

Função dos Alcalóides Indólicos Monoterpenóides de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don



Susana Regina Monteiro Marinho

Departamento de Botânica

Faculdade de Ciências

Universidade do Porto

Porto 2001

Susana Regina Monteiro Marinho

**Função dos Alcalóides Indólicos Monoterpenóides de
Catharanthus roseus (L.) G. Don**



Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal

**Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto 2001**

Agradecimentos

À Doutora Mariana Sottomayor, minha orientadora, pelo apoio prestado durante a realização deste trabalho.

A todos os professores que leccionaram as disciplinas da parte escolar do mestrado pela partilha de conhecimentos.

Aos investigadores e funcionários do grupo de investigação de “Stress em Plantas” do IBMC pela disponibilidade que sempre demonstraram.

À Doutora Sílvia Cabral pelo fornecimento pronto e repetido de inóculos de fungos e bactérias utilizados neste trabalho, a partir de culturas do Departamento de Botânica.

Ao professor João Paulo Cabral pelo aconselhamento na escolha dos fungos e bactérias a estudar e no planeamento das experiências de actividade fungistática e bacteriostática.

À empresa francesa Pierre Fabre pelo fornecimento gratuito do padrão puro de α -3,4-anidrovinblastina.

Aos colegas de mestrado pelo apoio e solidariedade que sempre demonstraram.

Aos meus pais e irmãs pelo apoio e incentivo prestados até ao fim.

Aos amigos pela sua presença e incentivo continuado.

Ao Luís Trigo pelo incentivo, apoio e ajuda a qualquer hora.

RESUMO

Catharanthus roseus é uma planta muito conhecida pela acumulação nas suas folhas dos alcalóides anticancerígenos VLB e VCR. Além destes dois alcalóides indólicos monoterpénóides, a planta acumula nas suas folhas uma grande quantidade e variedade deste tipo de compostos, sendo os mais abundantes a catarantina, vindolina e AVLB.

No caso de *C. roseus*, embora haja vários trabalhos que indiciam uma função de defesa antimicrobiana e/ou anti-herbivorismo para os alcalóides indólicos monoterpénóides que esta espécie acumula, não foi nunca abordada directamente a possível função dos principais alcalóides que se acumulam nas folhas: catarantina, vindolina e AVLB.

Assim, este trabalho teve como objectivo a investigação da possível função de defesa dos alcalóides catarantina, vindolina e AVLB nas folhas de *Catharanthus roseus*. Com este fim, foram estimadas as concentrações de acumulação destes alcalóides nas folhas e foi investigada a sua influência no crescimento de vários fungos, uma espécie protista, várias bactérias e a sua influência na alimentação de um herbívoro generalista.

Os estudos efectuados durante a realização deste trabalho permitiram concluir que a concentração global dos três alcalóides estudados diminui com a idade da folha, o que pode corresponder a uma maior defesa química nos tecidos mais jovens e tenros, onde as defesas mecânicas são menos eficientes. Os alcalóides vindolina e anidrovinblastina apresentaram actividade antifúngica em concentrações inferiores (vindolina) ou semelhantes (AVLB) às concentrações fisiológicas e uma actividade antiherbivorismo em concentrações inferiores às concentrações fisiológicas. O alcalóide catarantina apresentou actividade antibacteriana em concentrações inferiores às concentrações fisiológicas.

ÍNDICE

Abreviaturas _____	6
1. INTRODUÇÃO _____	8
1.1. <i>Catharanthus roseus</i> – caracterização e importância _____	8
1.2. Importância histórica dos alcalóides _____	10
1.3. Os alcalóides como produtos do metabolismo secundário _____	13
1.4. Alcalóides indólicos monoterpénóides _____	15
1.4.1. Biossíntese dos alcalóides indólicos monoterpénóides _____	16
1.5. Compartimentalização subcelular do metabolismo de alguns alcalóides indólicos _____	21
1.6. Função dos alcalóides nas plantas _____	23
1.7. Objectivo _____	26
2. MATERIAL E MÉTODOS _____	28
2.1. Material biológico e condições de crescimento _____	28
2.2. Extracção e análise de alcalóides _____	28
2.3. Isolamento de um fungo de plantas de <i>C. roseus</i> infectadas _____	29
2.4. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de três espécies de fungos e uma protista _____	29
2.5. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de duas espécies de bactérias _____	30
2.6. Estudo da actividade dissuasiva de herbivorismo dos alcalóides _____	30
3. RESULTADOS _____	32
3.1. Determinação da concentração de vindolina, catarantina e AVL B em folhas de <i>C. roseus</i> _____	32
3.2. Isolamento de um fungo de plantas de <i>C. roseus</i> infectadas _____	35
3.3. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de três espécies de fungos e uma protista _____	37

3.4. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de duas espécies de bactérias _____	50
3.5. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides na actividade de herbivorismo _____	56
4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS _____	58
5. CONCLUSÕES _____	61
BIBLIOGRAFIA _____	62

Abreviaturas

AS – antranilato sintase

AVLB – α -3,4-anidrovinblastina

CM – corismato mutase

D4H – desacetoxivindolina 4-hidroxilase

DAT – acetilcoenzima A: 4-O-deacetilvindolina 4-O-acetiltransferase

FPP – farnesil difosfato

G10H – geraniol 10-hidroxilase

GPP – geranil difosfato

IPP – isopentenil difosfato

NMT – S-adenosil-L-metionina: 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metiltransferase

OMT – S-adenosil-L-metionina: 16-hidroxitabersonina-16-O-metiltransferase

PAL – fenilalanina amónia liase

RER – retículo endoplasmático rugoso

SGD – estrectosidina β -D-glucosidase

SLS – secologanina sintase

STR – estrectosidina sintase

T16H – tabersonina 16-hidroxilase

TDC – triptofano descarboxilase

VCR – vincristina

VLB – vinblastina

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Catharanthus roseus* – caracterização e importância

Catharanthus roseus (L.) G. Don pertence à família *APOCYNACEA* e é conhecida como a pervinca de Madagáscar, uma vez que, originalmente, era uma espécie endêmica desta ilha. Ao longo de centenas de anos foi largamente cultivada e, nos dias de hoje, pode ser encontrada nas regiões mais quentes do mundo, desenvolvendo-se livremente. Pode dizer-se que, actualmente, tem uma distribuição pantropical (Sottomayor, 1998). Esta planta já foi classificada como pertencendo às espécies *Vinca rosea* L., *Lochnera rosea* e *Ammocallis rosea*

Esta planta pode atingir entre os sessenta a noventa centímetros de altura (figura 1.1). As folhas são opostas e o seu tamanho varia entre três a sete centímetros de comprimento apresentando um tom verde escuro, lustroso na página superior. Floresce durante todo o Verão e as suas flores chegam a atingir os quatro centímetros de diâmetro (Dittmar, 2000).

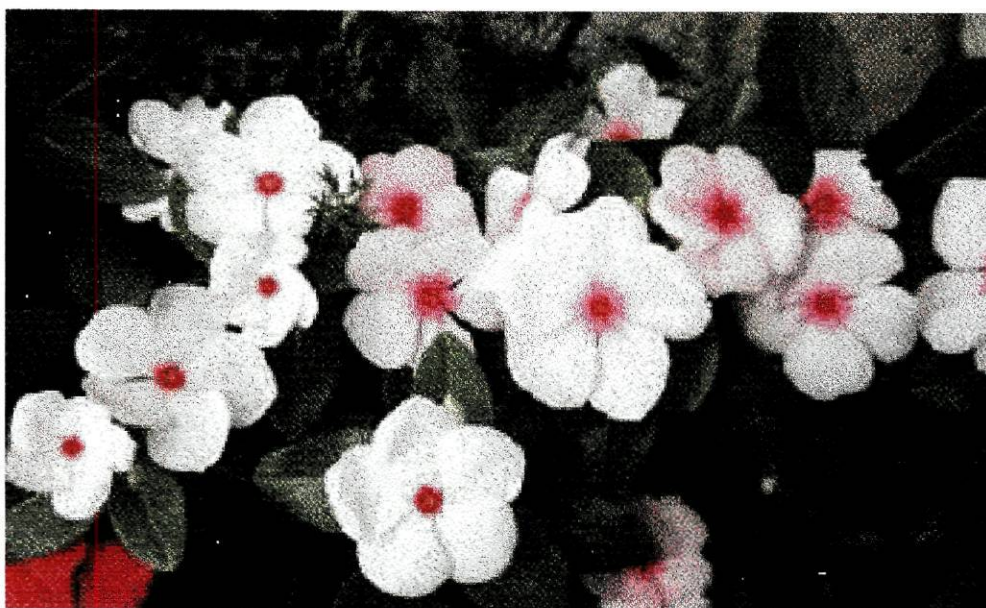


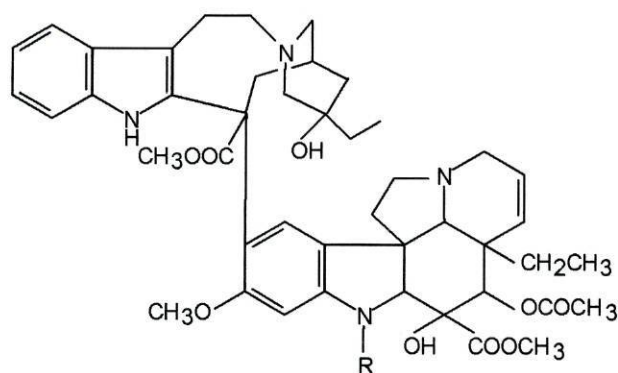
Figura 1.1. *Catharanthus roseus*

C. roseus foi utilizada em medicina tradicional para tratamento de uma grande variedade de doenças. Na Índia, o sumo das suas folhas era utilizado para tratamento de picadas de vespa. No Havai, esta planta era fervida, dando origem a um cataplasma para

parar as hemorragias. Na China era utilizada como diurético e remédio para a tosse. Nas Caraíbas, faziam-se extractos das suas flores que depois eram utilizados no tratamento de irritações oculares e infecções. No entanto, a utilização mais comum desta planta era no tratamento de diabetes.

C. roseus teve, também, reputação de planta mágica. Os europeus pensavam que podia afastar espíritos malignos e os franceses, em particular, referiam-se a esta planta como a “violeta dos feiticeiros”.

Foi a partir dos anos 50 que esta espécie despertou o interesse de um grupo de cientistas do Canadá, quando descobriram que, na Jamaica, as suas folhas eram utilizadas para fazer um chá terapêutico para tratar os diabetes (Noble, 1990). A procura do princípio activo responsável pela actividade anti-diabetes em *C. roseus* não permitiu descobrir nenhum composto com essa actividade mas permitiu sim, inesperadamente, descobrir dois compostos com actividade citostática. Esta descoberta conduziu ao desenvolvimento de dois medicamentos anticancerígenos com ampla utilização ainda actualmente – a vinblastina (VLB) e a vincristina (VCR). Estes compostos (figura 1.2) são alcalóides indólicos monoterpénóides diméricos e são produzidos em quantidades muito pequenas nas folhas de *C. roseus*.



Vinblastina R = CH₃
 Vincristina R = CHO

Figura 1.2. Estrutura química dos alcalóides vinblastina e vincristina (adaptado de Sottomayor, 1998).

A investigação posterior de *C. roseus* levou à descoberta de que as partes aéreas da planta contêm entre 0,2 a 1% de uma mistura de mais de cem alcalóides indólicos monoterpénóides, sendo os mais abundantes a catarantina e a vindolina. É também possível encontrar alcalóides na raiz desta planta. Por exemplo, a ajmalicina é um alcalóide extraído da raiz de *C. roseus* e utilizado no tratamento da hipertensão e perturbações circulatorias (Moreno *et al.*, 1996).

A grande importância farmacológica dos alcalóides de *C. roseus* impulsionou uma intensa investigação da planta, especialmente da via de biossíntese dos alcalóides e da sua expressão em culturas de células, com o objectivo principal de melhorar a produção de VLB e VCR. Assim, a complexa via biossintética destes alcalóides é uma das mais bem caracterizadas vias de metabolismo secundário das plantas, tendo sido já clonados nove genes. Por outro lado, pouco se sabe ainda sobre a função que estes alcalóides desempenham na planta, sendo claro que o seu metabolismo é complexo, mediado por enzimas específicas e sujeito a uma forte regulação ao longo do desenvolvimento e em resposta a sinais ambientais (Meijer *et. al*, 1993; Sottomayor, 1998). Deverá, portanto, desempenhar uma função importante na sobrevivência da planta.

1.2. Importância histórica dos alcalóides

O conhecimento dos alcalóides pelo Homem data de há 4 mil anos tendo, desde então, sido utilizados no fabrico de medicamentos, em poções, chás, cataplasmas e venenos.

A morte de Sócrates, em 399 A.C., deveu-se à ingestão de uma solução contendo coniina (*Conium maculatum*) e Cleópatra usava extractos de *Hyoscyamus muticus*, contendo atropina, para dilatar as pupilas e, assim, parecer mais sedutora (Kutchan, 1995).

As plantas produtoras de alcalóides foram utilizadas por caçadores, padres, feiticeiras e mágicos. Alguns alcalóides interferem com a transmissão dos impulsos nervosos para os músculos levando, assim, à paralisação imediata – são exemplos a aconitina, a toxiferina e a tubocurarina, que desempenharam um papel importante ao serem utilizados como veneno de setas para caça e na luta com os inimigos. Esta utilização prática dos alcalóides

deve ter precedido o seu uso medicinal. Ainda hoje este tipo de venenos é utilizado na África e América do Sul (Roberts e Wink, 1998).

A primeira prova de que os seres humanos utilizavam plantas produtoras de alcalóides é--nos fornecida através de blocos de argila Assirianos, escritos com caracteres cuneiformes. Nestes blocos com 4000 anos estão mencionadas cerca de 250 plantas, incluindo algumas produtoras de alcalóides, tais como a *Papaver somniferum*, *Atropa belladonna* e *Meragora officinarum*.

Apesar do uso de alcalóides em medicina ser antigo, só no início do século XIX se conseguiu isolar algumas destas substâncias. A primeira droga a ser investigada quimicamente foi o ópio, extraída da planta *Papaver somniferum*, utilizada há séculos devido às suas propriedades analgésicas e narcóticas. Em 1803, Derosne isolou um alcalóide semi-puro a partir do ópio e, em 1805, Sertürner, farmacêutico alemão, isolou e caracterizou este constituinte como morfina e reconheceu a sua natureza básica (Roberts e Wink, 1998). Doze anos depois, a descoberta de Sertürner conduziu ao isolamento de uma série de substâncias básicas a partir de outros produtos fisiologicamente activos. Durante três anos, no laboratório de Pelletier e Caventou da Faculdade de Farmácia em Paris, foram isolados os seguintes alcalóides: narcotina em 1817 por Robiquet; emetina em 1817 por Pelletier e Magendie; estriquinina em 1818 por Pelletier e Caventou; veratrina em 1818 por Meibner; brucina em 1819 por Pelletier e Caventou; piperina em 1819 por Oersted; cafeína em 1819 por Runge; chiconina e quinina em 1820 por Pelletier e Caventou (Mothes e Luckner, 1985).

Foi W. Meibner que, em 1818, utilizou pela primeira vez o termo “alcalóides” para denominar estes compostos de origem vegetal com carácter alcalino. Mais tarde foi demonstrado que a sua alcalinidade é devida à presença de um átomo de nitrogénio. Actualmente, utiliza-se o termo alcalóide numa acepção lata para designar compostos secundários (secção 1.3) contendo azoto na sua molécula, geralmente numa configuração heterocíclica. O termo alcalóide abarca, por isso, um grupo muito heterogéneo de compostos quer em termos de estrutura quer de origem biossintética.

