulinares estavam inalterados em ambos tratamentos. Após 48 horas, várias folhas estavam amareladas e caídas sobre a terra dos vasos.

b) Dados biométricos

1) Massa fresca

O tratamento com AJ apresentou uma ação significativa sobre as plantas tratadas, provocando diminuição das médias da massa fresca nos tempos 24, 48 e 72 horas, ocorrendo, respectivamente, decréscimo de 8,04%, 5,93% e 14,80% da massa das plantas do tratamento AJ em relação ao tratamento Ct, nos tempos 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Evolução das médias da massa fresca (g) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76%, dos tratamentos AJ e Ct em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ (g) (1)	121,47	134,57± 2,41	124,28± 3,05	116,97± 2,28
Ct (g)	132,25	146,33± 7,28	132,12± 2,19	137,28± 2,45
CV (%)	---	8,6	4,6	4,2
Teste T	---	*	*	***

(1) comparação significativa entre os tratamentos com nível de significância de 5%

(*) nível de significância de 5% (***) nível de significância de 0,1%

2) Massa seca total

O tratamento com AJ apresentou uma ação significativa sobre as plantas tratadas, provocando diminuição das médias da massa seca nestas plantas nos tempos 24, 48 e 72 horas, de, respectivamente, 7,55%, 6,03% e 20,56% (Tabela 10).

Tabela 10. Evolução das médias da massa seca (g) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76% dos tratamentos AJ e Ct em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ (g) (1)	34,66	37,21± 0,91	35,98± 1,04	33,27± 0,45
Ct (g)	39,78	40,25± 1,55	38,29± 0,81	41,88± 0,71
CV (%)	---	7,3	5,6	3,5
Teste T	---	*	**	***

(1) nível de significância de 1% entre os tratamentos (*) nível de significância de 5%

(**) nível de significância de 1% (***) nível de significância de 0,1%

3) Massa seca foliar

Houve uma diferença significativa entre os tratamentos AJ e Ct, observando-se diminuição gradativa das médias da massa seca foliar. Comparando-se os tempos de coleta, as diferenças foram significativas em todos os tempos, apresentando-se diminuída no tratamento AJ em relação ao controle em 11,54%, 9,90% e 23,98% nos tempos 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11. Evolução das médias da massa seca foliar (g) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76%, dos tratamentos AJ e Ct em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ (g) (1)	19,54	18,81± 0,43	17,67± 0,50	16,97± 0,37
Ct (g)	21,91	20,98± 0,56	19,42± 0,24	21,04± 0,39
CV (%)	---	5,6	4,8	4,5
Teste T	---	**	*	**

(1) nível de significância de 1% entre os tratamentos (*) nível de significância de 5%

(**) nível de significância de 1%

e) Análise das concentrações médias das lignanas

Nas condições de análise anteriormente descritas, os tempos de retenção obtidos por CLAE-UV, para as substâncias analisadas no ensaio 2 foram, em ordem crescente: 8,72 para a filtetralina; 9,61 para a hipofilantina; 10,90 para a filantina; 12,08 para a nirtetralina e 13,60 minutos para a nirantina (fig. 9).

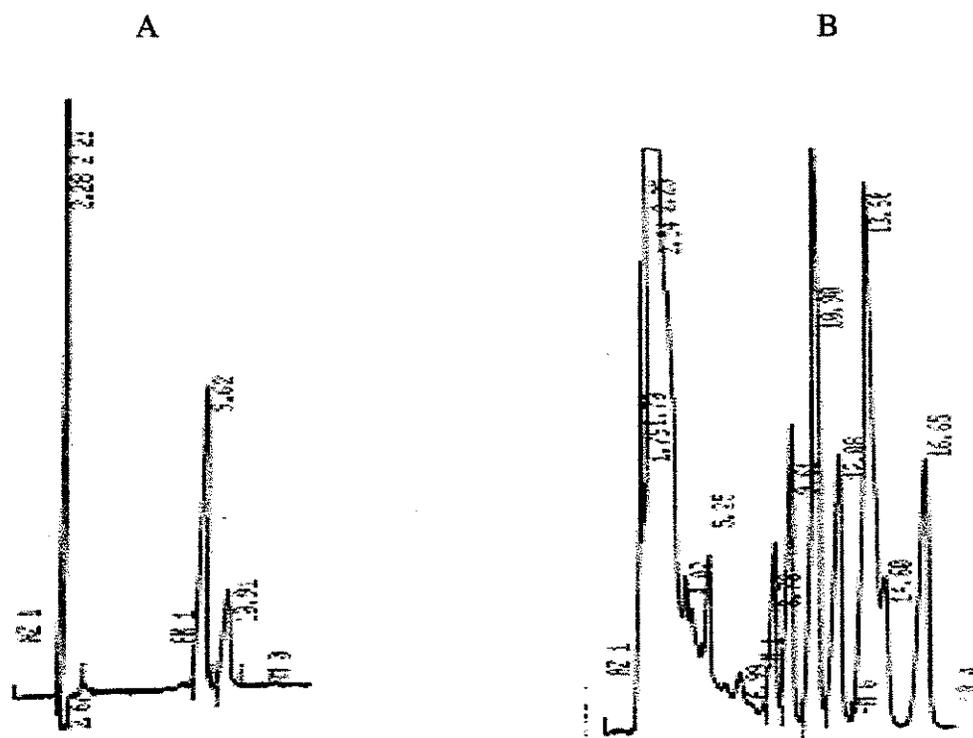


Figura 9. (A) Cromatograma em CLAE-UV (235 nm) dos padrões de hipofilantina (9,62 min) e filantina (10,91 min). (B) Cromatograma em CLAE-UV (235 nm) do extrato metanólico das folhas, frutos e sementes de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76%, após tratamento com solução de AJ 0,5 mM.

1) Análise da concentração média de filantina

A comparação entre os tratamentos feita pelo teste T foi significativa (1 %), ocorrendo aumento significativo no teor médio de filantina de 9,84% após 24 horas do tratamento com AJ quando comparado ao controle, no mesmo tempo. Não foi observado acúmulo nas plantas tratadas com AJ, todavia as plantas do controle apresentaram acúmulo após 72 horas (Tabela 12).

Tabela 12. Evolução dos teores médios de filantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina (0,76%), nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (1)	5465,0	6002,7 \pm 501,8	6047,0 \pm 494,9	6646,5 \pm 721,7
Ct ($\mu\text{g/g}$)	5223,9	4651,2 \pm 144,8	5553,9 \pm 243,3	6297,5 \pm 197,2
CV (%)	---	15,5	15,0	18,3
Teste T	---	*	NS	NS
Acúmulo AJ	---	NS	NS	NS
Acúmulo Ct	---	NS	NS	*

(1) comparação entre os tratamentos com nível de significância de 1%

(*) nível de significância de 5% NS = não-significativo

2) Análise da concentração média de fildesina

Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, entre os teores médios de fildesina, nem se observou acúmulo desta substância após o tratamento com AJ (Tabela 13).

Tabela 13. Evolução dos teores médios de fletetralina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (NS)	705,3	717,6 \pm 214,6	702,8 \pm 125,8	759,3 \pm 242,4
Ct ($\mu\text{g/g}$)	490,5	1180,2 \pm 211,4	937,1 \pm 122,1	744,9 \pm 75,4
CV (%)	---	50,2	33,8	53,4
Teste T	---	NS	NS	NS
Acúmulo AJ	---	NS	NS	NS
Acúmulo Ct	---	NS	NS	NS

NS = não significativo

2) Análise da concentração média de hipofilantina

Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos e entre os teores médios, quando comparados entre os seus respectivos tempos. Ocorreu uma diferença significativa entre as médias do teor de hipofilantina no tempo 24 horas, estando este teor abaixo do tratamento Ct. Não foi observado acúmulo significativo provocado pelo AJ, todavia as plantas do tratamento controle apresentaram acúmulo significativo em todos os tempos do tratamento (Tabela 14).

Tabela 14. Evolução das concentrações médias de hipofilantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$)	826,5	937,2 \pm 171,8	1041,1 \pm 78,4	1142,7 \pm 181,9
Ct ($\mu\text{g/g}$)	1051,6	1369,7 \pm 122,3	1067,5 \pm 162,0	1307,8 \pm 123,7
CV (%)	---	28,9	27,0	28,4
Teste T	---	*	NS	NS
Acúmulo AJ	---	NS	NS	NS
Acúmulo Ct	---	*	*	**

(*) nível de significância de 5% (**) nível de significância de 1% NS = não-significativo

4) Análise da concentração média de nirantina

Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, entre os teores médios de filtetralina, nem se observou acúmulo desta substância após o tratamento com AJ (Tabela 15).

Tabela 15. Evolução dos teores médios de nirantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (NS)	4507,1	6131,7 \pm 781,5	6131,6 \pm 595,0	5494,3 \pm 700,3
Ct ($\mu\text{g/g}$)	5256,1	5472,4 \pm 891,1	5578,9 \pm 645,0	6621,6 \pm 508,5
CV (%)	---	32,3	23,7	22,6
Teste T	---	NS	NS	NS
Acúmulo AJ	---	NS	NS	NS
Acúmulo Ct	---	NS	NS	NS

NS = não-significativo

5) Análise da concentração média de nirtetralina

Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, não houve acúmulo significativo nas plantas tratadas com AJ e no controle, mas houve uma diferença significativa entre as médias do teor de nirtetralina no tempo 24 horas (Tabela 16).

Tabela 16. Evolução dos teores médios de nirtetralina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,76%, nos tratamentos AJ e Ct, em ensaio com uma solução de AJ 0,5 mM. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)
AJ ($\mu\text{g/g}$) (NS)	887,3	1049,0 \pm 179,0	1077,5 \pm 94,0	1168,4 \pm 166,9
Ct ($\mu\text{g/g}$)	1163,8	1435,6 \pm 166,9	1137,1 \pm 186,4	1432,5 \pm 117,2
CV (%)	---	31,2	29,8	24,8
Teste T	---	*	NS	NS
Acúmulo AJ	---	NS	NS	NS
Acúmulo Ct	---	NS	NS	NS

(*) nível de significância de 5% NS = não-significativo

6) Comparação das médias das lignanas das plantas dos ensaios 1 e 2

As lignanas filantina e nirtetralina presentes nas plantas do ensaio 2 possuem um teor mais elevado do que aquelas do ensaio 1 de 6,6 e 2,9 vezes, respectivamente. As lignanas hipofilantina e nirtetralina apresentam teor mais elevado nas plantas do ensaio 1 de 2,6 e 2,7 vezes. As concentrações de filantina nas plantas dos ensaios 1 e 2 não apresentam diferenças significativas (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação das amostras A e B de *P. amarus* utilizados nos controles dos ensaios 1 (teor de filantina: 0,16%) e 2 (teor de filantina: 0,76%) através da análise do teor ($\mu\text{g/g}$) das lignanas filantina, filtetralina, hipofilantina, nirantina e nirtetralina presentes nesta planta por CLAE-UV (235 nm). Os números representam a média \pm erro padrão da média, o coeficiente de variação (CV) e o nível de significância em porcentagem (%).

	Ensaio 1	Ensaio 2	CV (%)	Significância (%)
Filantina ($\mu\text{g/g}$)	745,9 \pm 102,7	5431,6 \pm 152,6	17,0	0,1
Filtetralina ($\mu\text{g/g}$)	1144,4 \pm 71,2	838,2 \pm 109,5	36,0	não significativo
Hipofilantina ($\mu\text{g/g}$)	3108,5 \pm 115,3	1199,1 \pm 86,8	18,7	0,1
Nirantina ($\mu\text{g/g}$)	1778,0 \pm 135,2	5732,2 \pm 360,5	29,0	0,1
Nirtetralina ($\mu\text{g/g}$)	3413,2 \pm 127,6	1292,2 \pm 97,9	19,2	0,1

5. DISCUSSÃO

O ensaio 1 mostrou que a aplicação de AJ em *P. amarus*, na amostra A (teor médio de filantina de 0,16%), foi capaz de alterar significativamente os teores das lignanas hipofilantina e nirtetralina, apresentando elevação dos seus teores médios e promovendo acúmulo destas substâncias. As demais lignanas, apesar de apresentar alterações nos seus teores, estas não foram significativas estatisticamente, portanto, não foi possível afirmar que o AJ teve uma ação positiva sobre o teor destas substâncias (fig. 10 e 11).

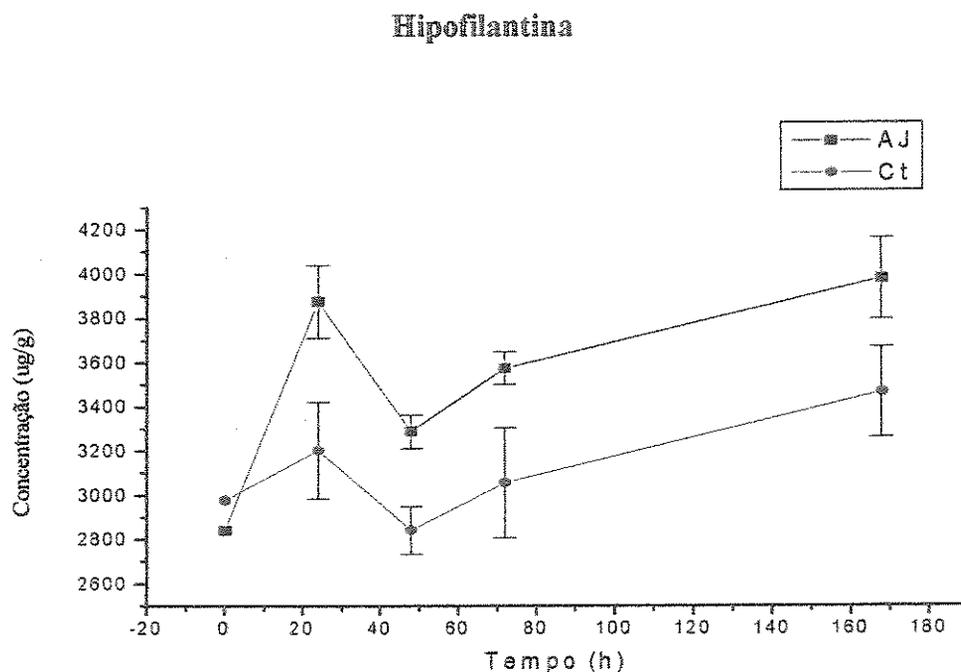


Figura 10. Evolução dos teores médios de hipofilantina ($\mu\text{g/g}$) em *P. amarus*, plantas da amostra A (teor de filantina: 0,16%), após tratamento com AJ 0,5 mM.

Nirtetralina

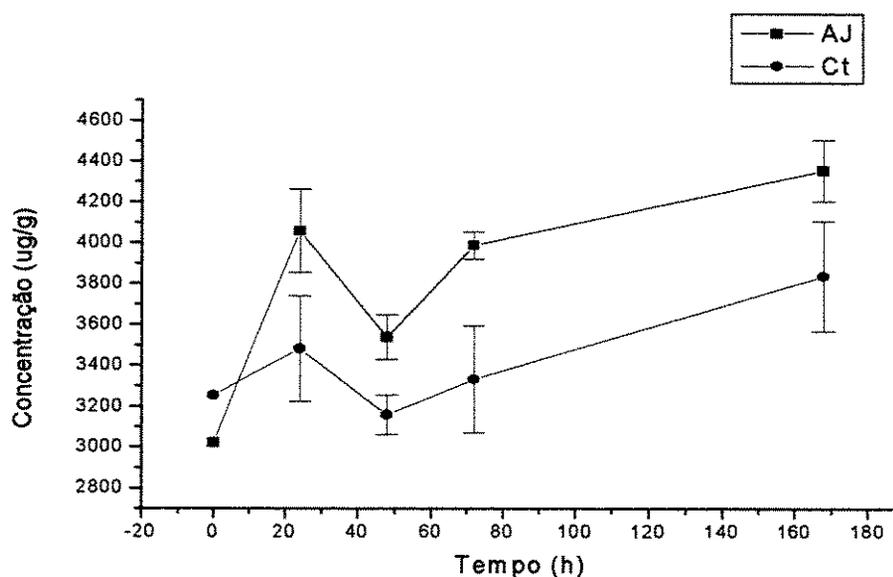


Figura 11. Evolução dos teores médios de nirtetralina ($\mu\text{g/g}$) em *P. amarus*, plantas da amostra A (teor de filantina: 0,16%), após tratamento com AJ 0,5 mM.

A filantina apresentou aumento do teor após 24 horas do tratamento com AJ, devido ao acúmulo significativo ocorrido no tratamento com AJ e não observado no controle. Em virtude do grande coeficiente de variação, não foi possível afirmar se este aumento do teor foi provocado pela ação do AJ. Para a confirmação destes resultados, seria necessário um novo ensaio com um número maior de repetições para se ter uma conclusão precisa do efeito do AJ sobre o teor da filantina nesta amostra (fig. 12).

Filantina

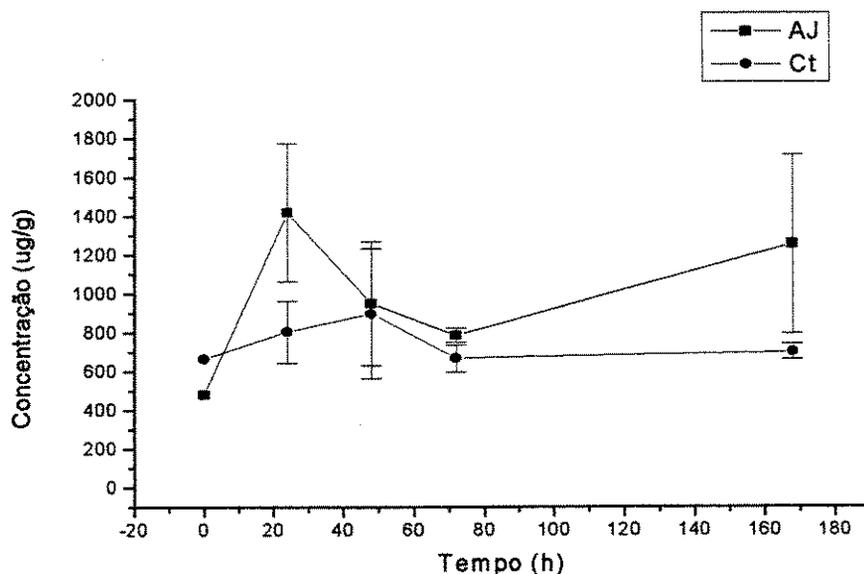


Figura 12. Evolução dos teores médios de filantina ($\mu\text{g/g}$) em *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, após tratamento com AJ 0,5 mM.