Até meados do século XX a determinação da estrutura química dos alcalóides revelou-se uma tarefa difícil. Os métodos utilizados levavam, apenas, à determinação

parcial de estruturas. O passo final na sua determinação seria a síntese do alcalóide em estudo, um acontecimento importante na história da investigação destes compostos.

A coniina, isolada em 1827, tornou-se o primeiro alcalóide a ser sintetizado. Este acontecimento deu-se em 1886 e o cientista responsável foi Ladenburg. Passou-se mais de meio século para se determinar a estrutura deste simples alcalóide (figura 1.3.a), tendo ocorrido o mesmo com outros. Por exemplo: a nicotina, isolada em 1828 só foi sintetizada em 1904 (figura 1.3.b); a quinina, isolada em 1820 foi sintetizada em 1944 (figura 1.3.c); a morfina, isolada em 1806 foi sintetizada em 1952 (figura 1.3.d) e a estriquinina, isolada em 1818 foi sintetizada em 1954 (figura. 1.3.e).

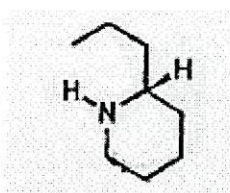


Figura 1.3.a – Coniina

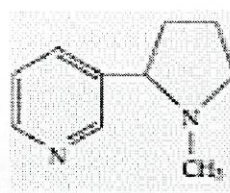


Figura 1.3.b – Nicotina

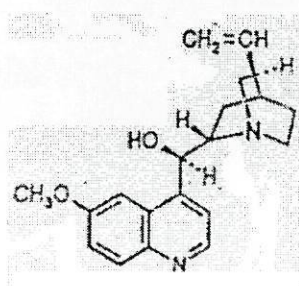


Figura 1.3.c – Quinino

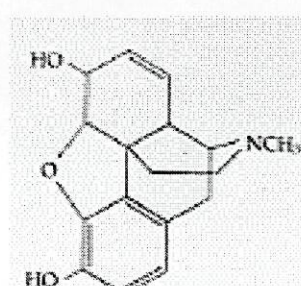


Figura 1.3.d – Morfina

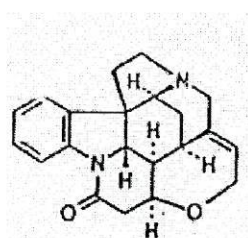


Figura 1.3.e – Estriquinina

Em meados do século XX, iniciou-se uma nova era na investigação dos alcalóides. As técnicas de isolamento tornaram-se mais sofisticadas e novos procedimentos físico-químicos foram introduzidos conduzindo a uma diminuição de tempo entre o isolamento

e a determinação da estrutura dos alcalóides. Foram três os principais avanços técnicos que conduziram a um progresso substancial no conhecimento da formação de alcalóides nas plantas. O primeiro ocorreu nos anos 50, aquando da introdução de precursores marcados radioactivamente que permitiram a elucidação das vias biossintéticas dos alcalóides. O segundo, durante os anos 70, envolveu o aumento da utilização de culturas celulares como uma fonte abundante de enzimas biossintéticas que podiam ser isoladas, purificadas e caracterizadas. Finalmente, nos anos 90, a aplicação de técnicas moleculares que facilitaram o isolamento de vários genes envolvidos na biossíntese de diversos alcalóides (Kutchan, 1995; Facchini, 2001). Desde então, o número de alcalóides descobertos tem aumentado significativamente. Em 1939, eram cerca de 200 os alcalóides isolados e identificados estruturalmente (Roberts e Wink, 1998). Em 1989, o *Dicionário dos Alcalóides* (Southon e Buckingham, 1989) incluía uma lista detalhada de 10 000 alcalóides. Wink (1998) refere que entre os cerca de 50 000 produtos naturais conhecidos actualmente, mais de 12 000 são alcalóides e Memelink *et al.* (2001) já falam em cerca de 16 000.

1.3. Os alcalóides como produtos do metabolismo secundário

Os compostos produzidos pelas plantas são divididos em dois tipos: metabolitos primários e metabolitos secundários. Do primeiro tipo fazem parte produtos que entram na constituição de todos os seres vivos tais como, açúcares, aminoácidos, ácidos gordos, purinas e pirimidinas. As vias biossintéticas destes produtos são muito semelhantes entre os diferentes organismos e classificam-se como fazendo parte do metabolismo primário. Há, no entanto, uma infinidade de produtos naturais que ocorrem esporadicamente na natureza. Estes compostos apresentam um padrão de distribuição restrito a alguns grupos taxonómicos, não sendo considerados essenciais ao metabolismo basal da célula e surgindo, daí, a designação de metabolitos secundários. Até ao momento, foram identificados cerca de 110 000 compostos secundários constituindo os terpenóides o maior grupo (~ 33 000 compostos), seguidos pelos alcalóides (~16 000) (Maraschin e Verpoorte; Memelink *et al.*, 2001).

Os produtos do metabolismo secundário não estão, normalmente, distribuídos igualmente na planta. A sua produção ocorre em órgãos, tecidos ou tipos de células específicos e em determinados estados de desenvolvimento. Por exemplo, as fitoalexinas, são compostos antimicrobiais produzidos, exclusivamente, após injúria da planta ou ataque por bactérias ou fungos. Os metabolitos secundários são produzidos em vários locais dentro das células e armazenados, em grande número, nos vacúolos (Raven *et al.*, 1999; Osbourn, 1996).

A distinção entre metabolismo primário e secundário é, apenas, uma divisão com utilidade didáctica pois não corresponde a uma divisão real na natureza. Não é possível definir um limite preciso entre eles.

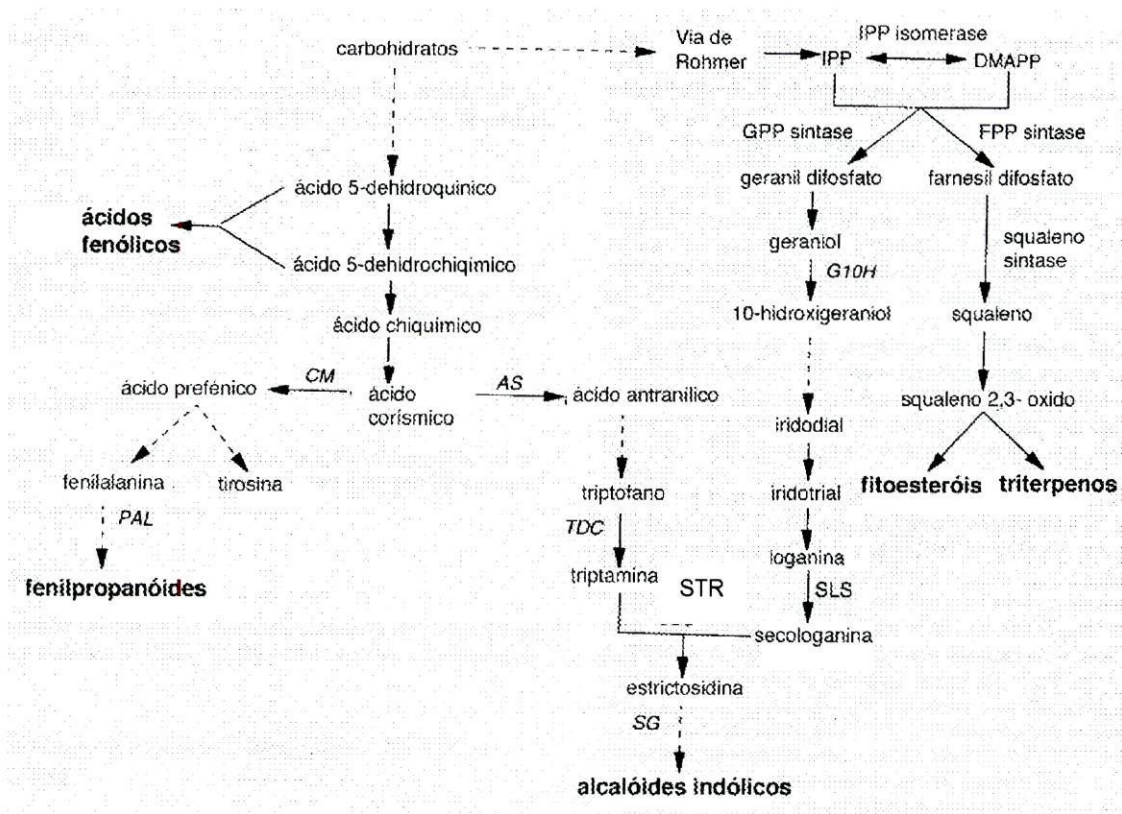


Figura 1.4. Vias bioquímicas que conduzem à biossíntese de fenóis, alcalóides indólicos e terpenóides, as três classes principais de metabolitos secundários produzidos em *Catharanthus roseus*. (AS - Antranilato sintase; CM - corismato mutase; FPP - farnesil difosfato; GPP - geranyl difosfato; G10H - geraniol 10-hidroxilase; IPP-isomerase - isopentenil difosfato isomerase; PAL - fenilalanina amónia liase; SGD - estrictosidina β-D-glucosidase; STR - estrictosidina sintase; TDC - triptofano descarboxilase; SLS – secologanina sintase) (adaptado de Moreno *et al.*, 1996).

Esta distinção tem sido considerada arbitrária e a escolha da designação “secundário” infeliz pois sugere que este metabolismo não é importante (Haslam, 1986). Actualmente, pensa-se que os metabolitos secundários assumem funções importantes nas plantas (secção 1.6) e que a sua produção foi seleccionada no decurso da evolução devido a representar uma vantagem adaptativa relevante para a planta (Haslam, 1986; Mann, 1987; Bennett e Walesgrove, 1994).

Os alcalóides, produtos do metabolismo secundário, são acumulados por cerca de 20% das espécies vegetais (Memelink *et al.*, 2001). A sua síntese dá-se, quase exclusivamente, a partir de um grupo restrito de aminoácidos – ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina e triptofano. Alguns têm origem biossintética mista, como é o caso dos alcalóides indólicos terpenóides de *C. roseus*, que são derivados do triptofano e de precursores terpenóides. A figura 1.4 resume as vias bioquímicas que conduzem à biossíntese de fenóis, alcalóides e terpenóides, as três classes principais de metabolitos secundários encontrados em *C. roseus* (Moreno *et al.*, 1996).

1.4. Alcalóides indólicos monoterpénóides

O grupo dos alcalóides indólicos monoterpénóides é formado por uma variedade enorme de compostos, aproximadamente 3 000 segundo Facchini (2001). Deste grupo fazem parte os alcalóides anticancerígenos vincristina e vinblastina de *Catharanthus roseus*, bem como a catarantina, vindolina e anidrovinblastina, que foram estudados neste trabalho.

A maioria dos alcalóides indólicos monoterpénóides está restrita a quatro famílias de plantas: *LOGANIACEAE*, *RUBIACEAE*, *APOCYNACEAE* e *NYSSACEAE*, que pertencem à ordem das *Gentianales* (Memelink *et al.*, 2001).

Os alcalóides deste grupo contêm dois elementos estruturais: um núcleo indólico derivado do triptofano e uma unidade C₉ ou C₁₀ derivada da secologanina (figura 1.5).

A partir da strictosidina (figura 1.5) são sintetizados mais de cem alcalóides indólicos monoterpénóides detectados em *C. roseus*.

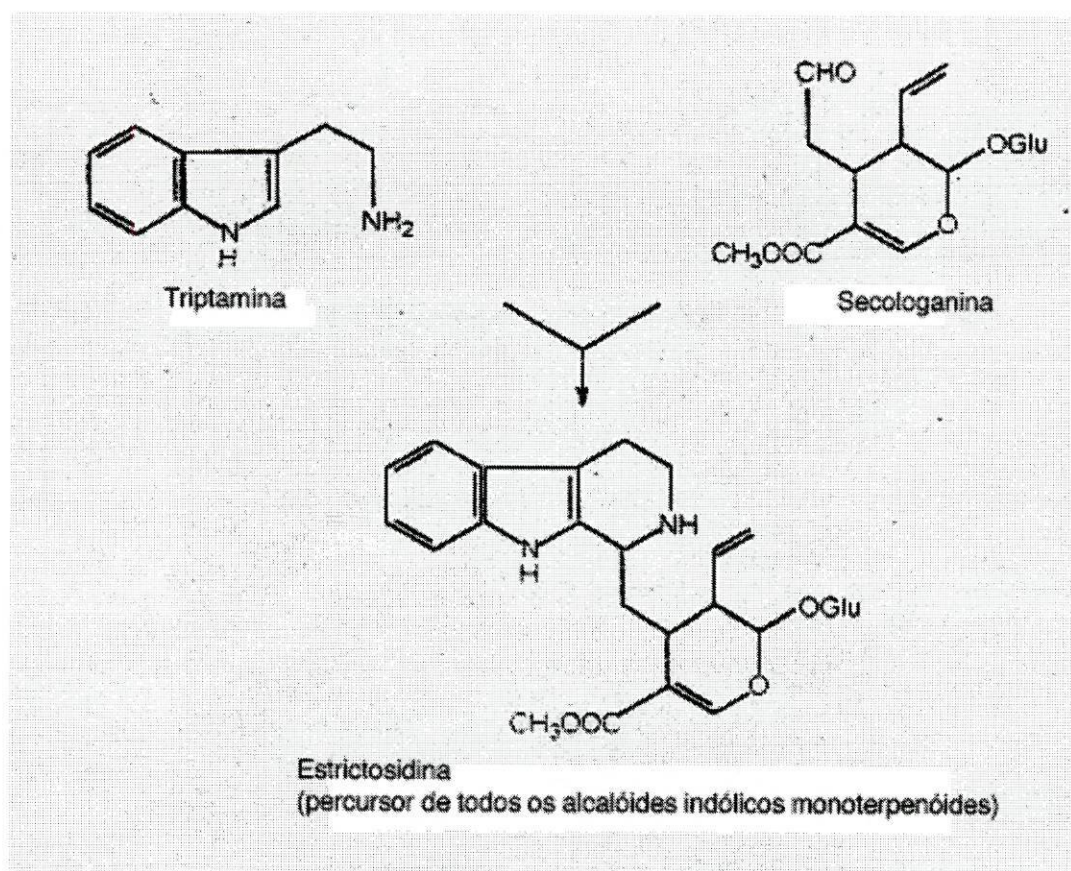


Figura 1.5. Origem da estrutura básica dos alcalóides indólicos monoterpénóides (adaptado de Sottomayor, 1998).

1.4.1. Biossíntese dos alcalóides indólicos monoterpénóides

Como já foi referido acima, todos os alcalóides indólicos monoterpénóides possuem uma metade indólica fornecida pela triptamina e uma porção terpenóide fornecida pela secologanina – um glicosídeo iridoide. O triptofano, derivado da via do chiquimato, é convertido em triptamina pela enzima triptofano descarboxilase (TDC), codificada por um só gene na espécie *Catharantus roseus* (Facchini, 2001).