O AJ não provocou alterações no teor da filantina. O acúmulo observado nas plantas tratadas com AJ também ocorre nas plantas do controle. Logo, o acúmulo desta substância parece ser uma função normal nesta planta.

O AJ também não alterou significativamente o teor de nirantina destas plantas.

O ensaio 2, que utilizou plantas com teor de filantina mais elevado (0,76%), apresentou resultados distintos em relação ao ensaio 1. Somente a filantina teve o seu teor elevado de forma significativa pela ação do AJ, aumentando-o em 9,84% após 24 horas (fig. 13).

Filantina

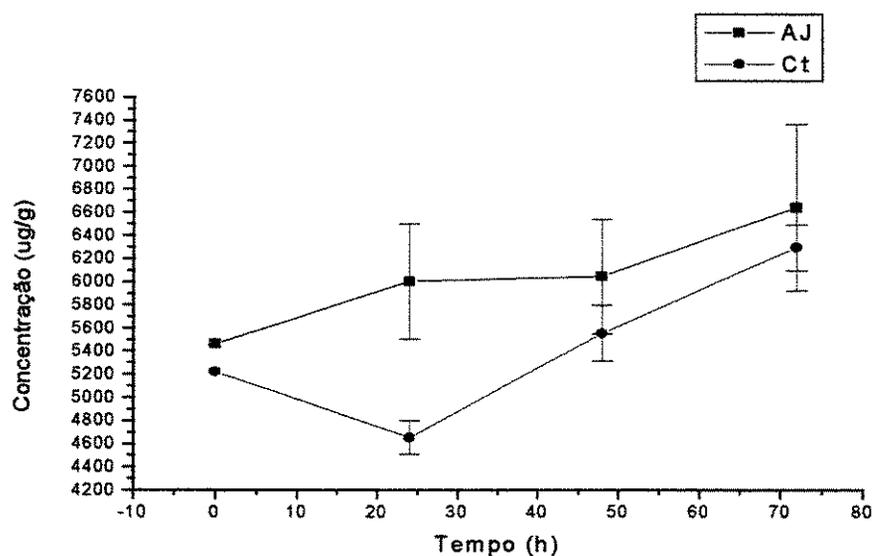


Figura 13. Evolução dos teores médios de filantina ($\mu\text{g/g}$) em *P. amarus*, amostra com teor médio de filantina 0,76%, após tratamento com AJ 0,5 mM.

A hipofilantina apresentou acúmulo nas plantas do controle, fato não observado nas plantas tratadas com AJ. Pode-se supor que o AJ teria um efeito inibidor do acúmulo desta substância, fazendo com que os seus teores fossem menores quando comparados com aqueles do controle.

As demais lignanas não apresentaram qualquer alteração significativa nos seus teores.

Neste mesmo ensaio observou-se que a ação do AJ sobre estas plantas pode ter sido tóxico, em virtude das manchas cloróticas, arredondadas, apresentadas nas folhas mais velhas após 24 horas do tratamento com AJ, manchas cloróticas nas folhas mais velhas situadas no terço médio e inferior das plantas, demonstrando degradação da clorofila seguida da morte das folhas, culminando com a sua abscisão e acarretando expressiva diminuição das massas fresca, seca e foliar em todos os tempos avaliados, destacando-se o tempo 72 horas (fig. 14).

Massa seca foliar

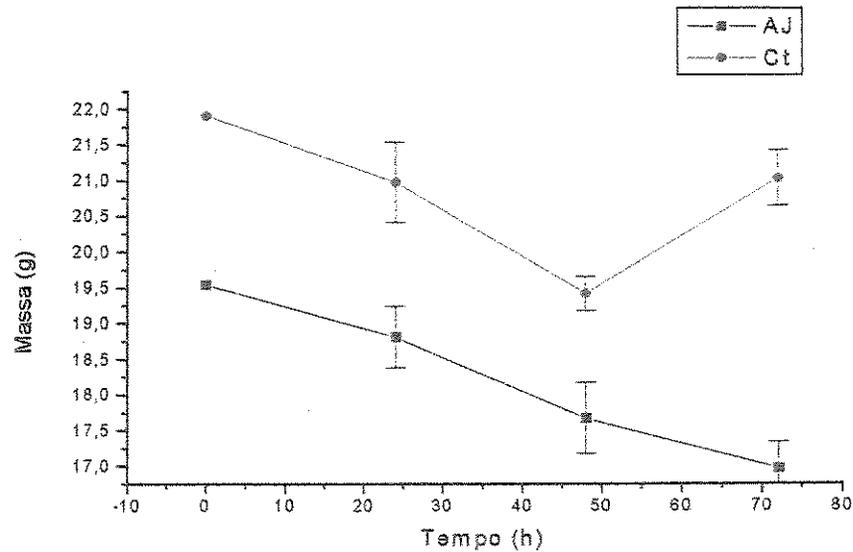


Figura 14. Evolução das médias da massa seca foliar (g) em *P. amarus*, amostra com teor médio de filantina 0,76%, após tratamento com AJ 0,5 mM.

Segundo a definição de Salisbury & Ross (1991), “senescência é o processo de deterioração que acompanha o envelhecimento e que leva a morte de um órgão ou um organismo”. Assim, os fenômenos observados preenchem esta definição por haver uma aceleração do processo de deterioração das folhas mais velhas, culminando com a morte destas; além disso, a capacidade do AJ provocar senescência é citada pela literatura, particularmente por Creelman & Mullet (1995), dizendo que a senescência é induzida pelo AJ e os jasmonatos em concentrações acima de 50 μM em cultura de tecidos e folhas excisadas, concentração 10 vezes menor que a aplicada nestes ensaios.

Tudo indica que a abscisão induzida pelo AJ é um fenômeno complexo, apresentando diferentes causas que, provavelmente, se interrelacionam: Creelman & Mullet (1995) relatam que a senescência e abscisão provocada pelo AJ provavelmente se dá em decorrência do aumento da biossíntese do etileno; Miyamoto *et al.* (1997) relatam que o AJ promove a

abscisão dos pecíolos de folhas de feijoeiro por haver diminuição da quantidade de celulose na zona de abscisão, em virtude do aumento da atividade da enzima celulase; Sembdner & Parthier (1993) relatam que a senescência foliar induzida pelos jasmonatos é decorrente da degradação e da inibição da biossíntese da clorofila, ocorrendo redução da atividade fotossintética; Rakwal & Komatsu (2001), aplicando AJ na concentração de 100 μ M, observaram, em folhas de arroz, a formação de lesões necróticas decorrentes da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que inibiram ou danificaram o aparelho fotossintético.

É conhecido o papel do AJ como mensageiro quando as plantas são atacadas por patógenos (SIR), induzindo a biossíntese de fitoalexinas (Creelman & Mullet, 1997), ou herbívoros, induzindo a síntese de proteínas inibidoras da proteinase (Cohen *et al.*, 1993; Ryan & Pearce, 1998). Assim, este trabalho mostrou que, em virtude do aumento induzido e do acúmulo destas substâncias, as lignanas analisadas participam do sistema de resistência induzida de *P. amarus*.

A análise dos teores das lignanas por CLAE-UV mostrou ser um método eficaz de comparação entre as duas amostras de *P. amarus*: a amostra A, com teor médio de filantina 0,16%, predominam os teores de hipofilantina e nirtetralina, enquanto que a amostra B, com teor médio de filantina 0,76%, predominam as lignanas da classe das diarilbutanas: filantina e niranina. A nirtetralina não apresentou diferença significativa na comparação entre estas amostras, assim, sua quantificação não serviria para diferenciar uma amostra da outra (fig. 15).

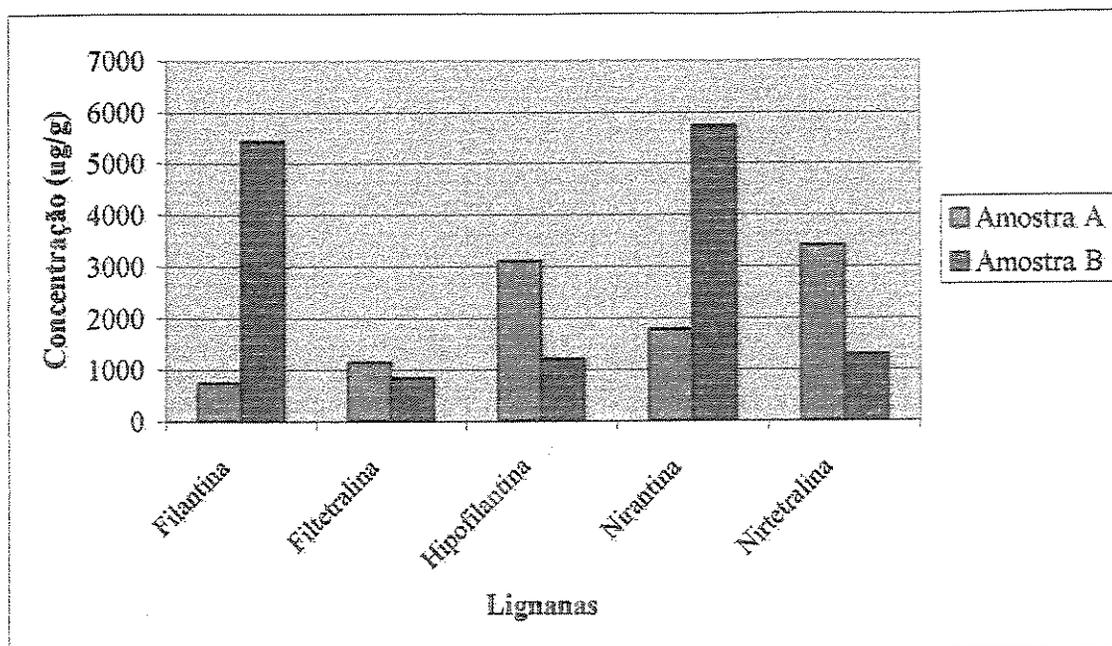


Figura 15. Comparação das amostras de *P. amarus* utilizados nos controles dos ensaios 1 (plantas com teor de filantina – 0,16%) e 2 (plantas com teor de filantina – 0,76%) através da análise dos teores das lignanas filantina, nirantina, hipofilantina, nirtetralina e filtetralina presentes nestas plantas, por CLAE-UV (235 nm) (coluna azul, ensaio 1; coluna vermelha, ensaio 2).

6. CONCLUSÃO

O AJ agiu como agente eliciador sobre ambas amostras de *P. amarus*: no ensaio 1, que utilizou a amostra com teor de filantina 0,16%, houve aumento dos teores de hipofilantina e nirtetralina: o teor de hipofilantina aumentou em 36,46%, 15,75 % e 40,08% após 24, 48 e 168 horas, respectivamente; o teor da nirtetralina também aumentou após 48, 72 e 168 horas, de 11,10%, 31,93% e 44,14%, respectivamente. As demais lignanas analisadas também apresentaram aumento dos seus teores mas não foram significativos estatisticamente em virtude do seu grande coeficiente de variação.

No ensaio 2, que utilizou uma amostra com teor de filantina de 0,76%, ocorreu aumento significativo do teor da filantina. Além disso, as plantas desta amostra apresentaram sintomas de senescência: clorose e abscisão foliar, comprovada pela diminuição das massas fresca, seca e seca foliar.

A determinação dos teores das lignanas pode ser utilizado como método de diferenciação para as plantas de *P. amarus* coletadas em diferentes regiões.

CAPÍTULO II - EFEITOS DO SULFATO DE COBRE NOS TEORES DE LIGNANAS DE *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn

1. INTRODUÇÃO

Os nutrientes minerais são íons inorgânicos presentes no ambiente e que são absorvidos principalmente pelas raízes e translocados para diversas partes das plantas. Eles são classificados segundo a sua concentração na planta: macronutrientes, necessários em concentrações de 1000 mg/kg de massa seca, e micronutrientes, presentes nos tecidos em concentrações iguais ou menores que 100 mg/kg de massa seca. Os nutrientes foram divididos em essenciais e não-essenciais. Os critérios para se dizer que um elemento é essencial são: a) se a planta não consegue completar seu ciclo de vida sem ele; b) se faz parte de alguma molécula constituinte da planta sem a qual ela não sobrevive. Os elementos essenciais são classificados funcionalmente: aqueles que têm papel estrutural e aqueles que fazem ativação enzimática, que são a maioria dos micronutrientes (Salisbury & Ross, 1991).

Muitos metais pesados, tais como Zn, Ni, Co, Cd, Cu e Pb podem, eventualmente, ser encontrados no solo em concentrações elevadas, mas apresentam-se muito freqüentemente como poluentes em regiões de grande atividade industrial e agrícola. A indústria de metais não-ferrosos, mineração, uso de pesticidas e fertilizantes, além do lixo industrial, são importantes fontes de dispersão de metais pesados no ambiente. Os cátions dos metais citados anteriormente são classificados segundo a sua afinidade de ligação: elementos classe A, que se ligam com substâncias que contêm O-ligantes, e elementos classe B, que possuem grande afinidade com S-ligantes, classe que provavelmente o Cu faz parte. Parada do crescimento, clorose e necrose, epinastia das folhas e descoloração marrom-avermelhada são sintomas visíveis de fitotoxicidade. A atividade enzimática pode ser significativamente inibida; porém,

outras enzimas podem ter sua atividade aumentada, ou como resultado de uma nova síntese protéica, ou por ativação de enzimas já presentes (Assche & Clijsters, 1990).

O Cu é considerado um micronutriente essencial para as plantas desde os trabalhos pioneiros de Sommer e Lipman & McKinney, que observaram a sua importância para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Fernandes & Henriques, 1991). Ele é um componente estrutural e catalítico de proteínas e enzimas envolvidas em diversas vias metabólicas, é absorvido na forma de íon nas raízes, um dos principais locais de acúmulo é o cloroplasto e está diretamente envolvido como componente da plastocianina na cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese no PS2. A sua deficiência diminui a atividade de PS2, sem modificar a composição protéica da membrana do tilacóide (Maksymiec, 1997).

Ao contrário de outros metais pesados, o Cu não é bioacumulado em mamíferos, assim, a sua toxicidade para estes é relativamente baixa. Quanto aos vegetais, estes são muito sensíveis, apresentando perturbações metabólicas e diminuição do crescimento por aumentos muito pequenos nas concentrações tissulares destes íons. Sua concentração normal nos tecidos vegetais é 3,5 µg/mL em plantas marinhas, entre 5 e 20 µg/mL em plantas terrestres. Os sintomas de deficiência surgem quando a sua concentração interna está abaixo de 5 µg/mL e os sintomas tóxicos aparecem quando a sua concentração interna está acima de 20 µg/mL (Fernandes & Henriques, 1991). O limite de concentração favorável do Cu para um crescimento ótimo da planta é muito estreito e, acima do seu limite, pode ser altamente tóxico (Teisseire & Guy, 2000).

Seus efeitos tóxicos primários são decorrentes do aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que leva a uma perda de íons K⁺ e outros solutos. A permeabilidade da membrana depende do grau de peroxidação lipídica. Este processo é iniciado pelos radicais livres, tais como o radical hidroxila, gerado na reação de Haber-Weiss, e radicais peróxi e

alcóxi, que surgem da decomposição de hidroperóxidos orgânicos. O Cu pode facilmente catalisar a formação destes radicais livres, causando um estresse oxidativo na célula, mas os seus efeitos danosos podem ser neutralizados por reações enzimáticas e não-enzimáticas. As enzimas peroxidase (POD), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), assim como substâncias oxidantes como a vitamina C, glutatona e α -tocoferol, têm um papel-chave no controle do teor celular destas espécies de oxigênio reativo (Weckx & Clijsters, 1996).

Sua ação tóxica atinge as raízes das plantas terrestres, em virtude da contaminação do solo, provocando alterações na permeabilidade da membrana celular (De Vos, 1989), mas o metabolismo das folhas também é alterado (Sandmann & Böger, 1980), especialmente o aparelho fotossintético, resultando em decréscimo das taxas de transferência de elétrons em virtude da sua ligação a numerosos sítios do PS2, diminuindo o desempenho do processo fotossintético (Maksymiec, 1997).

Por outro lado, a deficiência do cobre produz, em folhas jovens, uma coloração verde-escura com áreas necróticas nas extremidades que se estendem até a base da folha ao longo das bordas. As folhas também podem estar torcidas ou malformadas. Quando a deficiência de cobre é extrema, elas sofrem abscisão prematuramente (Taiz & Zeiger, 1998).

1.1. Indução enzimática e o uso do cobre como eliciador

A interação direta de um metal com a planta provoca grande variedade de respostas metabólicas, alterando o seu desenvolvimento, passando a apresentar características de senescência e provocando o aumento da atividade de certas enzimas. Este estado é chamado de indução enzimática, e estas enzimas devem apresentar importante papel no metabolismo do estresse por metais (Assche & Clijsters, 1990).