A secologanina deriva do IPP (isopentenil pirofosfato = isopreno) através de uma via que ocorre no cloroplasto, sendo o IPP cloroplastideal produzido pela via de Rohmer

(gliceraldeído/piruvato) e não pela via do mevalonato, como acontece no citoplasma (Lichtenthaler *et al.*, 1997). Na interface entre o metabolismo primário e o secundário, o geranyl difosfato resultante da polimerização do IPP é convertido em geraniol pela enzima geraniol hidroxilase (fig. 1.6)

Esta enzima foi caracterizada como sendo uma citocromo P450 monooxigenase, uma vez que se liga à membrana, depende do NADPH e do O₂ e apresenta inibição reversível à luz pelo monóxido de carbono (Meijer *et al.*, 1993; Facchini, 2001). A enzima G10H é específica para a posição C₁₀ e exibe afinidade para o geraniol e o neurol, o isômero *cis* do geraniol.

A conversão da loganina em secologanina representa o último passo na sua via biossintética e é, também, catalizada por uma enzima citocromo P450.

A triptamina e a secologanina são condensadas pela enzima strictosidina sintase (STR) para formar strictosidina, o precursor comum na biossíntese dos alcalóides indólicos monoterpénóides.

A strictosidina é deglucosilada pela strictosidina β - D - glucosidase (SGD). Esta enzima é codificada por um só gene em *Catharanthus roseus* (Facchini, 2001). A strictosidina deglucosilada é convertida em 4,21 - dehydrogeissoschizina. A partir deste alcalóide são sintetizados por diferentes vias os alcalóides ajmalicina, catarantina e vindolina (figura 1.6).

A ajmalicina é o principal alcalóide da raiz de *C. roseus* (Arens *et al.*, 1978; Endo *et al.*, 1987) e é também um composto com importância farmacêutica pois é utilizado no tratamento da hipertensão. A catarantina e a vindolina são os principais alcalóides das folhas de *C. roseus*, juntamente com o produto da sua condensação - a α - 3, 4 anidrovinblastina (AVLB) (West Kemper *et al.*, 1980; Deus-Neumann *et al.*, 1987; Balsevich e Bishop, 1989).

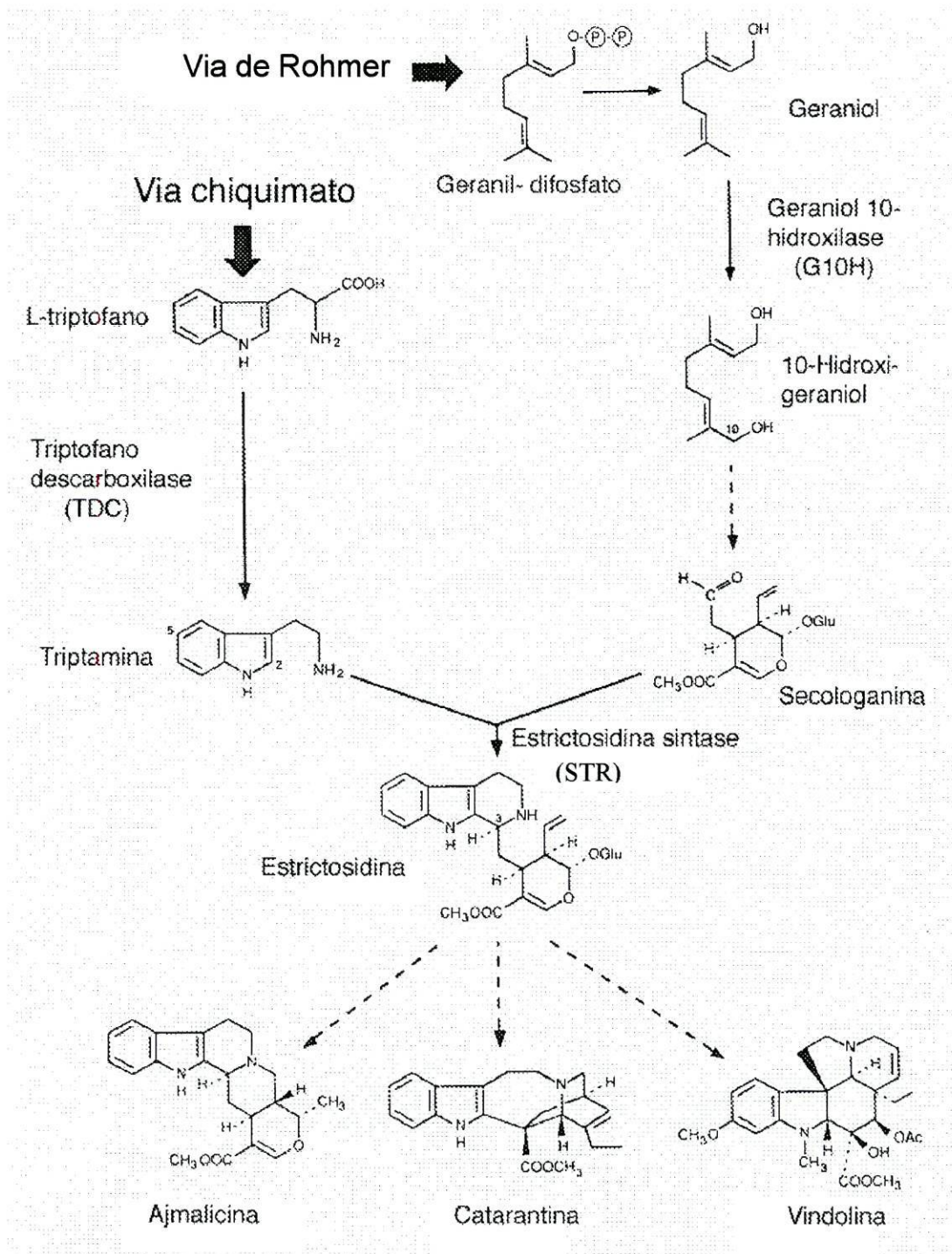


Figura 1.6. Biossíntese dos alcalóides indólicos terpenóides em *Catharanthus roseus* (adaptado de Meijer *et al.*, 1993).

Nenhuma das enzimas que levam à produção da catarantina a partir de 4,21 – dehidrogeissoschizina foi isolada mas as que catalisam os últimos passos na formação da vindolina a partir da tabersonina foram caracterizadas em detalhe (fig. 1.7).

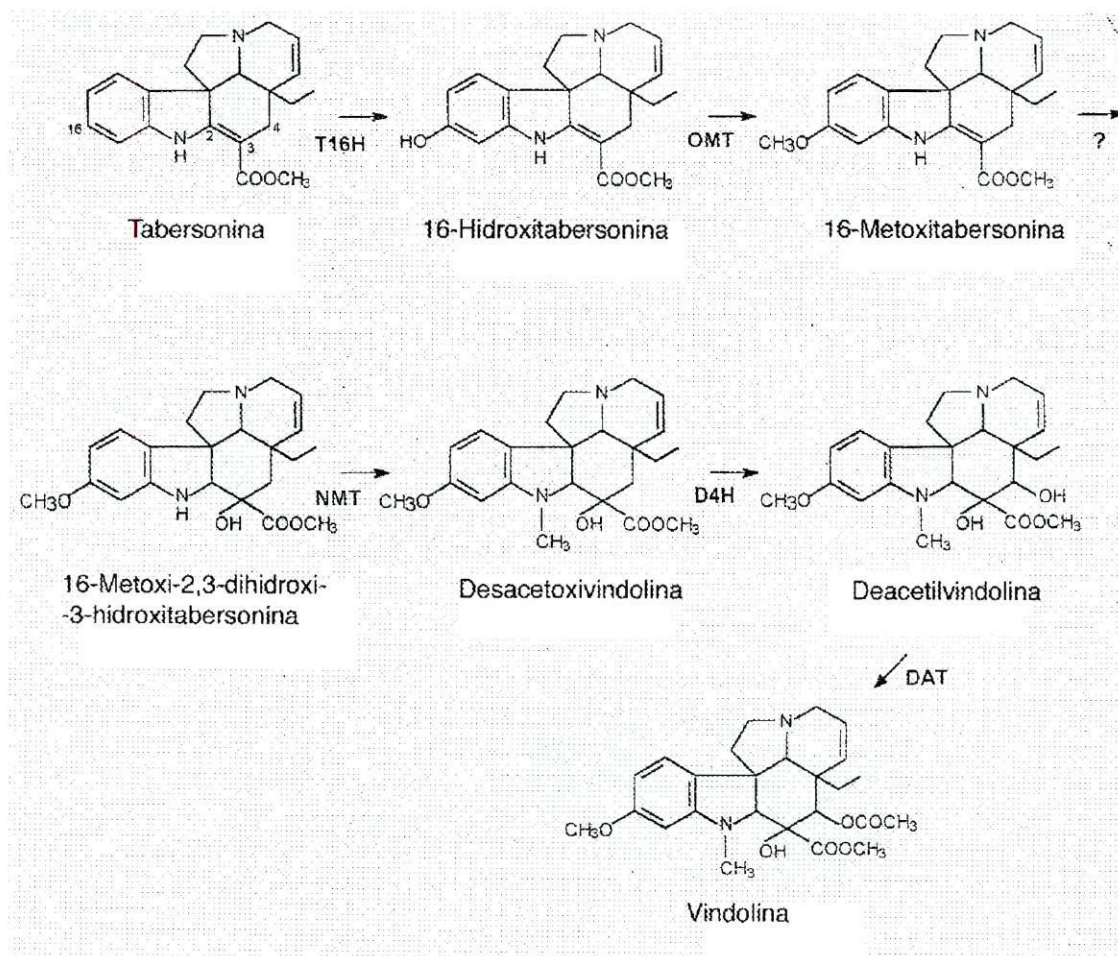


Figura 1.7. Biossíntese da vindolina a partir da tabersonina. (T16H – tabersonina 16-hidroxilase; OMT – S-adenosil –L-metionina: 16-hidroxitabersonina-16-O-metiltransferase; NMT – S-adenosil-L-metionina: 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metiltransferase; D4H – desacetoxivindolina 4-hidroxilase; DAT – acetilcoenzima A: 4-O-deacetilvindolina 4-O-acetiltransferase) (adaptado de Sottomayor, 1998).

O primeiro dos seis passos envolvidos na conversão da tabersonina em vindolina consiste na sua hidroxilação, na posição C₁₆, pela tabersonina 16 – hidroxilase (T16H). Segue-se a 16 – O – metilação, a hidratação da ligação 2,3 – dupla e a N – metilação do anel indólico de nitrogénio. O quinto passo na biossíntese da vindolina é catalisado por uma dioxigenase dependente do oxoglutarato, que hidroxila a posição C₄ da

desacetoxivindolina (D4H). O último passo na biossíntese da vindolina é catalisado pela acetilcoenzima A: deacetilvindolina 4 – O – acetiltransferase (DAT). (Facchini, 2001). A catarantina e a vindolina sofrem uma reacção de condensação dando origem ao alcalóide dimérico AVLB (figura 1.8) . A AVLB é o principal alcalóide dimérico presente nas folhas de *C. roseus* e é o precursor de todos os alcalóides diméricos desta planta, incluindo as drogas anticancerígenas vincristina e vinblastina (Baxter *et al.*, 1982; Memelink *et al.*, 2001; Sottomayor *et al.* 1998).

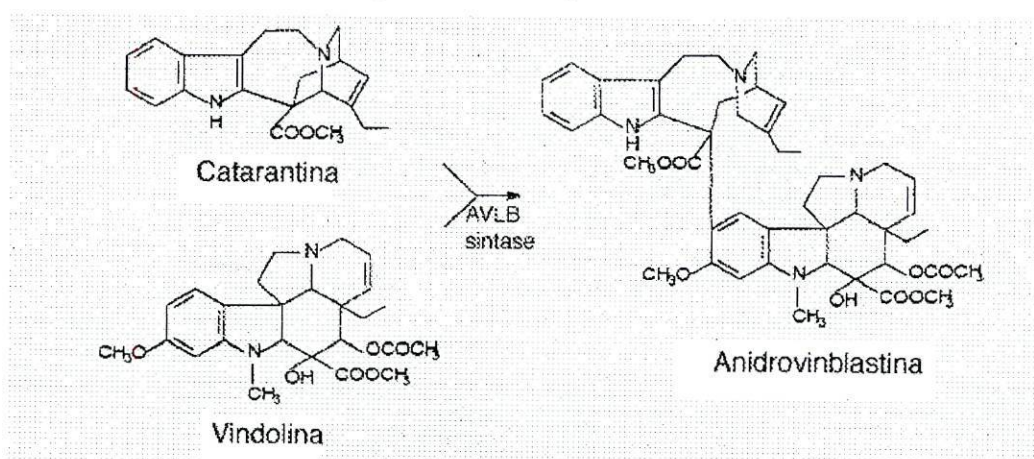


Figura 1.8. Ligação da vindolina com a catarantina para formar α -3',4'-anidovinblastina (adaptado de Sottomayor, 1998).

A reacção de dimerização parece ser catalisada por uma isoenzima básica de peroxidase – AVLB sintase (Sottomayor *et al.* 1996, 1998).

A via biossintética dos alcalóides monoterpénóides em *C. roseus* encontra-se também já parcialmente caracterizada a nível genético. Neste momento foram já clonados nove genes da via de biossíntese: citocromo p450 redutase, desacetoxivindolina 4-hidroxilase, acetil-coA:4-O-deacetilvindolina 4-Oacetiltransferase, geraniol 10-hidroxilase, strictosidina β -D-glucosidase, secologanina sintase, strictosidina sintase, triptofano descarboxilase e tabersonina 16-hidroxilase (Memelink *et al.*, 2001).

Foram também já isolados alguns genes reguladores desta via, os genes Orca (“octadecanoid-responsive *Catharanthus* AP2-domain proteins”) e genes de factores de transcrição “G box” (Memelink *et al.*, 2001; Gantet *et al.*, 2001).

1.5. Compartimentalização subcelular do metabolismo de alguns alcalóides indólicos

Muitas das enzimas que intervêm na biossíntese dos alcalóides ocorrem em vários compartimentos celulares além do citoplasma. A compartimentalização destas enzimas afasta os alcalóides tóxicos e os seus intermediários biossintéticos do citoplasma. O tráfego subcelular dos intermediários da via biossintética cria uma regulação metabólica que não poderia acontecer se as enzimas e substratos ocorressem livres no citoplasma (Facchini, 2001). A via biossintética de alcalóides indólicos monoterpénóides de *C. roseus* além de extensa e complexa desenvolve-se pelo menos em quatro compartimentos subcelulares diferentes e que são utilizados repetidas vezes ao longo da via. A figura 1.9 representa um modelo geral da compartimentalização da biossíntese dos alcalóides indólicos monoterpénóides em *Catharanthus roseus*.

A compartimentalização notável desta via denota bem o grau de regulação a que ela está sujeita, sugerindo também um papel importante para a planta. Os precursores primários dos alcalóides indólicos monoterpénóides, a triptamina e a secologanina, são derivados das vias do chiquimato e de Rhomer, respectivamente. A formação de monoterpénóides, entre os quais o geraniol, precursor da secologanina, está restrita aos cloroplastos. A via do chiquimato e, portanto, a biossíntese do triptofano, precursor da triptamina, está também localizada nos cloroplastos ou plastídeos (Sottomayor, 1998; Meijer *et al.*, 1993).

A conversão do triptofano em triptamina, pela TDC, ocorre no citoplasma (De Luca, *et al.*, 1987). Uma vez que a biossíntese de STR ocorre no vacúolo, a triptamina tem de ser transportada através do tonoplasto antes de se dar a ligação com a secologanina. A G10H, interveniente na biossíntese da secologanina, parece estar associada ao RER. A localização da biossíntese da strictosidina no vacúolo poderá estar associada ao facto de este composto possivelmente ser tóxico pois parece ter funções de defesa (Luijendijk *et al.*, 1996).