A indução das enzimas peroxidase (POD) é uma resposta geral a quantidades tóxicas de metais, estando muito relacionada ao aumento das concentrações tissulares de Cu, assim

como outras situações de estresse como poluição do ar, frio, fermento ou infecções (Mukherji & Gupta, 1972). Neste processo de defesa contra fatores de estresse, originam-se ROS que causam peroxidação lipídica e desestabilizam a membrana do tilacóide (Assche & Clijsters, 1990). As enzimas POD, CAT e a IAA-oxidase tiveram sua atividade aumentada proporcionalmente ao aumento da concentração de Cu. O aumento da atividade da IAA-oxidase, aumentando a degradação do IAA, foi observado em raízes de *Hordeum vulgare* tratadas com excesso de Cu, inibindo seu crescimento (Mukherji & Gupta, 1972). Observou-se que, ao induzir o estresse em *Ceratophyllum demersum* L. com concentrações de 2 a 4 µM de Cu, ocorria aumento da atividade das enzimas POD, CAT e superóxido dismutase (SOD), cuja função é modular ou impedir a oxidação (Mazhoudi *et al.*, 1997; Devi & Prasad, 1998). Díaz *et al.* (2001) observaram que o Cu provocou aumento da atividade das enzimas POD e SKDH em hipocótilo de pimenteira (*Capsicum annuum* L.). Li *et al.* (2001) observaram inibição do crescimento das raízes de amendoim e decréscimo nos níveis endógenos de IAA, com aumento da atividade da enzima POD e elevação da síntese de lignina nas raízes.

Elicidores são fatores que induzem à síntese de fitoalexinas e outras respostas defensivas em células que foram por eles estimuladas (Neill *et al.*, 1994), são empregados para induzir as vias biossintéticas dos metabólitos secundários para elucidar os mecanismos da sua síntese, distribuição e acúmulo, sendo divididos em bióticos e abióticos. Os metais pesados (abióticos) são quimicamente melhor definidos que os eliciadores bióticos, podendo ativar a via fenilpropanóide através da ativação da PAL (Santiago *et al.*, 2000). Desta forma, o cobre é capaz de fazer a indução de isoflavonóides (Parry *et al.*, 1994) e compostos fenólicos em geral (Santiago *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste ensaio foi verificar os efeitos do eliciador abiótico sulfato de cobre em *P. amarus*, através da dosagem das lignanas filantina, filtetralina, hipofilantina, nirantina e nirtetralina através de CLAE-UV (HPLC).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Este ensaio foi conduzido na Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/ UNICAMP, situado na cidade de Paulínia/ SP. A espécie utilizada foi *P. amarus*, sendo que uma exsicata (número UEC 127.411) está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

A planta utilizada é nativa do Brasil, proveniente do estado do Maranhão, cultivada no campo experimental do CPQBA. O seu teor de filantina é 0,16%, determinado previamente por CLAE-UV.

A sementeira foi feita em tubetes no dia 02/08/2001, sendo postas, em média, 5 sementes por tubete, e colocadas em um viveiro de sombrite 50%. As temperaturas máxima e mínima no local, nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro, foram, respectivamente: 27,0 °C/ 11,0 °C; 29,0 °C/ 12,0 °C; 30,0 °C / 14,0 °C; e 32,0 °C/ 19,0 °C. O material recebia 5 regas diárias por aspersão. Após 20 dias, as plantas apresentavam 3,0 cm de altura, sofrendo, então, o desbaste e, após 2 meses da sementeira (02/10/2001), elas foram transplantadas para vasos que continham uma mistura de partes iguais de terra de superfície (latossolo vermelho escuro-argiloso) e esterco bovino curtido (submetido à ação de minhocas da Califórnia durante 30 dias), sendo mantidas no mesmo viveiro, onde receberam o tratamento após 53 dias.

Um dia antes da aplicação do tratamento, as plantas foram separadas aleatoriamente e divididas em dois grupos denominados CuSO₄ (cobre) e Ct (controle). Foram feitas 4 repetições de cada tratamento em cada tempo de coleta (tempo 0, 1, 3, 6 e 10 horas), cada repetição contendo 3 plantas, atingindo o número total de 60 plantas por tratamento.

3.2. Tratamento com Sulfato de Cobre

Os tratamentos foram feitos na manhã do dia 24/11/2001, através da pulverização das soluções de sulfato de cobre e de Tween-20. Utilizou-se o pulverizador de pressão acumulada Brudden, com capacidade de 2,0 L. O tratamento Ct recebeu uma solução aquosa de Tween-20 0,05% (v/v) em água bidestilada estéril e o tratamento CuSO_4 recebeu uma solução aquosa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M e Tween-20 0,05% (v/v) em água bidestilada estéril, conforme trabalho publicado por Santiago *et al.* (2000). O volume das soluções foi de 0,5 L para 60 plantas, uma média de 8,3 mL da solução por planta. A pulverização foi feita manualmente, de forma homogênea. As plantas foram colhidas nos tempos 0, 1, 3, 6 e 10 horas, seus caules foram cortados à cerca de 1,0 cm acima da terra e, em seguida, foram secas em estufa com circulação de ar a uma temperatura de $40,0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após este período, as folhas, frutos e sementes foram separados e moídos em um moinho com malha tamanho 40. O material resultante foi guardado em frascos de vidro.

Após o corte e antes da secagem, obteve-se a massa fresca; depois da secagem, pesou-se as plantas com caules e pecíolos, obtendo-se a massa seca e, finalmente, as folhas, frutos e sementes foram pesados, obtendo-se a massa seca foliar de cada repetição.

3.3. Extração

A extração das plantas do tratamento com cobre sofreu uma lavagem prévia com água bidestilada, para retirar a maior quantidade possível de sulfato, e, posteriormente, fez-se a extração com metanol. As amostras do tratamento Ct receberam o mesmo processo de extração. Para o controle não houve mudanças significativas nas massas anteriores e posteriores ao processo citado, mas, para o tratamento CuSO_4 , pela retirada do sulfato, houve uma diminuição significativa (45%) entre a massa anterior e posterior à primeira etapa, .

Na primeira etapa, foram colocados 200,0 mg de folhas moídas de cada amostra em um balão contendo 10,0 mL de água bidestilada. O material foi agitado por 15 minutos à temperatura ambiente em um agitador magnético e centrifugado a 1087,44 g, por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo da extração foi seco em estufa a 40,0°C e utilizado na etapa seguinte da extração. Através desta pré-lavagem, o material restante ficou aparentemente isento de sulfato de cobre, mas a massa resultante foi, em média, 45% inferior em relação à massa inicial. Desta forma, como as massas analisadas das amostras do tratamento cobre eram 45% menores, todos os valores obtidos nas análises foram corrigidos, para que os resultados fossem comparáveis. O motivo da pré-lavagem foi que o sulfato de cobre formou um complexo com o Tween 20, impedindo totalmente a análise por CLAE-UV, e também para termos massas vegetais semelhantes nas amostras a serem comparadas.

Na extração foram acrescentados 5,0 mL de metanol ao resíduo seco e feita a primeira extração com extrator Polytron por 1 minuto, a 15.000 rpm, sendo posteriormente centrifugado a 1087,44 g e o sobrenadante vertido em um balão volumétrico de 25,0 mL. Ao resíduo acrescentou-se 5,0 mL de metanol, sofrendo segunda extração pelo Polytron por 1 minuto, a 15.000 rpm. O sobrenadante foi vertido no balão volumétrico que recebeu a primeira extração e o volume foi completado com metanol até atingir 25,0 mL. As amostras foram extraídas em duplicata.

3.4. Análise dos extratos por CLAE-UV

Para a análise utilizou-se o sistema cromatográfico Waters, constituído por uma bomba Waters Millipore Modelo M-45 de pistão simples, injeção manual e vazão de 1,2 mL/min; um forno para aquecimento da coluna Waters, cuja temperatura foi mantida a 40,0°C; a separação foi realizada por uma coluna de fase reversa Supelco C18/5 μ /250x4,6 mm. A detecção foi feita no modo absorvância, em um comprimento de onda de 235nm, sensibilidade de 0,05

Aufs, através de um detector UV-Vis Waters modelo 481. A integração foi feita por um integrador Waters 745B Data Module. Como fase móvel utilizou-se o ácido acético 3% em água bidestilada, diluído em metanol, na proporção 35:65.

O tempo necessário para a análise de cada amostra foi de 20 minutos, e o fluxo da fase móvel foi mantido por mais 20 minutos para a limpeza da coluna. O volume de amostra injetado foi de 20 μ L. Os padrões das lignanas analisadas foram obtidos na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do CPQBA. As dosagens de filantina e hipofilantina foram obtidas através das curvas de calibração. Através da curva de calibração da filantina obteve-se as concentrações de nirantina; através da curva de calibração da hipofilantina, obteve-se as concentrações de filtetralina e nirtetralina. Relacionou-se a filantina com a nirantina, e a hipofilantina com a filtetralina e nirtetralina por pertencerem às mesmas classes de lignanas.

3.5. Análise estatística

Os resultados foram avaliados pela análise de variância simples e o Teste T de “Student”, comparando-se os tratamentos cobre e controle; as médias da massa fresca, massa seca total, massa seca foliar e as dosagens médias das lignanas obtidas nos tratamentos foram comparados entre si, nos respectivos tempos de coleta. A diferença entre as amostras foi considerada significativa quando o nível de significância foi igual a 5%.

4. RESULTADOS

a) Aspectos visuais

Entre o tempo 0 e 1 hora, as folhas das plantas tratadas com sulfato de cobre começaram a apresentar intensa descoloração (passaram, gradualmente, da cor verde escuro para verde claro) e ressecamento, ocorrendo, concomitantemente, o emurchecimento dos ápices caulinares, seguido da abscisão progressiva das folhas e frutos (após 6 horas), culminando com a morte das plantas (fig. 16). As folhas apresentavam cor azulada, por causa da impregnação pelo sulfato de cobre.



Figura 16. Foto da planta *P. amarus* mostrando o ressecamento das folhas após 6 horas do tratamento com sulfato de cobre 0,5 M.

b) Dados biométricos

1) Massa fresca

Os tratamentos e as médias da massa fresca não apresentaram variações significativas neste ensaio (Tabela 18).

Tabela 18. Evolução das médias da massa fresca (g) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina de 0,16%, dos tratamentos CuSO₄ e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO₄ 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO ₄ (g)	45,91	35,26± 2,12	20,00± 4,45	22,67± 1,71	20,56± 5,17
Ct(g)	30,17	41,10± 7,21	24,85± 5,79	26,51±8,72	23,77± 2,73
CV (%)	---	27,8	23,0	25,5	18,7
Teste T	---	NS	NS	NS	NS

NS = não-significativo

2) Massa seca total

Houve aumento das médias da massa seca de 8,9%, 57,35% e 66,32% nos tempos 3, 6 e 10 horas do tratamento com sulfato de cobre (Tabela 19).

Tabela 19. Evolução das médias da massa seca (g) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, dos tratamentos CuSO₄ e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO₄ 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO ₄ (g) (1)	9,76	11,14± 0,68	9,5± 0,93	11,88± 0,29	11,16± 1,28
Ct (g)	6,82	10,23± 2,02	6,33± 0,77	7,55± 1,15	6,71± 0,32
CV (%)	---	28,2	21,7	17,3	20,9
Teste T	---	NS	*	*	*

(1) nível de significância de 1% na comparação entre os tratamentos

(*) nível de significância de 5% NS = não-significativo

3) Massa seca foliar

Os tratamentos e as médias da massa seca foliar não apresentaram variações significativas em qualquer tempo do ensaio (Tabela 20).

Tabela 20. Evolução das médias da massa seca foliar (g) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina de 0,16%, dos tratamentos CuSO₄ e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO₄ 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média± erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO ₄ (g)	1,62	2,42± 0,21	1,36± 0,24	1,79± 0,19	1,58± 0,25
Ct (g)	1,76	2,84± 0,82	1,49± 0,20	1,86± 0,33	1,89± 0,12
CV (%)	---	45,5	31,2	29,6	22,6
Teste T	---	NS	NS	NS	NS

NS = não-significativo

c) Determinação da concentração média das lignanas

Os tempos de retenção para as substâncias analisadas foram, em ordem crescente: 11,42 para a filtetralina, 13,10 para a hipofilantina, 14,96 para a filantina, 16,72 para a nirtetralina e 18,90 minutos para a nirantina (fig. 17).

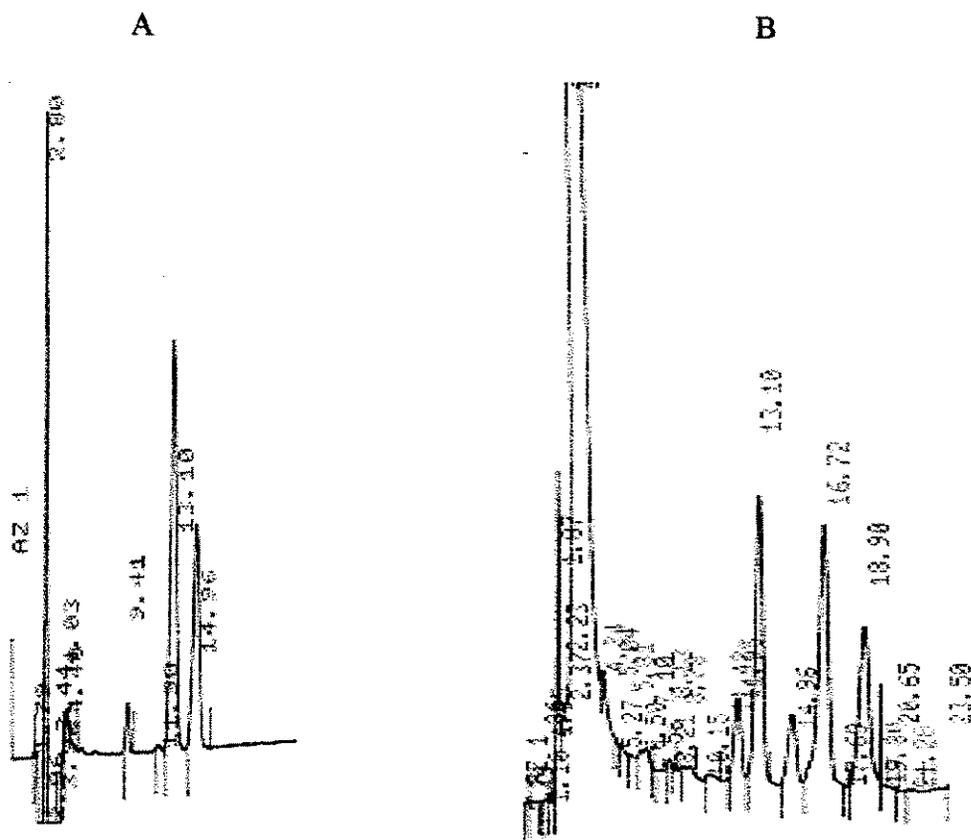


Tabela 21. Evolução das concentrações médias de filantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina de 0,16%, nos tratamentos CuSO_4 e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO_4 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO_4 ($\mu\text{g/g}$) (NS)	815,2	640,7 \pm 120,8	356,6 \pm 21,4	511,0 \pm 104,5	762,0 \pm 339,0
Ct ($\mu\text{g/g}$)	764,9	1038,6 \pm 295,0	797,9 \pm 209,4	785,1 \pm 186,7	1156,9 \pm 550,4
CV (%)	---	53,7	51,6	46,7	95,3
Teste T	---	NS	NS	NS	NS

NS = não-significativo

2) Análise da concentração média de hipofilantina

O tratamento com CuSO_4 diminuiu significativamente o teor de hipofilantina em 11,61% após 1 hora e de 26,77% após 3 horas (Tabela 22).

Tabela 22. Evolução das concentrações médias de hipofilantina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, nos tratamentos CuSO_4 e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO_4 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO_4 ($\mu\text{g/g}$) (1)	3454,6	2848,3 \pm 272,3	2269,3 \pm 65,6	2456,1 \pm 384,5	2353,7 \pm 149,8
Ct ($\mu\text{g/g}$)	2644,5	3222,4 \pm 270,8	2824,8 \pm 107,5	3053,4 \pm 158,8	2474,1 \pm 382,8
CV (%)	---	17,9	7,0	21,4	24,1
Teste T	---	*	*	NS	NS

(1) nível de significância de 1% (*) nível de significância de 5% NS = não-significativo

3) Análise da concentração média de fletetralina

Houve diminuição do teor de fletetralina no tratamento CuSO_4 de 26,84% após 1 hora e de 36,33% após 3 horas (Tabela 23).

Tabela 23. Evolução das concentrações médias de fletetralina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina 0,16%, nos tratamentos CuSO_4 e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO_4 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO_4 ($\mu\text{g/g}$) (1)	988,9	806,2 \pm 73,5	672,5 \pm 28,2	786,8 \pm 195,3	734,9 \pm 97,9
Ct ($\mu\text{g/g}$)	1205,2	1102,1 \pm 100,2	1056,4 \pm 42,8	1100,4 \pm 45,3	888,2 \pm 139,6
CV (%)	---	18,4	8,4	30,1	29,7
Teste T	---	**	**	NS	NS

(1) significância entre os tratamentos de 1% (**) significância de 1% NS = não-significativo

4) Análise da concentração média de nirantina

O tratamento com CuSO_4 diminuiu significativamente o teor médio de nirantina em 45,81% após 3 horas do tratamento. Nos demais tempos, apesar de não significativa, observou-se diminuição dos teores nas plantas tratadas com sulfato de cobre em relação às aquelas do tratamento controle (Tabela 24).