A SGD, enzima que cataliza a deglucosilação da strictosidina, pensou-se inicialmente estar ligada à face externa do tonoplasto, pelo menos parcialmente (Stevens *et al.*, 1993). No entanto, estudos de localização *in vivo*, mostraram que a SGD está associada ao retículo endoplasmático (Geerlins, *et al.*, 2000). A enzima T16H, envolvida na hidroxilação C₁₆ da tabersonina, também está associada ao retículo endoplasmático (St-Pierre, *et al.*, 1995). A NMT, que catalisa o terceiro passo da biossíntese da vindolina está associada à membrana dos tilacóides e os dois últimos passos que levam à formação da vindolina, catalisados pelas enzimas D4H e DAT, ocorrem no citoplasma (De Luca, *et al.*, 1987). A vindolina volta depois ao vacúolo, onde está localizada a peroxidase básica (AVLB sintase) que catalisa a sua ligação com a catarantina, para formar α - 3', 4'-anidrovinlastina (Sottomayor *et al.*, 1996, 1998).

As enzimas que catalisam a conversão da strictosidina deglucosilada em catarantina e em tabersonina ainda não foram isoladas nem localizadas, pelo que o modelo representado na figura 1.9 não espelha ainda toda a complexidade desta via.

1.6. Função dos alcalóides nas plantas

Um dos componentes essenciais da evolução das plantas superiores tem sido o desenvolvimento de uma capacidade de sobreviver a enormes desafios, quer do meio ambiente, quer impostos por outros organismos. Até dentro de uma mesma comunidade de plantas há uma competição constante pelos recursos disponíveis, quer eles sejam alimento, água, minerais ou vectores de polinização. As plantas têm de enfrentar estes desafios sem se moverem do local onde estão a crescer e a chave do seu sucesso está associada à evolução de uma grande versatilidade química (Ellis, 1998).

De facto, as plantas constituem o maior grupo de organismos fotoautotróficos à face da Terra estando, por isso, na base das cadeias alimentares, ou seja, representam a fonte principal de alimentos de animais e microorganismos. A sobrevivência das plantas depende, portanto, da evolução de estratégias de defesa contra animais herbívoros, microorganismos e vírus (Wink, 1998). As estratégias adoptadas vão desde crescimento contínuo até defesas mecânicas (casca grossa, espinhos) e, especialmente, a produção de

uma grande quantidade e variedade de compostos secundários potencialmente tóxicos que servem de defesa contra microorganismos, plantas competidoras e/ou herbívoros. No cômputo geral, acredita-se hoje que as defesas químicas das plantas possuem um papel determinante na sua capacidade de sobrevivência.

Os alcalóides, até há bem pouco tempo, não eram considerados vitais para o organismo que os produzia. Na verdade, foram mesmo considerados “lixo metabólico” e o facto de se acumularem na planta era relacionado com a falta de um sistema excretor eficiente. Mas, segundo Waller e Nowacki (1978), as plantas apresentam um sistema excretor eficiente e pouco reconhecido – as folhas em senescência. Antes de se dar a abscisão de uma folha, todos os metabolitos que possam ser necessários são translocados e apenas os verdadeiros desperdícios permanecem na folha. Se os alcalóides fossem desperdícios concentrar-se-iam nas folhas em senescência ou seriam convertidos noutros produtos, o que não se verifica. A questão da importância vital dos alcalóides coloca-se porque apenas algumas plantas os produzem. Ainda hoje, a função química destes compostos não está totalmente esclarecida mas pensa-se que estarão, de facto, relacionados com diferentes aspectos de defesa por parte da planta que os produz.

Já em 1887, Errera defendeu a hipótese de que os alcalóides teriam a função de proteger as plantas dos herbívoros e microorganismos patogénicos.

Os níveis de alcalóides nas plantas variam consoante o órgão e o desenvolvimento, podendo mesmo apresentar flutuações diurnas o que pode estar associado ao seu papel de defesa (Waller e Nowacki, 1978). Por exemplo, os níveis de alcalóides são com frequência mais elevados nas folhas jovens, com menores defesas mecânicas – é precisamente este o caso em *C. roseus* (Westekemper *et al.*, 1980; Deus-Neumann *et al.*, 1987; Frischknecht *et al.*, 1987). Os níveis de alcalóides são também particularmente elevados durante a floração e formação de sementes, uma etapa crucial para a dispersão das plantas (Wink, 1998). É significativo, também, o facto de espécies espinhosas, que investem na formação de defesas mecânicas acumularem menos alcalóides do que espécies aparentadas sem espinhos (Wink, 1998).

Particularmente relevantes para o estudo da função de defesa dos alcalóides nas plantas, foram os trabalhos de cruzamento efectuados na Alemanha em que foram

seleccionadas variedades de lupinos sem alcalóides quinolizidinicos – os lupinos doces – por oposição aos lupinos com alcalóides que conferem um sabor amargo. Os estudos feitos com estas duas variedades demonstraram um efeito drástico dos alcalóides no comportamento de herbívoros (Wink, 1998). Coelhos e lebres, na presença das duas variedades alimentavam-se exclusivamente da variedade doce, tendo-se observado o mesmo com várias espécies de insectos. Numa experiência de campo, na Polónia, com uma população mista de lupinos doces e amargos, a variedade doce foi atacada por um afídeo e desapareceu ao fim de poucas gerações. Foi observado ainda que as variedades doces apresentavam maior incidência de doenças provocadas por bactérias, fungos e vírus.

A produção de alcalóides por parte das plantas tem, também, sido relacionada com a resposta a situações de stress, nomeadamente hídrico e mecânico. Removendo 40% do ápice radicular em *Nicotiana astirres*, há um aumento para o quádruplo do total de alcalóides produzidos, oito dias após essa remoção (Baldwin, 1991). Em *Atropa acuminata* repetidos danos artificiais resultam numa indução máxima de alcalóides, após 22 dias (Bashir-Kahn e Harborne, 1990).

Waller e Nowacki (1978) referem que os alcalóides podem desempenhar na planta o papel de reguladores de crescimento, devido à semelhança de estruturas entre estes dois compostos.

A colquicina é um alcalóide bastante conhecido por inibir a divisão celular. Mesmo em pequenas quantidades, este alcalóide interfere com a formação do fuso mitótico e, em vez de haver formação de duas células-filhas, forma-se uma célula com o dobro dos cromossomas. Alguns alcalóides, quando adicionados à água na qual estão embebidas sementes, inibem a germinação. Este tipo de efeitos alelopáticos são muito comuns e causados também por outros produtos do metabolismo secundário. Os alcalóides podem evitar a germinação de sementes de outras espécies, preservando assim o espaço para a sua espécie.

Foi ainda levantada a hipótese de alguns alcalóides também fornecem protecção contra as radiações ultravioleta (Meijer *et al.*, 1993; Ellis, 1998).

A função de alcalóides indólicos monoterpénóides em *C. roseus* tem sido abordada nalguns trabalhos, que apresentam resultados indicando um papel de defesa. Frischknecht *et al.* (1987) observou um efeito moluscicidal dos alcalóides de *C. roseus* em experiências de campo e detectou um nível máximo de alcalóides nos ápices caulinares. Esse nível ia decrescendo em pares de folhas consecutivos o que pode corresponder à existência de uma maior defesa química nos tecidos mais jovens e tenros, onde as defesas mecânicas são menos eficientes. Linhas tetraplóides de *C. roseus* apresentando valores mais elevados de alcalóides em relação às linhas diplóides que serviam de controlo, mostraram-se significativamente mais resistentes ao fungo *Pythium aphanidermatum* (Kulkarni e Ravindra, 1988). Segundo Chandravadana *et al.* (1994) extractos foliares de *C. roseus* inibem a eclosão de ovos do nemátode *Meloidogyne incognita* e folhas secas misturadas com o solo reduzem a infestação de raízes por nemátodes. Thomas *et al.* (1995) observaram que plantas de tabaco transgénicas, transportando o gene de *C. roseus* para a enzima triptofano descarboxilase, que converte o triptofano em triptamina (secção 1.3), acumulavam triptamina e que a reprodução de *Bemisia tabaci* (mosca da batata doce) decresceu até 97% relativamente aos controlos. Luijendijk *et al.* (1996) mostraram que a strictosidina, o precursor de todos os alcalóides indólicos monoterpénóides, é activa contra vários microorganismos. Os herbívoros generalistas como as larvas de *Spodoptera* evitam as folhas de *C. roseus* e, se deixadas sem alternativa de alimento, não são capazes de sobreviver em *C. roseus*, devido às baixas taxas de ingestão e inibição das enzimas digestivas pelos alcalóides indólicos (Meisner *et al.*, 1981; Chockalingam *et al.*, 1989; Luijendijk *et al.*, 1996).

1.7. Objectivo

A função dos metabolitos secundários nas plantas que os acumulam não está ainda muito bem estabelecida, embora se pense que possuem funções de defesa contra agressões essencialmente bióticas.

No caso de *C. roseus*, embora haja vários trabalhos que indiciam uma função de defesa antimicrobiana e/ou anti-herbivorismo para os alcalóides indólicos

monoterpenóides que esta espécie acumula, não foi nunca abordada directamente a possível função dos principais alcalóides que se acumulam nas folhas: catarantina, vindolina e AVLB.

Assim, o objectivo deste trabalho consiste na investigação da possível função de defesa dos alcalóides catarantina, vindolina e AVLB nas folhas de *Catharanthus roseus*. Com este fim, foram estimadas as concentrações de acumulação destes alcalóides nas folhas e foi investigada a sua influência no crescimento de vários fungos, uma espécie protista e bactérias e a sua influência na alimentação de um herbívoro generalista.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico e condições de crescimento

Foram utilizadas plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (CV. Little Brighth eyes) com 16 semanas. As plantas encontravam-se a crescer numa estufa com fotoperíodo de 11 horas de luz e 13 horas de obscuridade, à temperatura ambiente. Foram recolhidas separadamente as duas folhas de cada par, pesadas e congeladas em azoto líquido e preservadas a -80°C .

Foram utilizadas duas espécies de fungos e uma protista cedidas pela micoteca do Departamento de Botânica (FCUP), *Rhizopus sexualis* (estirpe 121), *Mucor racemosus* (estirpe 24) e *Pythium splendens* (estirpe 107), respectivamente, e uma estirpe de *Botrytis* sp. isolada das folhas de *C. roseus* (secção 2.3.)

Foram colocados inóculos de fungos e de protista em placas de Petri com meio PDA (Potato Dextrose Agar - DIFCO) e deixados a crescer à temperatura ambiente. Foi feita uma repicagem de três em três dias.

Foram utilizadas duas espécies de bactérias cedidas pela colecção do Departamento de Botânica (FCUP): *Erwinia coratovora* (estirpe 80) e *Pseudomonas fluorescens* (estirpe 81). Foram inoculadas em placas de Petri com meio NA (Nutrient Agar - DIFCO) e colocadas em posição invertida a 25°C . Foi feita repicagem de dois em dois dias.

Foram utilizados caracóis da espécie *Helix aspersa* L. recolhidos no Jardim Botânico, com tamanho semelhante.

2.2. Extracção e análise de alcalóides

Cada folha de *Catharanthus roseus* foi homogeneizada separadamente num almofariz com metanol e areia de quartzo. Em seguida, este homogeneizado foi filtrado em papel de filtro para tubo de centrifuga e levado à secura com N_2 gasoso. Ressuspendeu-se o sedimento com 2 ml de H_2SO_4 a 2% e agitou-se no vortex. Foram adicionados 2 ml de acetato de etilo, agitou-se a mistura no vortex centrifugou-se a 1500 rpm, durante dois

minutos e a fase orgânica foi desprezada. Foi repetida mais uma vez a extração com acetato de etilo. Adicionaram-se, em seguida 300 µl de amoníaco à fase aquosa e agitou-se no vortex. Foram feitas novamente duas extrações com acetato de etilo, recolhendo-se, desta vez, a fase orgânica. A fase orgânica foi levada à secura com N₂ gasoso. O sedimento foi ressuscitado em 0,5 ml de metanol para HPLC, filtrado e injectado no HPLC.

A análise por HPLC foi feita utilizando uma coluna analítica RP-C18 (250 x 4,6 mm), utilizando uma mistura metanol-água contendo trietilamina 0,1% (v/v), com um fluxo de 1 mL min⁻¹, e com o seguinte gradiente: 0 minutos – metanol 55% (v/v), 5 minutos – metanol 65% (v/v), 15 minutos – metanol 70% (v/v), 18 minutos – metanol 80% (v/v), 35 minutos – metanol 90% (v/v), 40 minutos – metanol 55% (v/v). Os alcalóides foram detectados aos 254 nm, 260 nm e 280 nm.

As concentrações foram calculadas a partir de rectas de calibração obtidas com padrões puros de catarantina, vindolina (Richter Gedeon – Budapest, Hungria) e AVLB (Pierre Fabre – Toulouse, França).

2.3. Isolamento de um fungo de plantas de *C. roseus* infectadas

Foram cortados pequenos fragmentos de várias folhas de *C. roseus* infectadas que foram lavados com água destilada estéril, e colocados em diferentes placas de Petri com meio PDA (Potato Dextrose Agar – DIFCO). As placas foram colocadas à temperatura ambiente e o micélio desenvolvido foi estudado por observação directa e observação ao microscópio óptico de contraste de fase.

2.4. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de três espécies de fungos e uma protista

Os fungos, tal como a espécie protista, foram inoculados no centro de placas de Petri e quando o micélio atingia uma área que ocupava cerca de metade da placa, foram recolhidos cilindros de meio com micélio, a uma distância equidistante do centro da placa, utilizando um tubo de vidro oco, com 0.4 mm de diâmetro obtendo-se assim 10

cilindros de material biológico por placa que, posteriormente, foram inseridos em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio CzapeK, com diferentes concentrações de alcalóides adicionados em solução metanólica após esterilização do meio. Os tubos com os fungos foram mantidos à temperatura ambiente e o crescimento do micélio foi registado de 24 em 24 horas.

O meio CzapeK era preparado misturando-se 2,0 g de NaNO_3 ; 1,0 g de K_2HPO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de KCL; 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 30 g de sacarose, para 1 litro de meio, acertando-se, em seguida, o pH para, aproximadamente 4,5.

2.5. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de duas espécies de bactérias

Foram utilizadas culturas de bactérias com 24 horas de crescimento em placa de Petri. Foi feita a ressuspensão do inóculo de bactéria em água destilada estéril até obter uma absorvância para $\lambda = 600 \text{ nm}$ igual a 0,5. Foram então adicionados 28 μl de suspensão de *Erwinia carotovora* ou 56 μl de suspensão de *Pseudomonas fluorescens* a tubos de ensaio com 7 ml de meio NB (Nutrient Broth – DIFCO) com diferentes concentrações de alcalóides, em solução metanólica, após esterilização do meio. O crescimento bacteriano foi seguido por leitura da absorvância a 600 nm.

2.6. Estudo da actividade dissuasiva de herbivorismo dos alcalóides

Os caracóis foram colocados em caixas (um caracol em cada caixa) de 10 x 10 cm, com 7 cm de altura (fig.2.1).

Cada caixa tinha dois orifícios com 3 mm de diâmetro. Em cada caixa foram colocados dois quadrados de *Plantago sp.*, com 2,25 cm^2 de área e foi feita uma pulverização de toda a caixa com água. Durante três dias consecutivos foram seleccionados e realimentados os caracóis que esgotaram todo o alimento. A seguir, as caixas foram limpas e voltaram-se a adicionar dois quadrados de *Plantago sp.* com a mesma área e a pulverizar com água.



Fig. 2.1 Fotografia de uma caixa utilizada durante a experiência com caracóis.

Cinco dias depois limpam-se as caixas, pulverizam-se com água e colocam-se em cada uma dois quadrados de *Plantago* sp. com 4 cm² de área (cerca de 0,15 g), previamente tratadas com 8 µl de metanol ou solução metanólica 10⁻² M dos diferentes alcalóides.

Após 24 horas, a área das folhas foi medida num planímetro.

3. RESULTADOS

A espécie *Catharanthus roseus* é conhecida por acumular grande quantidade de alcalóides nas suas folhas. Os que se encontram em maior concentração são os alcalóides indólicos monoterpénóides catarantina, vindolina e AVL B. No sentido de averiguar quais serão as funções destes alcalóides foram realizadas várias experiências com fungos, bactérias e caracóis. Foi também realizada uma experiência para determinar a concentração fisiológica destes alcalóides indólicos monoterpénóides nas folhas de *C. roseus* e averiguar a variação dessa concentração com a idade das folhas, para poder tirar conclusões sobre os estudos feitos *in vitro*.

As experiências realizadas com fungos, bactérias e uma espécie protista tiveram o propósito de averiguar se estes alcalóides teriam alguma influência na taxa de crescimento destes seres vivos. Foram utilizadas três espécies fungos – *Botrytis sp.*, *Rhizopus sexualis* e *Mucor racemosus*; uma espécie protista – *Pythium splendens*, e duas espécies de bactérias – *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas fluorescens*. Nos dois tipos de experiências colocaram-se estes seres vivos a crescer em diferentes concentrações de alcalóides e, em seguida, avaliou-se o seu crescimento, ao longo de vários dias, no caso dos fungos, ou várias horas, no caso das bactérias.

No sentido de determinar a actividade anti-herbivorismo destes alcalóides foi estudada a sua influência na escolha de alimento por parte de caracóis. Durante esta experiência foram fornecidas aos caracóis, colocados em caixas individuais, folhas com diferentes concentrações de alcalóides, após um período de jejum de cinco dias. Um dia depois foi determinada a área comida de cada folha, relacionando-se esta com a preferência manifestada pelos caracóis na escolha de alimento.

3.1. Determinação da concentração de vindolina, catarantina e AVL B em folhas de *C. roseus*

Estudos realizados anteriormente mostraram que os principais alcalóides indólicos monoterpénóides presentes nas folhas de *C. roseus* são a catarantina, a vindolina e a AVL B, representando cerca de 80% dos alcalóides totais (Sottomayor *et al.*, 1998). Para

estudar a possível função de defesa destes alcalóides era necessário estimar qual a sua concentração *in vivo* para poder tirar conclusões a partir dos estudos feitos *in vitro*. Estudos feitos sobre a acumulação de alcalóides em *C. roseus* mostraram que a sua concentração varia com o estado de desenvolvimento das folhas (Naaranlahti *et al.*, 1991; Balsevich e Bishop, 1989). No entanto, nestes estudos, a concentração dos alcalóides é calculada por grama de peso fresco ou peso seco, não constituindo, portanto, um bom valor de referência.

Neste trabalho foi efectuada a extracção e quantificação por HPLC dos principais alcalóides presentes nos diferentes pares de folhas de uma planta de *C. roseus* com 16 semanas (figura 3.1; tabela 3.1).



Figura 3.1. Planta de *C. roseus* com 16 semanas.

Com o objectivo de estimar a concentração dos alcalóides no suco vacuolar foi calculado o peso seco de vários grupos de folhas, tendo-se determinado um teor médio de água igual a 80% (o valor da concentração vacuolar foi estimado considerando o volume do suco vacuolar igual ao volume total de água presente na folhas, ou seja 80% do peso fresco). Este é um valor sobre-estimado uma vez que uma pequena porção da água deverá

corresponder ao citoplasma. Isto significa que os valores representados na tabela 3.1 deverão estar ligeiramente subestimados. Observou-se que a catarantina e a vindolina apresentam concentrações máximas no segundo par de folhas, diminuindo depois esta concentração nas folhas mais velhas. Estes alcalóides atingem concentrações bastante elevadas, acima de 1 mM. A AVLB está normalmente presente em concentrações mais baixas, não ultrapassando os 0,74 mM, e a sua distribuição é contrária à dos outros dois alcalóides, aumentando com a idade da folha.

Tabela 3.1 – Concentração dos principais alcalóides indólicos monoterpénóides presentes em folhas de *C. roseus* com diferentes graus de desenvolvimento.

	Catarantina (mM*)	Vindolina (mM*)	AVLB (mM*)	Total (mM*)
2º par	5,08	2,77	0,36	8,21
3º par	2,50	1,53	0,64	4,67
4º par	1,99	1,05	0,74	3,78
5º par	1,18	0,73	0,68	2,59

* Concentração estimada do suco vacuolar

3.2. Isolamento de um fungo de plantas de *C. roseus* infectadas

Algumas das plantas de *C. roseus* mantidas no laboratório apresentavam sinais de crescimento fúngico na superfície das suas folhas (fig. 3.2.), pelo que foi decidido tentar isolar o fungo para estudar a sua sensibilidade aos alcalóides de *C. roseus*.

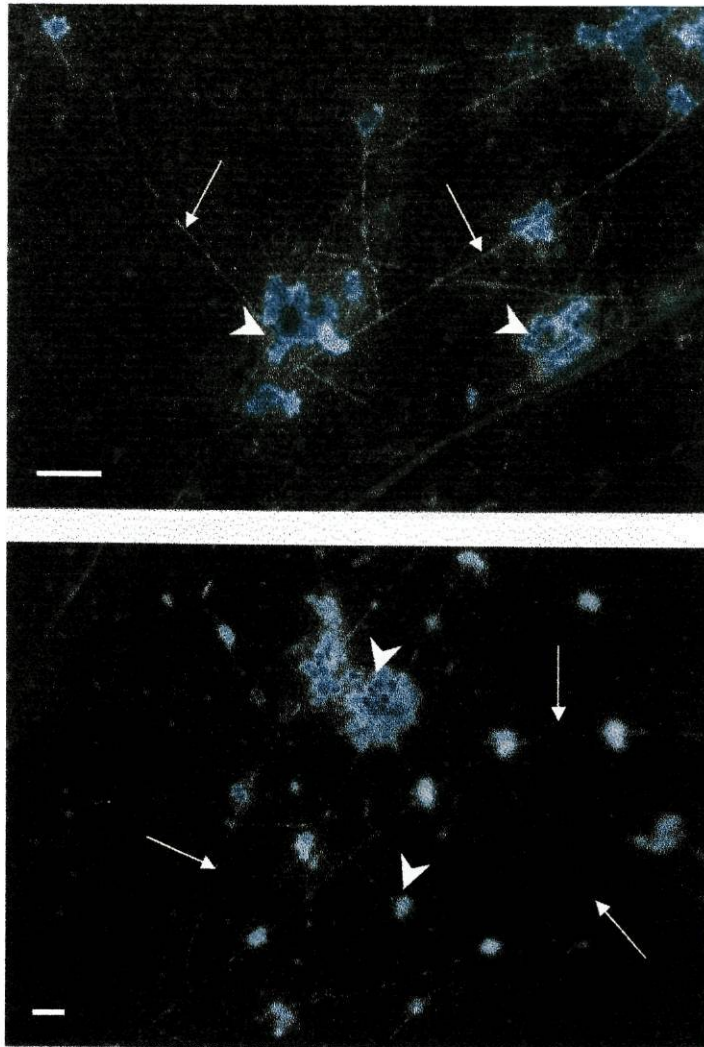


Figura 3.2. Imagem de microscopia de fluorescência da face superior de uma folha de *C. roseus* infectada. Hifas fúngicas e lesões apresentam fluorescência azul e as células apresentam fluorescência avermelhada devido à clorofila. Setas – hifas fúngicas; cabeças de seta - lesões nas células da folha nos locais de penetração das hifas. Filtro de excitação = 340 a 380 nm. Barra = 50 μ m.

Foram cortados pequenos fragmentos de várias folhas de *C. roseus* infectadas que foram lavados com água destilada estéril e colocados em diferentes placas de Petri com meio PDA. Após três ou quatro dias observou-se em todas as placas o crescimento de uma colônia com micélio aéreo abundante, erguido do substrato, com cor cinzento claro, apresentando na margem um anel mais escuro com tom acastanhado, como resultado da esporulação. A observação ao microscópio óptico (figura 3.3) permitiu identificar conidióforos típicos do género *Botrytis*.



Figura 3.3. Fungo isolado a partir de folhas de *C. roseus* e identificado como pertencente ao género *Botrytis*. Setas – conidióforos típicos do género *Botrytis*.

3.3. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de três espécies de fungos e uma espécie protista

A influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides catarantina, vindolina e AVLB no crescimento de seres vivos patogénicos foi estudada para os fungos *Botrytis sp.*, *Rhizopus sexualis*, *Mucor racemosus* e para o protista *Pythium splendens*.

Pythium splendens é um protista oomiceto e devido à sua forma filamentosa foi, no passado, classificado como fungo, uma vez que os seus filamentos se assemelham a hifas fúngicas (Raven et al., 1999). Estes organismos habitam no solo e encontram-se espalhados por todo o mundo, atacando uma enorme variedade de culturas com interesse económico.

Os fungos *Rhizopus sexualis* e *Mucor racemosus* são zigomicetos pertencentes à ordem *Mucorales*. As espécies desta ordem apresentam um micélio bem desenvolvido e muitos destes organismos são sapróbios que ocorrem em excrementos, solo, húmus e outros detritos orgânicos. A espécie *Mucor racemosus*, em particular, acumula-se nas raízes de uma grande variedade de frutos e vegetais (Alexopoulos et al., 1996).

Os fungos do género *Botrytis* são deuteromicetos, grupo que inclui um grande número de espécies patogénicas de plantas.

Na escolha dos microorganismos em estudo tentou-se abarcar diferentes grupos sistemáticos e estudar microorganismos patogénicos para as plantas e outros que não provocam doenças.

Na figura 3.4. pode-se observar que existe uma clara inibição do crescimento de *P. splendens* na presença de vindolina 1mM ao fim de 4 dias, observando-se o efeito inibitório a partir do segundo dia. Pode observar-se já algum efeito inibitório para as concentrações 0,01 e 0,1 mM.

Quando o protista *P. splendens* cresce em diferentes concentrações do alcalóide catarantina, não se observa uma influência evidente no crescimento como quando cresce em meio com vindolina (figura 3.5.). Os resultados para as três primeiras experiências são um pouco discrepantes o que é, provavelmente, resultado de a catarantina não influenciar o crescimento.

A AVLB parece inibir o crescimento de *P. splendens* (figura 3.6.) sendo a concentração 0.1 mM mais inibitória do que a concentração 1 mM. Este resultado é difícil de explicar, mas é consistente entre as duas experiências efectuadas.

Quando se estudou o efeito da vindolina sobre *R. sexualis* (figura 3.7.) observou-se normalmente um efeito inibitório do crescimento inicial do fungo, que foi parcial ou totalmente ultrapassado ao fim de 5 dias. A concentração 0,01 mM é já ligeiramente inibitória, acentuando-se o efeito para concentrações mais elevadas.

Os resultados obtidos na presença de catarantina para *R. sexualis* (figura 3.8.) foram, mais uma vez, um pouco discrepantes, não parecendo haver qualquer efeito visível. Já a AVLB (figura 3.9.) inibiu significativamente o crescimento deste fungo, especialmente para a concentração 1 mM em que o micélio praticamente não cresceu. A concentração 0,01 mM apresenta já efeito inibitório.

O outro zigomiceto estudado, *Mucor racemosus*, apresenta um comportamento semelhante a *R. sexualis* frente à vindolina (figura 3.10.), ou seja, foi observado um efeito inibitório no crescimento inicial que foi ultrapassado ao fim de 3 ou 4 dias. Já a catarantina parece, neste caso, possuir algum efeito inibitório, como pode observar-se nas figuras 3.11 B e C.

Foi estudada ainda a influência da vindolina, catarantina e AVLB num fungo isolado a partir de folhas de *C. roseus* – *Botrytis sp.* e, portanto, capaz de colonizar esta planta. Os resultados obtidos mostram um efeito inibitório da vindolina (figura 3.12), um possível efeito inibitório da catarantina (figura 3.13) e, também, algum efeito inibitório por parte da AVLB (figura 3.14.)

No geral, pelo menos dois dos três alcalóides estudados foram capazes de inibir ou atrasar o crescimento dos fungos e protista estudados. Nenhum deles apresentou actividade fungicida nas concentrações testadas – máx. conc. = 1 mM.

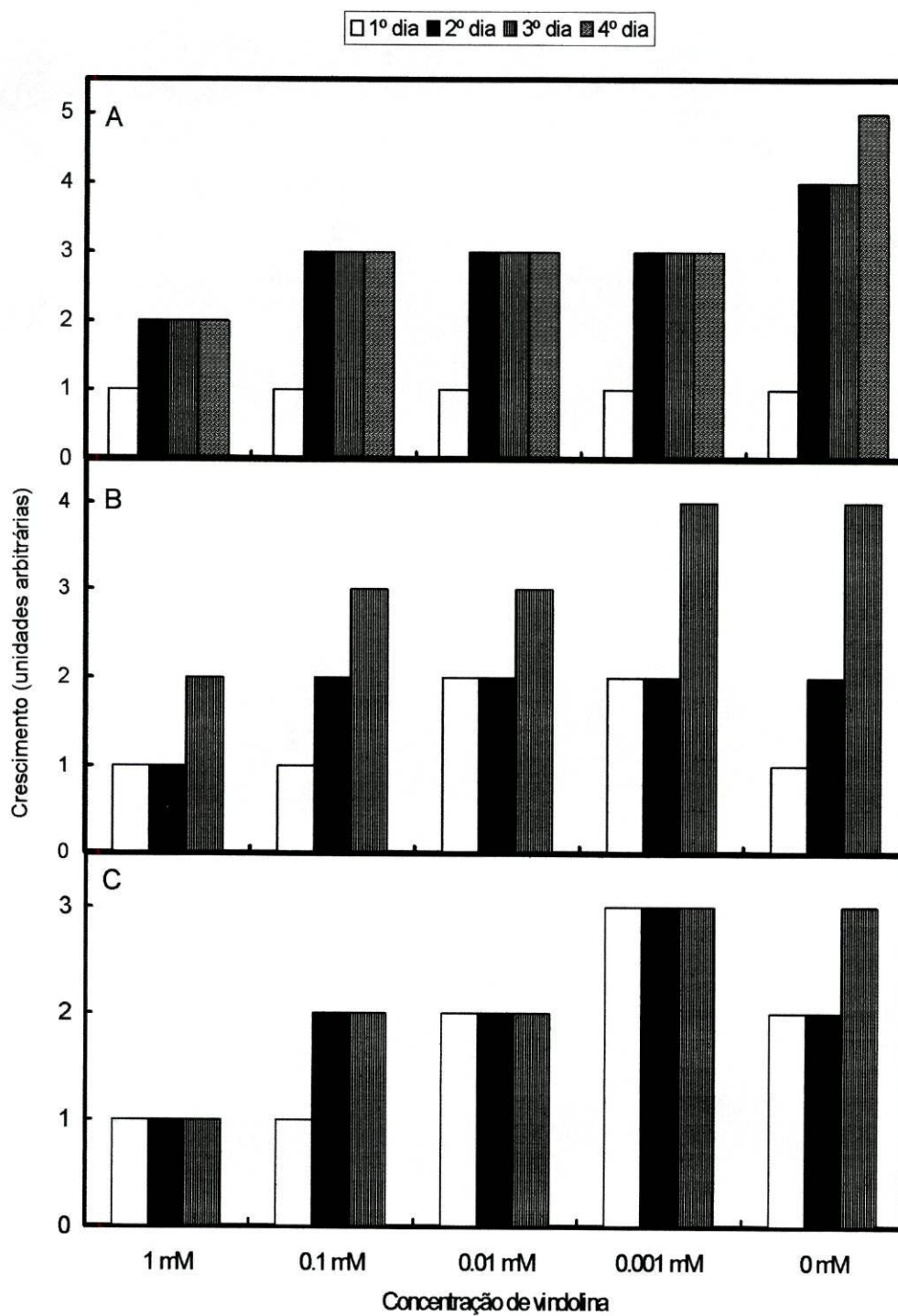


Figura 3.4. Crescimento do protista *Pythium splendens* na presença de diferentes concentrações de vindolina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio.