Tabela 24. Evolução das concentrações médias de nirtetralina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina de 0,16%, nos tratamentos CuSO_4 e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO_4 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO_4 ($\mu\text{g/g}$) (1)	1945,1	1621,1 \pm 259,9	1081,8 \pm 41,7	1225,5 \pm 168,8	1512,9 \pm 312,4
Ct ($\mu\text{g/g}$)	1899,9	2543,6 \pm 545,9	1996,2 \pm 155,2	1903,0 \pm 375,1	2004,0 \pm 674,1
CV (%)	---	41,1	14,8	37,2	59,8
Teste T	---	NS	**	NS	NS

(1) significância entre os tratamentos de 1% (**) significância de 1% NS = não-significativo

5) Análise da concentração média de nirtetralina

A diferença entre os tratamentos não foi significativa, mas as médias do teor de nirtetralina apresentaram variação significativa no tempo de 3 horas, ocorrendo diminuição do teor de nirtetralina no tratamento cobre de 24,57%. As concentrações estão diminuídas em todos os demais tempos, mas elas não são significativas estatisticamente (Tabela 25).

Tabela 25. Evolução das concentrações médias de nirtetralina ($\mu\text{g/g}$) de *P. amarus*, amostra com teor de filantina de 0,16%, nos tratamentos CuSO_4 e Ct, em ensaio com uma solução de CuSO_4 0,5 M. Os números indicam o tempo (h), a média \pm erro padrão da média e o coeficiente de variação.

	0 (h)	1 (h)	3 (h)	6 (h)	10 (h)
CuSO_4 ($\mu\text{g/g}$) (NS)	4058,30	3250,7 \pm 242,7	2517,8 \pm 67,6	2830,9 \pm 404,5	2757,4 \pm 217,4
Ct ($\mu\text{g/g}$)	3005,30	3542,0 \pm 277,4	3337,9 \pm 180,4	3339,1 \pm 110,0	2558,0 \pm 295,2
CV (%)	---	15,3	9,3	19,2	19,5
Teste T	---	NS	**	NS	NS

(**) significância de 1% NS = não-significativo

5. DISCUSSÃO

O sulfato de cobre 0,5 M provocou uma intoxicação aguda nas plantas tratadas, observável nos sintomas precoces e intensos apresentados: descoloração, ressecamento e abscisão foliar, levando-as à morte durante o ensaio.

A descoloração das folhas verificada sugere diminuição da concentração de clorofila. Sabe-se que os íons Cu afetam intensamente o aparelho fotossintético, decompondo a parede dos tilacóides pela peroxidação lipídica, levando à perda de clorofila (Ouzounidou, 1996). Devi & Prasad (1998) observaram decréscimo de 16,4% e 23,1% da concentração de clorofila na planta *Ceratophyllum demersum*, em concentrações de Cu de 2 e 4 μM , respectivamente, após 24 horas do tratamento. A peroxidação lipídica não ocorre somente nas membranas dos tilacóides, mas em todas as membranas celulares. A desestruturação da membrana plasmática, alterando a sua permeabilidade, poderia ser a causa da intensa desidratação observada nas folhas. Luna *et al.* (1994) referem que o Cu, em doses tóxicas, em virtude dos altos índices de peroxidação lipídica, causa aumento da permeabilidade da membrana plasmática, levando aos fenômenos de senescência em plântulas de aveia.

A massa seca das plantas que receberam o tratamento CuSO_4 estava aumentada em relação ao tratamento Ct por causa da intensa impregnação das plantas pelo sulfato de cobre empregado no tratamento, que também alterou a coloração do material vegetal e que dificultou as análises por CLAE-UV, necessitando ser retirado para que as análises pudessem ser feitas.

A diminuição da massa seca foliar do tratamento CuSO_4 em relação ao tratamento Ct é consequência da abscisão foliar.

Quanto à análise dos teores das lignanas, observou-se que o tratamento com CuSO_4 diminuiu os teores de todas as lignanas, pois todas tinham seus teores menores que os do tratamento CT.

Santiago *et al.* (2000) obtiveram resultados aparentemente opostos aos obtidos neste experimento: ocorreu aumento do conteúdo de compostos fenólicos no interior de vacúolos de células esponjosas e indução da PAL, a partir da terceira hora, atingindo o máximo de concentração depois de 6 horas do tratamento, nas células paliçádicas, mostrando um efeito eliciador do Cu. Estas diferenças são aparentes, pois Santiago não identificou quais compostos fenólicos aumentaram, enquanto que neste experimento analisou-se um grupo de compostos fenólicos específicos.

Portanto, em virtude da grande inibição do metabolismo global destas plantas, concluiu-se que a aplicação do sulfato de cobre 0,5 M foi excessiva, não permitindo avaliar se o cobre poderia agir como um eliciador das lignanas, pelo menos nesta concentração empregada. Deveria ter sido feito um pré-teste, com concentrações gradativamente menores de sulfato de cobre, para se avaliar a partir de qual concentração esta substância deixa de ser tóxica e qual poderia induzir a biossíntese destas lignanas.

6. CONCLUSÃO

O tratamento com sulfato de cobre 0,5 M provocou uma intoxicação aguda nas plantas de *P. amarus*, que apresentaram intensa desidratação, descoloração e abscisão foliar, culminando com a morte das plantas.

Os teores das lignanas das plantas tratadas com CuSO_4 foram severamente afetados, apresentando-se diminuídos em relação ao controle, o que pode ser explicado pela alta concentração de sulfato de cobre utilizada neste ensaio. Seriam necessários pré-testes, com concentrações gradativamente menores de sulfato de cobre, para se determinar qual concentração não seria tóxica e que poderia aumentar os teores das lignanas desta planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, R.J. Schäfer, A., Hesse, M, Baumann, T.W. & Slusarenlo, A. Signalling molecules and the synthesis of alkaloids in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry* 42 (2): 417-422, 1996.
- Assche, F.V. & Clijsters, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13: 195-206, 1990.
- Barroso, G.M., 1991. Sistemática de Angiospermas do Brasil, três volumes. Universidade Federal de Viçosa, Segunda Edição, Viçosa, pp. 198.
- Becker, L., 1997. Propagação Vegetativa *in vivo* de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. E *in vitro*, Indução de Calos, Nutrição, Extração e Quantificação de Alcalóides na Espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, tese de Mestrado.
- Bernards, M.A., Susag, L. M., Bedgar, D. L., Anterola, A. M. & Lewis, N. G. Induced phenylpropanoid metabolism during suberization and lignification: a comparative analysis. *J. Plant Physiol.* 157: 601-607, 2000.
- Binns, S.E. Inparajah, I., Baum, B. R. & Arnason, J. T. Methyl jasmonate increases reported alkamides and ketoalkene/ynes in *Echinacea pallida* (Asteraceae). *Phytochemistry* 57: 417-420, 2001.
- Blechert, S. Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Mueller, M. J., Xia, Z-Q. & Zenk, M. H. The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92: 4099-4105, 1995.
- Blumberg, B.S., Millman, I., Venkateswaran & Thyagarajan, S. P. Hepatitis B virus and primary hepatocelular carcinoma: treatment of HBV carriers with *Phyllanthus amarus*. *Vaccine* 8: S 86 – S 92, Suppl. S Mar 1990.

- Burlat, V., Kwon, M., Davin, L. B. & Lewis, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry* 57: 883-897, 2001.
- Calixto, J.B., Santos, A. R. S., Cechinel Filho, V. & Yunes, R. A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 18: 225-258, 1998.
- Campos-Vargas, R. & Saltveit, M.E. Involvement of putative wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiol. Plant.* 114: 73-84, 2002.
- Chu, A., Dinkova, A., Davin, L. B., Bedgar, D. L. & Lewis, N. G. Stereospecificity of (+)-piroresinol and (+)-lauriciresinol reductases from *Forsythia intermedia*. *J. Biol. Chem.*, 268 (36): 27026-27033, 1993.
- Clériveret, A. & Alami, I. Effects of jasmonic acid and of an elicitor from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* on the accumulation of phytoalexins in leaves of susceptible and resistant plane trees. *Plant Sci.*, 148: 105-110, 1999.
- Cohen, Y., Gisi, U. & Niderman, T. Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83 (10): 1054-1062, 1993.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92: 4114-4119, 1995.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 48: 355-381, 1997.
- Creelman, R.A., Tierney, M. L. & Mullet, J. E. Jasmonic acid/ methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotils and modulate gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 4938-4941, 1992.

- Devi, S.R. & Prasad, M.N.V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.* 138: 157-165, 1998.
- De Vos, C.H.R., Schat, H., Vooijs, R. & Ernst, W. H. O. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J. Plant Physiol.* 135: 164-169, 1989.
- Díaz, J., Barceló, A. R. & Cáceres, F. M. Changes in shikimate dehydrogenase and the end products of the shikimate pathway, chlorogenic acid and lignins, during the early development of seedlings of *Capsicum annuum*. *New Phytol.* 136: 183-188, 1997.
- Díaz, J. & Merino, F. Wound-induced Shikimate Dehydrogenase and Peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *J. Plant Physiol.* 152: 51-57, 1998.
- Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F. & Merino, F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci.* 161: 179-188, 2001.
- Dittrich, H., Kutchan, T. M. & Zenk, M. H. The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures. *FEBS*, 309 (1): 33-36, 1992.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097, 1995.
- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E. W. & Ryan, C. A. Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the decanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4095-4098, May 1995.
- Farmer, E.E. & Ryan, C.A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87: 7713-7716, 1990.

- Fernandes, J.C. & Henriques, F.S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57(3): 246-273, 1991.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M. & Zenk, M. H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393, 1992.
- Hammerschmidt, R. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiol. Mol. Plant P.* 55: 77-84, 1999.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. & Okada, K.. The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2191-2209, 2001.
- Joly, A.B., 1983. Família Euphorbiaceae IN: Botânica, introdução à taxonomia vegetal. 6th Edition, Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp. 398-406.
- Kué, J. Development and future direction of induced systemic resistance in plants. *Crop Prot.* 19: 859-861, 2000.
- León, J., Rojo, E. & Sánchez-Serrano, J. Wound signaling in plants. *J. Exp. Bot.* 52: 354, 1-9, 2001.
- Lewis, N.G. & Davin, L.B., 1998. The biochemical control of monolignol coupling and structure during Lignin and Lignan biosynthesis. *ACS Symposium Series, Washington, DC, 697: 334-361.*
- Lewis, N.G., Davin, L. B. & Sarkamen, S. 1998. Lignin and Lignan biosynthesis: Distinctions and Reconciliations. *ACS Symposium Series, Washington, DC, 697: 1-27.*
- Li, T-C, Feng, T-Y., Chen, W-S & Liu, Z-H. The acute effect of copper on the levels of indole-3-acetic acid and lignin in peanut roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 329-334, 2001.

- Luna, C.M., González, C. A. & Trippi, V. S. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35 (1): 11-15, 1994.
- MacRae, W.D. & Towers, G.H.N. Biological activities of lignans. *Phytochemistry* 23 (6): 1207-1220, 1984.
- Magalhães, P. M., Figueira, G. M., Rehder, V. L. G. & Lorenz, M. Genetic variability on *Phyllanthus amarus* (Schum. & Thonn) accessions. IN: World Conference on Medicinal and Aromatic Plants, Budapest, Hungary, abstracts, 2001.
- Maksymiec, W. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34 (3): 321-342, 1997.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H. & Ferjani, E. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicum esculentum*, Mill.). *Plant Sci.* 127: 129-137, 1997.
- McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E. & Browse, J. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94: 5473-5477, 1997.
- Menezes, H. & Jared, C. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 132: 1-7, 2002.
- Miyamoto, K., Oka, M. & Ueda, J. Update on the possible mode of action of the jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development. *Physiol. Plant.* 100: 631-638, 1997.
- Mukherji, S. & Gupta, G.D. Characterization of copper toxicity in lettuce seedlings. *Physiol. Plant.*, 27: 126-129, 1972.
- Neill, S. J., Lenton, J. R. & Wibberley, M. S. Differential effects of elicitors on secondary metabolism in hairy root cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Biochem. Soc. Trans.* 22 (2): 383-388, May 1994.

- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y. Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N. & Omori, T. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol.* 110: 387-392, 1996.
- Ott, M., Thyagarajan, S. P. & Gupta, S. *Phyllanthus amarus* suppresses hepatitis B virus by interrupting interactions between HBV enhancer I and cellular transcription factors. *Eur. J. Clin. Invest.* 27: 908-915, 1997.
- Ouzounidou, G. The use of photoacoustic spectroscopy in assessing leaf photosynthesis under copper stress: correlation of energy storage to photosystem II fluorescence parameters and redox change of P700. *Plant Sci.* 113: 229-237, 1996.
- Paiva, N.L. An introduction to the biosynthesis of chemical used in plant-microbe communication. *J. Plant Growth Regul.* 19: 131-143, 2000.
- Parry, A.D., Tiller, S. A. & Edwards, R. The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 106: 195-202, 1994.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Métraus, J-P. & Broekaert, W.F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 2103-2113, 1998.
- Rakwal, R. & Komatsu, S. Jasmonic acid-induced necrosis and drastic decreases in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase in rice seedlings under light involves reactive oxygen species. *J. Plant Physiol.* 158: 679-688, 2001.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613, 2001.
- Ryan, C.A. & Pearce, G. Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 1-17, 1998.

- Salisbury, F.B. & Ross, C.W., 1991. *Plant Physiology*, Fourth Edition, Wadsworth Publishing Company, Belmont, pp. 116-135.
- Saltveit, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biol. Tec.* 21: 61-69, 2000.
- Sandmann, G. & Böger, P. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.* 66: 797-800, 1980.
- Santiago, L. J. M., Louro, R. P. & Oliveira, D. E. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Ann. Bot.* 86: 1023-1032, 2000.
- Satyanarayana, P. & Venkateswarlu, S. Isolation, structure and synthesis of new diarylbutane lignans from *Phyllanthus niruri*: synthesis of 5'-desmethoxy niranthin and an antitumour extractive. *Tetrahedron* 47 (42): 8931-8940, 1991.
- Schaller, F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *J. Exp. Bot.* 52 (354): 11-23, 2001.
- Sembdner, G. & Parthier, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 44: 569-589, 1993.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M Hayashida, N. & Okazaki, M. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Sci.* 132: 13-19, 1998.
- Simões, M.O.S., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A. & Petrovick, P. R., 1999. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. IN: *Farmacognosia: da planta ao medicamento.*, 1st Edition, Ed. Universidade, Porto Alegre/ Florianópolis, pp. 323-354.

- Taiz, L. & Zeiger, E, 1998. Plant Defenses: Surface Protection and Secondary Metabolites. IN: Plant Physiology, 2nd Edition, pp. 111; pp. 358, 1998.
- Tamogami, S., Rakwal, R. & Kodama, O. Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. FEBS Lett. 412: 61-64, 1997.
- Teisseire, H. & Guy, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). Plant Sci. 153: 65-72, 2000.
- Thaler, J.S. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. Nature 399: 686-687, June 17 1999.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B. Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. & Broekaert, W. F.. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95: 15107-15111, December 1998.
- Thyagarajan, S. P., Thirunalasundari, T, Subramanian, S., Venkateswaran, P. S. & Blumberg, B. S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. Lancet 2 (8614): 764-766, October 1988.
- Umezawa, T., Davin, L. B. & Lewis, N. G. Formation of lignans (-)-secoisolariciresinol and (-)-matairesinol with *Forsythia intermedia* cell-free extracts. J. Biol. Chem. 266 (16): 10210-10217, 1991.
- Unander, D.W. Callus induction in *Phyllanthus* species and inhibition of viral DNA polymerase and reverse transcriptase by callus extracts. Plant Cell Rep. 10: 461-466, 1991.
- Unander, D.W. & Blumberg, B. S. *In vitro* activity of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) species against the DNA polymerase of hepatitis viruses: Effects of growing environment and inter and intra-specific differences. Econ. Bot., 45 (2): 225 – 242, 1991.

- Unander, D. W., Bryan, H. H., Lance, C. J. & Mcmillan Jr., R. T. Uses and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation II. The subgenus *Phyllanthus*. J. Ethnopharmacol., 34: 97-133, 1991.
- Unander, D. W., Webster, G. L. & Blumberg, B. S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation III. The subgenera *Eriococcus*, *Conami*, *Gomphidium*, *Botryanthus*, *Xylophylla* and *Phyllanthodendrum*, and a complete list of the species cited in the three-part series. J. Ethnopharmacol, 36: 103-112, 1992.
- Unander, D. W., Bryan, H. H., Lance, C. J. & McMillan Jr, R. T. *et al.* Cultivation of *Phyllanthus amarus* and evaluation of variables potentially affecting yield and the inhibition of viral DNA polimerase. Econ. Bot., New York 47 (1): 79 – 88, 1993.
- Unander, D. W., Webster, G. L. & Blumberg, B. S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. J. Ethnopharmacol., 45: 1-18, 1995.
- Unander, D. W., Bryan, H. H., Lance, C. J. & McMillan Jr, R. T. Factors affecting germination and stand establishment of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae). Economic Botany 49 (1): 49-55, 1995.
- Vázquez-Flota, F.A. & De Luca, V. Jasmonate regulates development – and light- regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Phytochemistry 49: 395-402, 1998.
- Verpoorte, R. & Maraschin, M., 2001. Engenharia do Metabolismo de Plantas Mediciniais. IN: Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna (R.A. Yunes e J.C. Calixto Editores), 1ª Edição, Argos Editora, Universidade do Oeste de Santa Catarina, pp. 408.
- Vick, B.A. & Zimmerman, D.C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. Plant Physiol. 75: 458-461, 1984.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C. A., Cook, R. J. & Browse, J. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95: 7209-7214, 1998.

- Walling, L.L. The Myriad plant responses to herbivores. *J. Plant. Growth Regul.* 19: 195-216, 2000.
- Ward, R. S. Lignans, neolignans and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 14 (1): 43-74, 1997.
- Weckx, J.E.J. & Clijsters, H.M.M. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. *Physiol. Plant.* 96: 506-512, 1996.
- Xu, Y., Chang, P-F. L., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077-1085 1994.