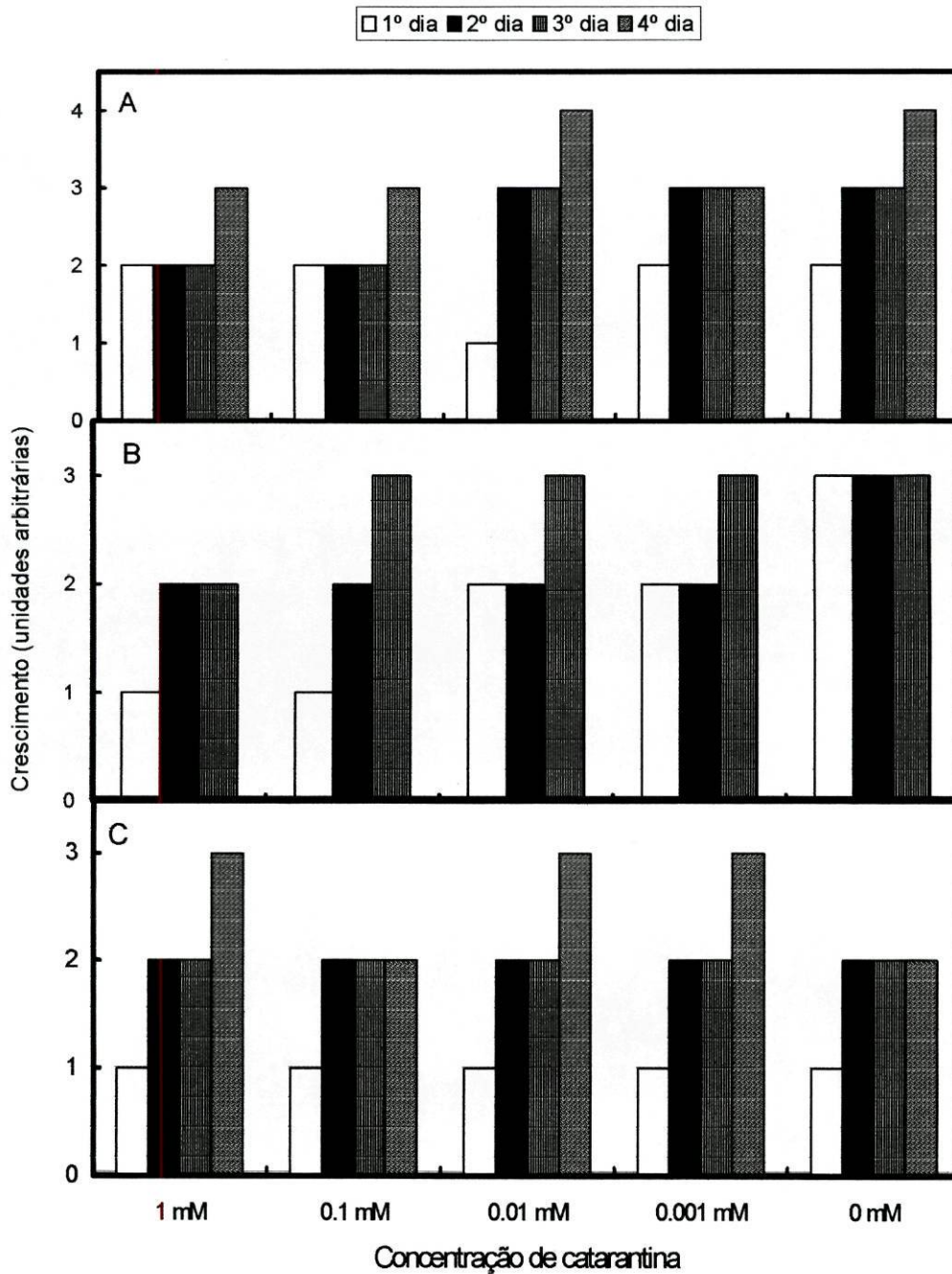


Figura 3.5. Crescimento do protista *Pythium splendens* na presença de diferentes concentrações de catarantina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio.

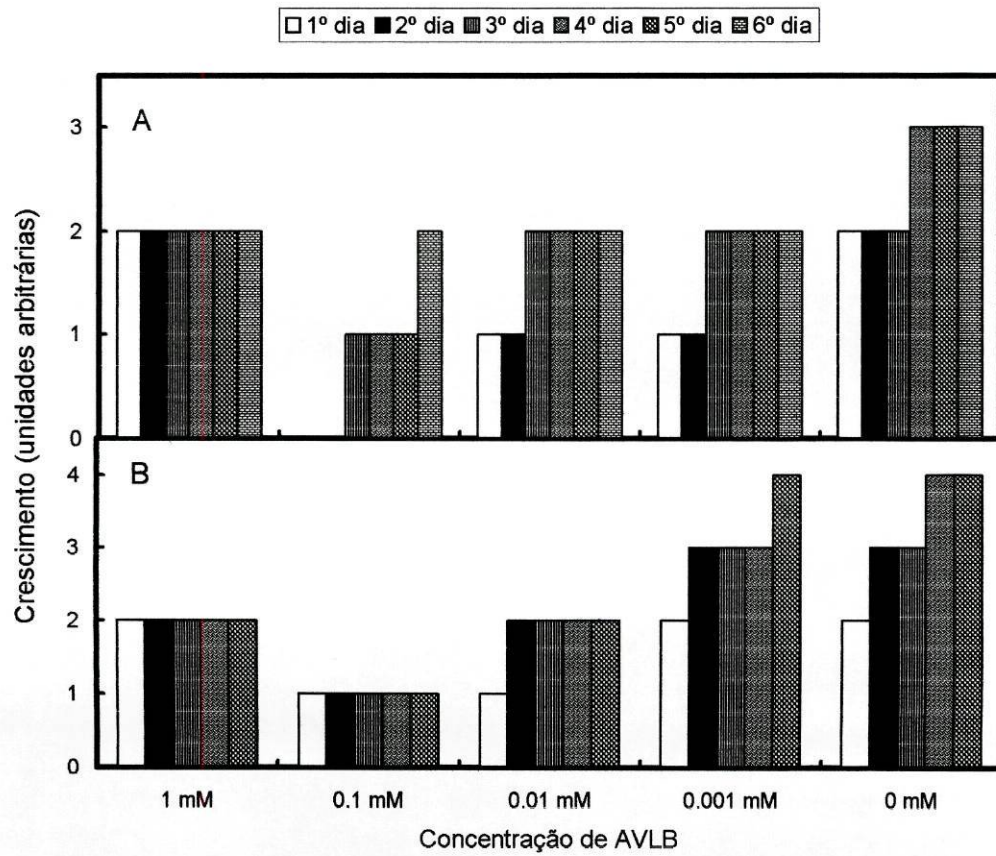


Figura 3.6. Crescimento do protista *Pythium splendens* na presença de diferentes concentrações de AVL B em duas experiências independentes (A, B). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio.

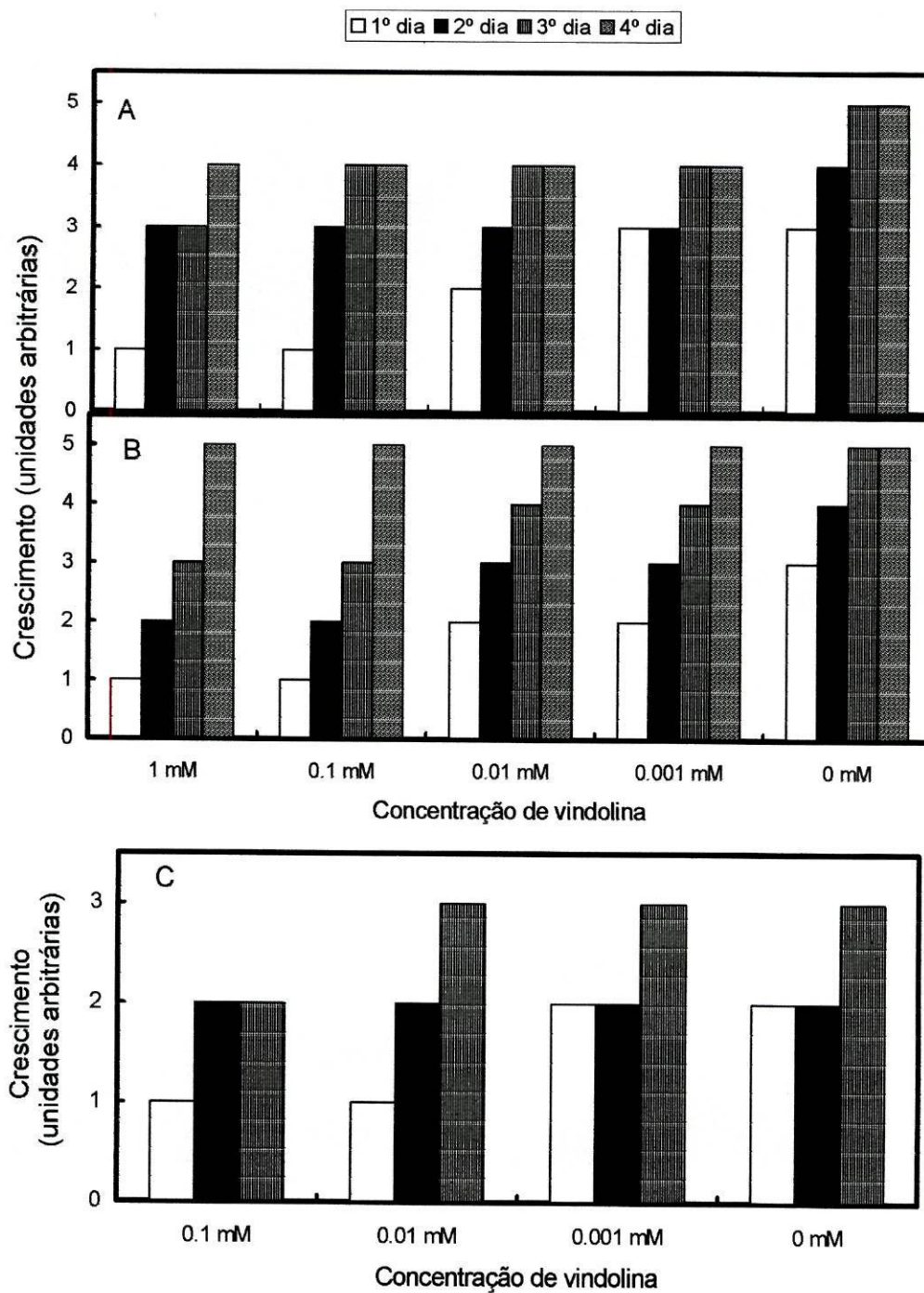


Figura 3.7. Crescimento do fungo *Rhizopus sexualis* na presença de diferentes concentrações de vindolina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio.

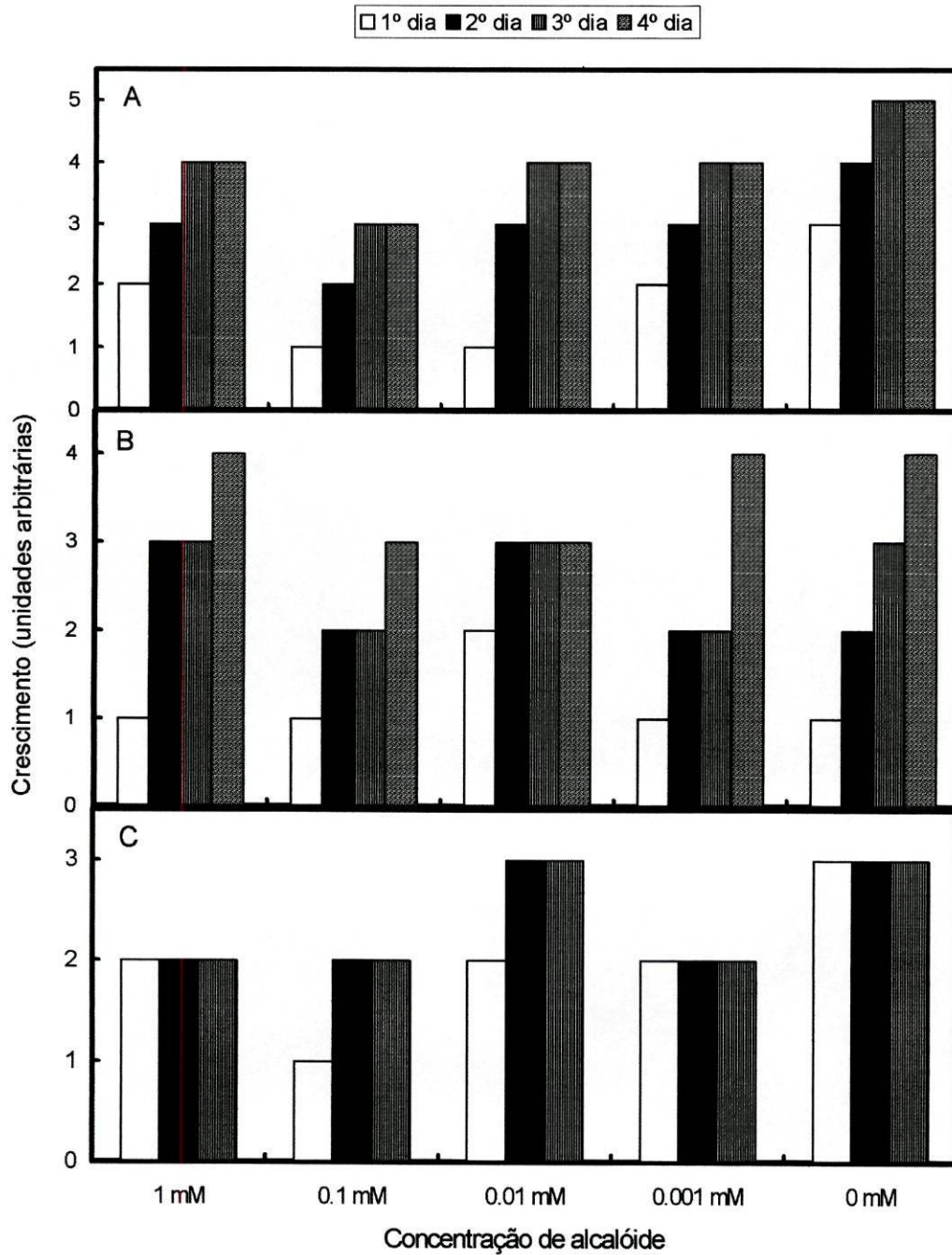


Figura 3.8. Crescimento do fungo *Rhizopus sexualis* na presença de diferentes concentrações de catarantina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio

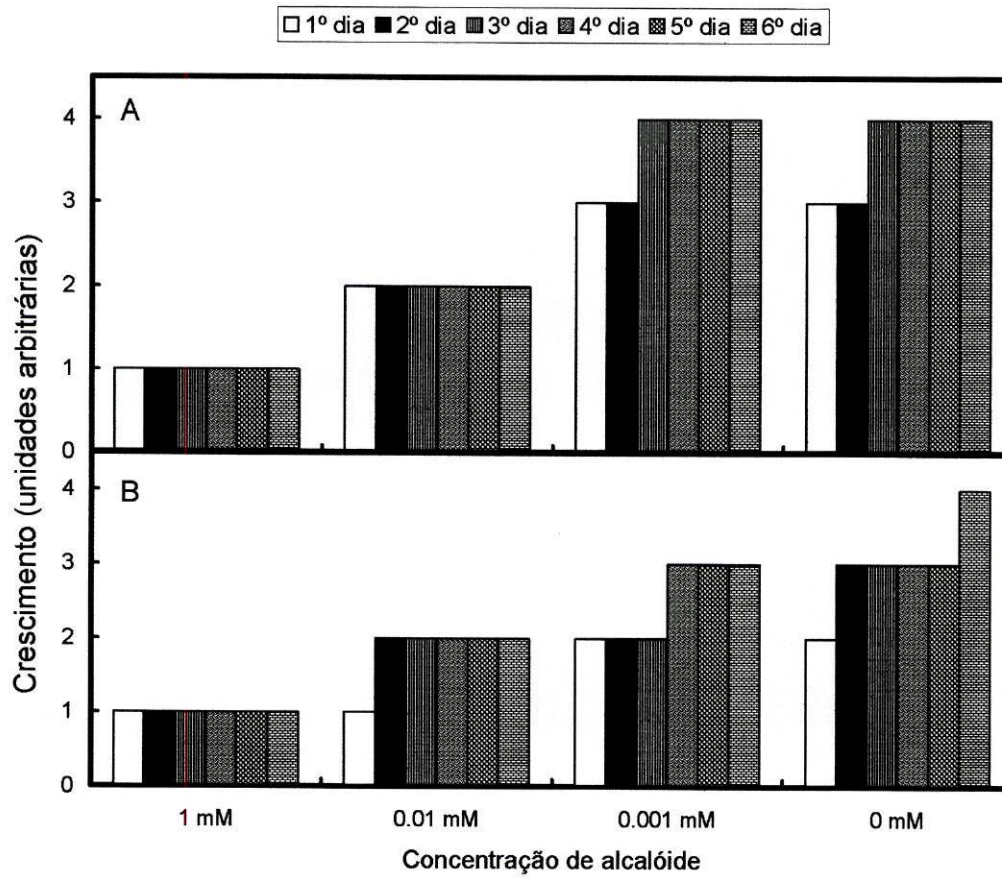


Figura 3.9. Crescimento do fungo *Rhizopus sexualis* na presença de diferentes concentrações de AVLB em duas experiências independentes (A, B). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio

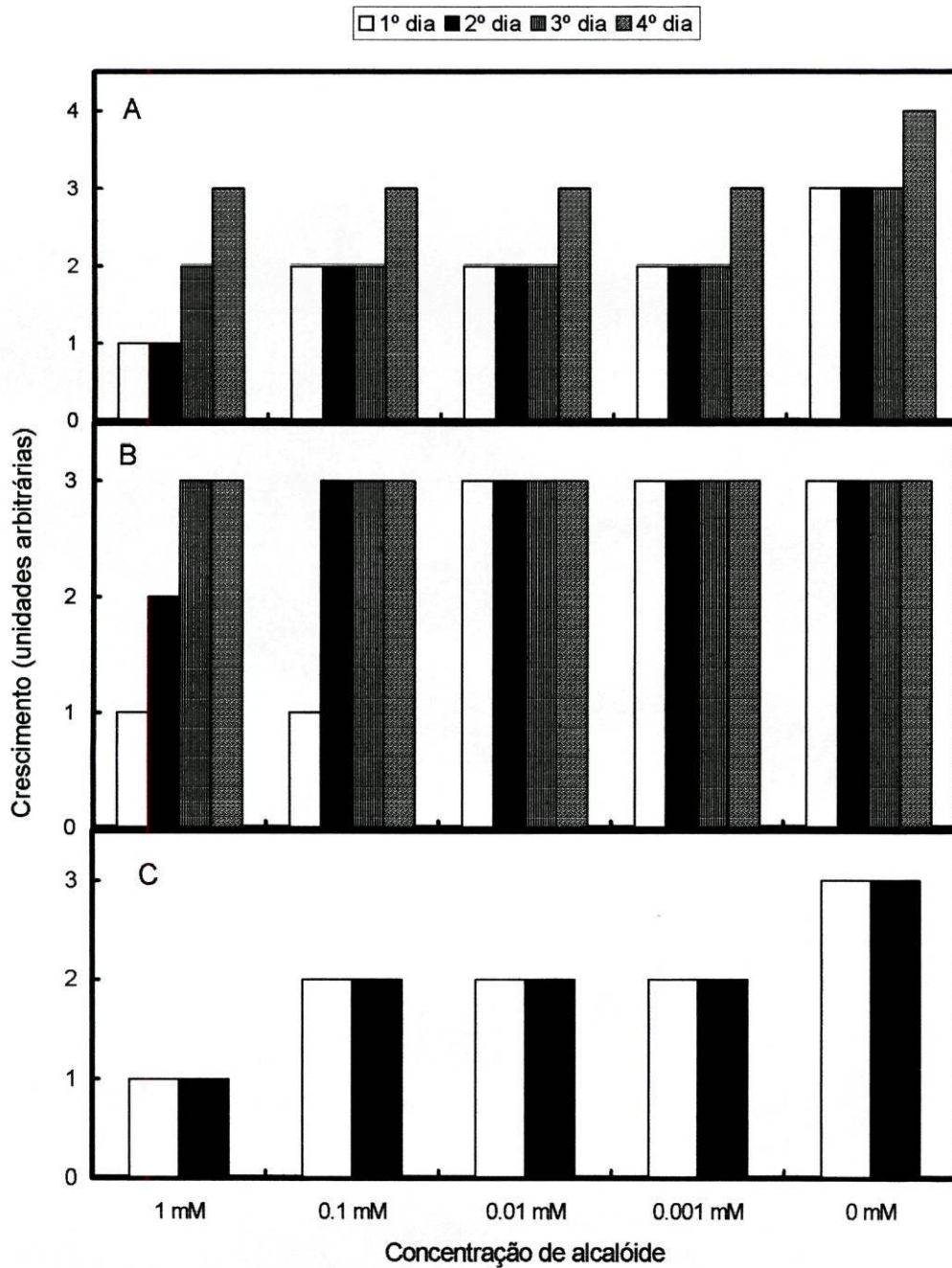


Figura 3.10. Crescimento do fungo *Mucor racemosus* na presença de diferentes concentrações de vindolina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio

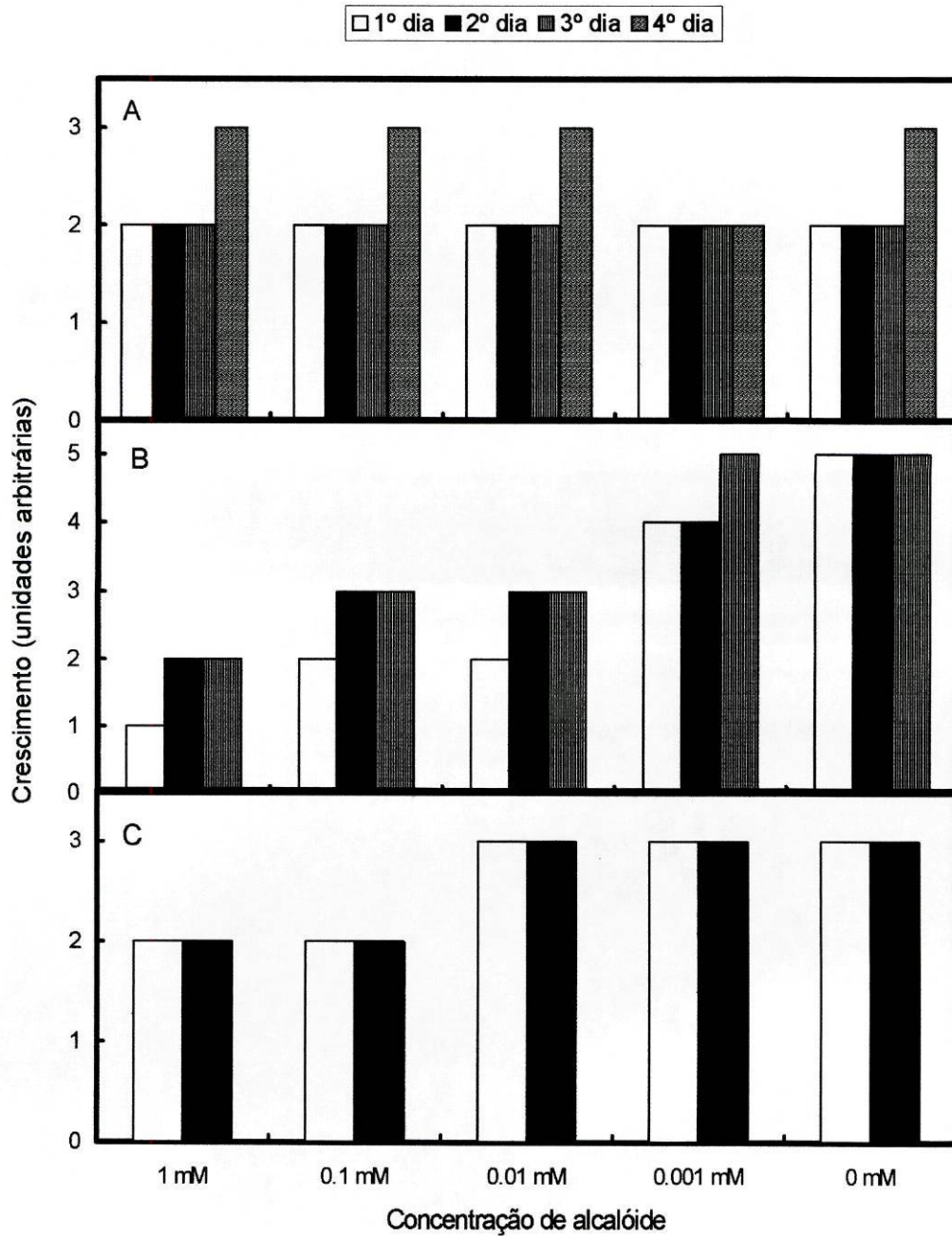


Figura 3.11. Crescimento do fungo *Mucor racemosus* na presença de diferentes concentrações de catarantina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio

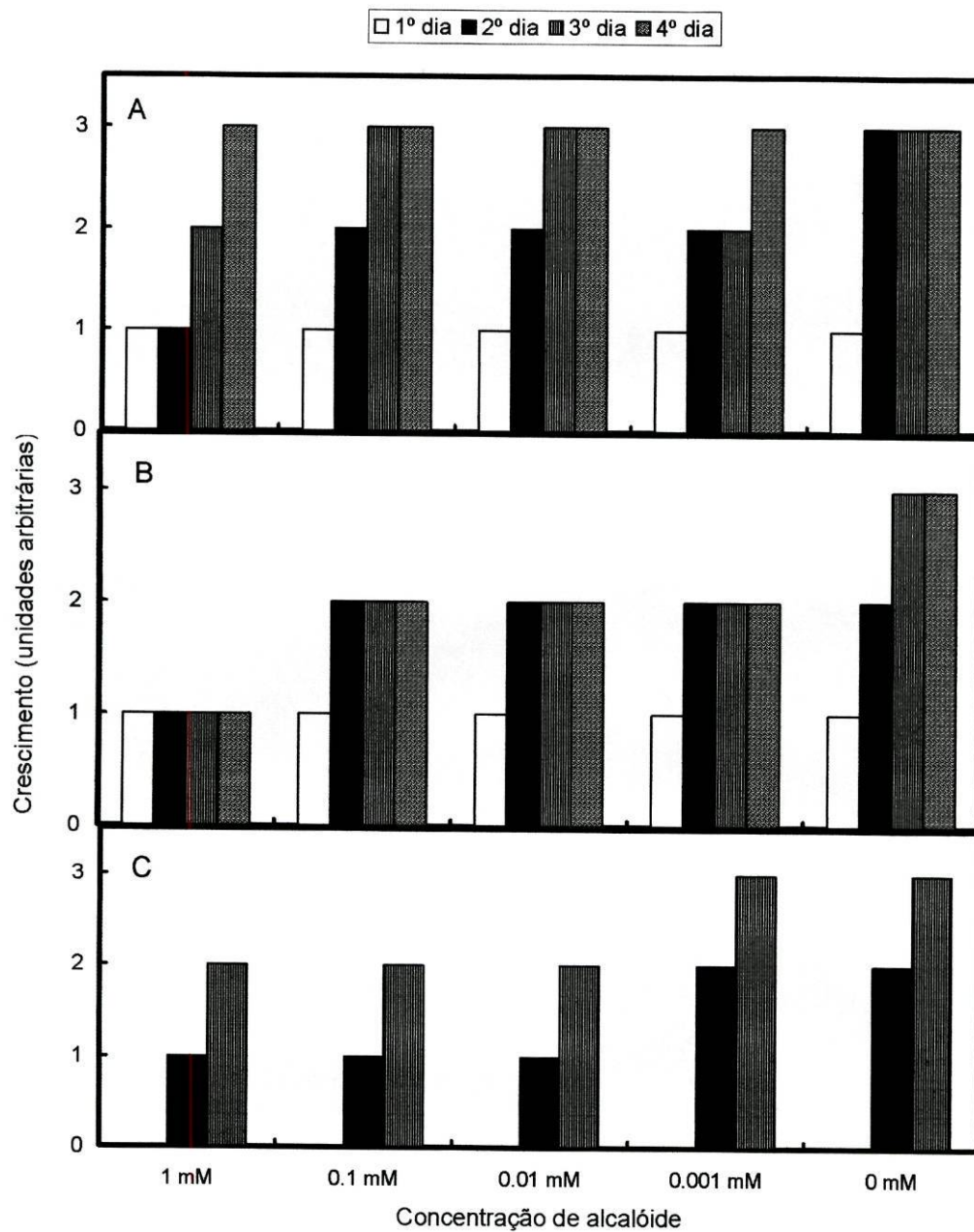


Figura 3.12. Crescimento do fungo *Botrytis sp.* na presença de diferentes concentrações de vindolina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio

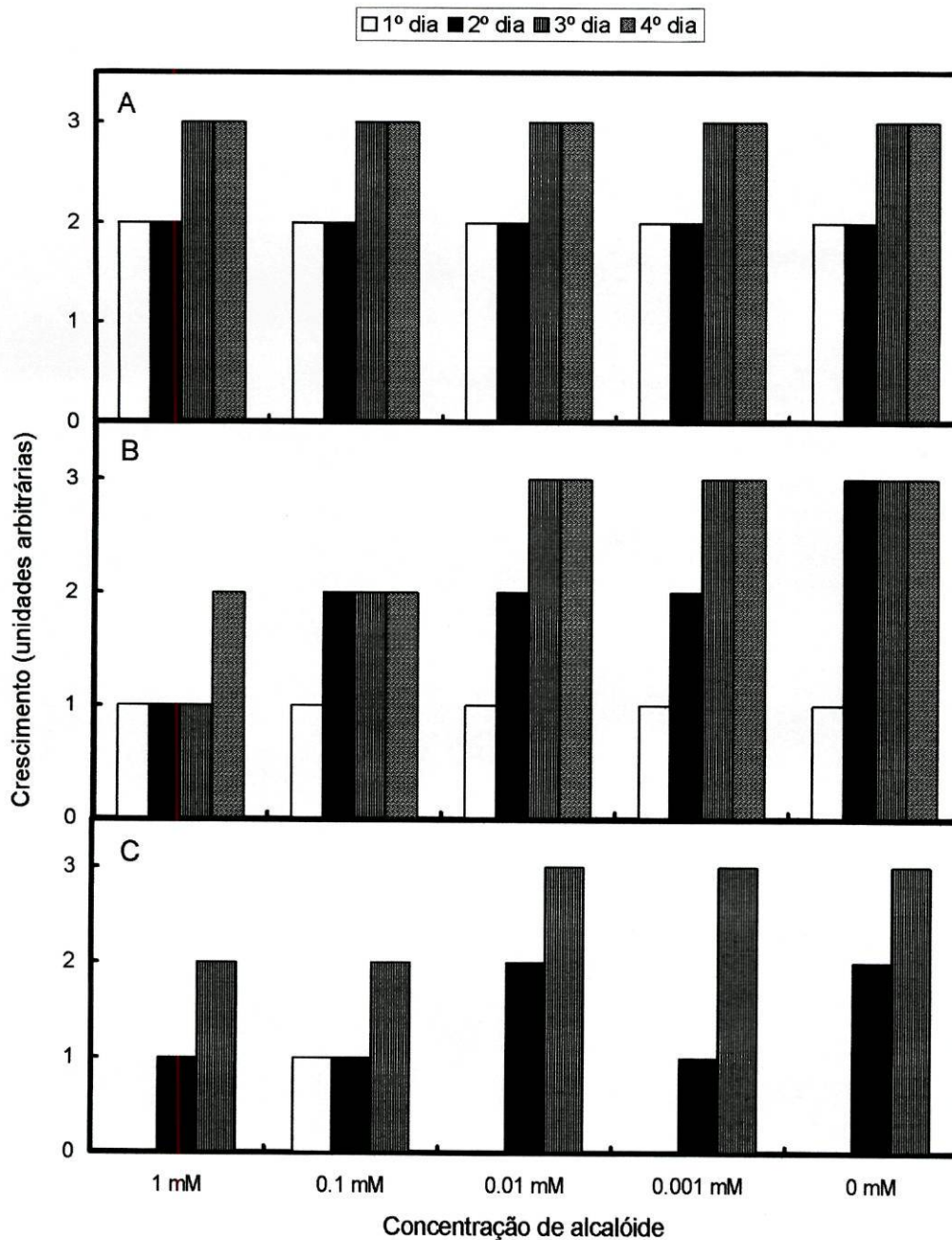


Figura 3.13. Crescimento do fungo *Botrytis sp.* na presença de diferentes concentrações de catarantina em três experiências independentes (A, B, C). O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio

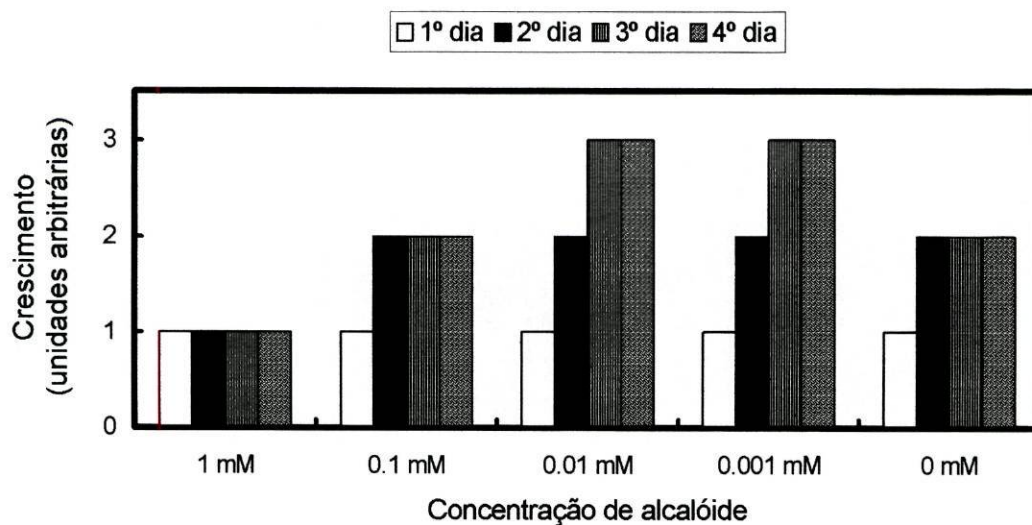


Figura 3.14. Crescimento do fungo *Botrytis sp.* na presença de diferentes concentrações de AVLB. O crescimento está representado em unidades arbitrárias definidas com base no crescimento relativo em termos de tamanho e densidade do micélio

3.4. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides no crescimento de duas espécies de bactérias

Foi estudada a influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides catarantina e vindolina no crescimento das bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Erwinia carotovora*.

A bactéria *Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria heterotrófica, gram negativa, aeróbia e com flagelação polar. Este tipo de bactérias encontra-se no solo ou na água. Utilizam uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Várias espécies de *Pseudomonas* são patogénicas para as plantas, o que não é o caso de *P. fluorescens* (Brock, 1978).

As bactérias do género *Erwinia* são bacilos gram negativos, que não esporulam, e são anaeróbias facultativas. A espécie *Erwinia carotovora* em particular causa a podridão das hortaliças, devido à produção de uma enzima pectinolítica (Brock, 1978).

Quando a bactéria *Erwinia carotovora* foi colocada a crescer em meio com diferentes concentrações do alcalóide vindolina verificou-se um crescimento praticamente igual em todos os tubos (figura 3.15). As bactérias que foram colocadas a crescer em meio com água apresentaram um crescimento ligeiramente superior.

Quando a bactéria *E. carotovora* foi colocada a crescer em meio com catarantina verificou-se uma inibição de crescimento na concentração 1 mM deste alcalóide. O crescimento inicial, durante as primeiras horas não parece ser afectado, mas ao fim de 24 horas é possível observar uma inibição de cerca de 70% (figura 3.16). Nas restantes concentrações de catarantina o crescimento das bactérias foi praticamente igual ao controlo.

Verificou-se que o crescimento da bactéria *P. fluorescens* não é afectado pelo alcalóide vindolina uma vez que, como se pode verificar pela análise da figura 3.17, o crescimento desta bactéria foi praticamente igual em qualquer das concentrações de vindolina experimentadas e no controlo.

Quando a bactéria *P. fluorescens* foi colocada a crescer em meio com diferentes concentrações de catarantina verificou-se uma inibição do seu crescimento no meio contendo 1 mM deste alcalóide. As restantes concentrações de alcalóide parecem não

afectar o crescimento do fungo. O efeito de inibição da catarantina 1mM só é notório ao fim de 24 horas, onde ultrapassa os 70% (figura 3.18).

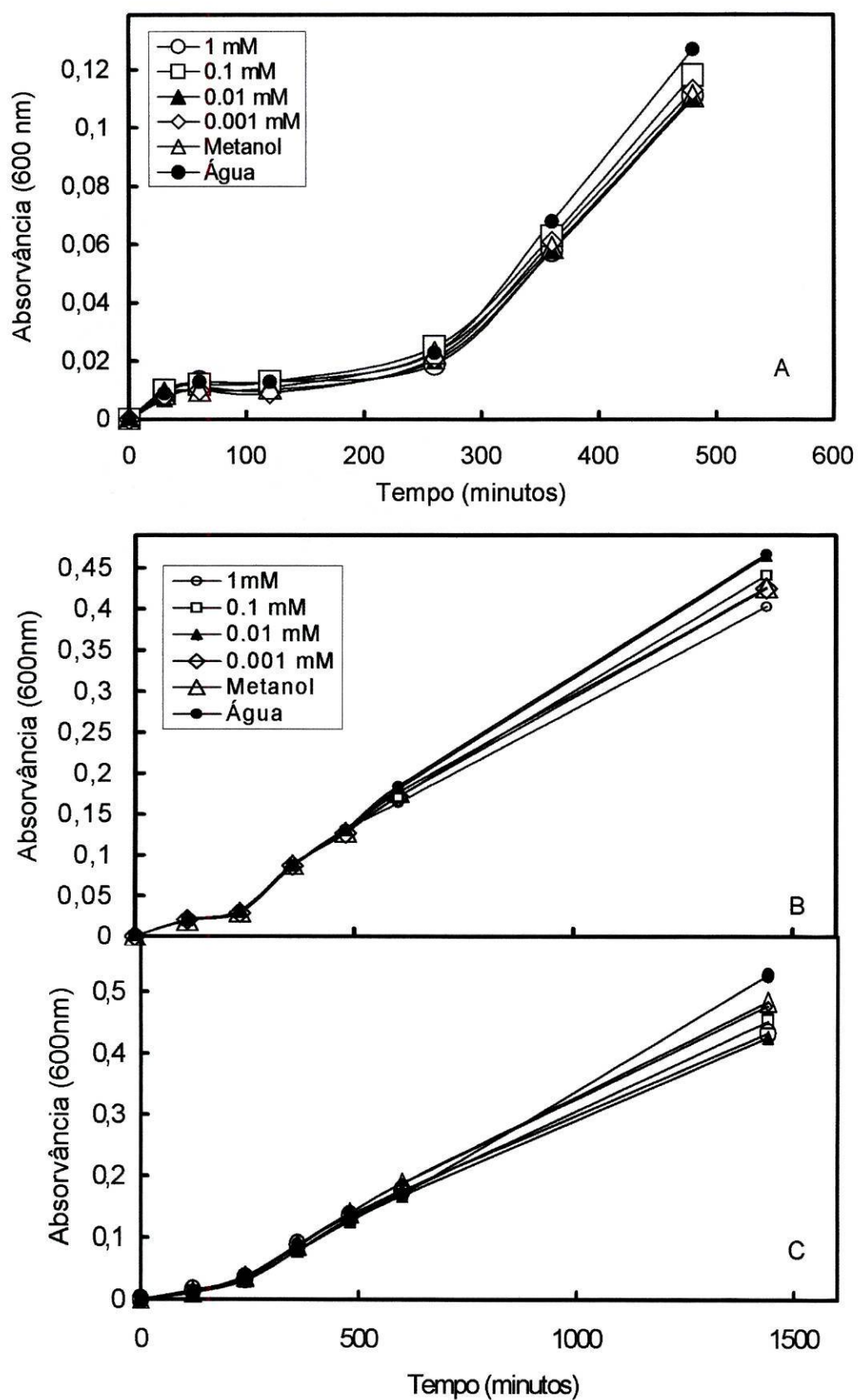


Figura 3.15. Curvas de crescimento da bactéria *Erwinia carotovora* na presença de diferentes concentrações de vindolina em três experiências independentes (A, B, C).

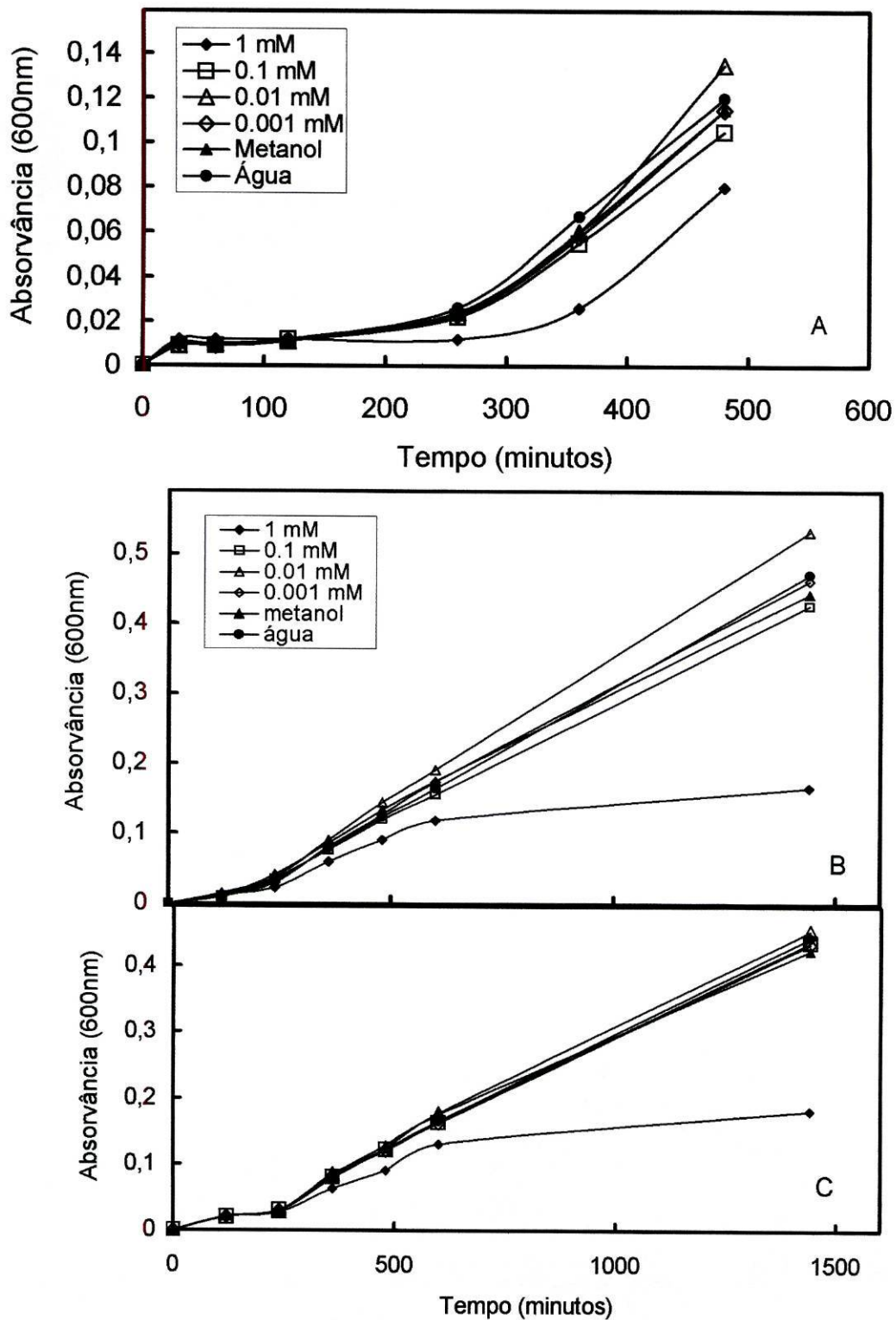


Figura 3.16. Curvas de crescimento da bactéria *Erwinia carotovora* na presença de diferentes concentrações de catarantina em três experiências independentes (A, B, C).

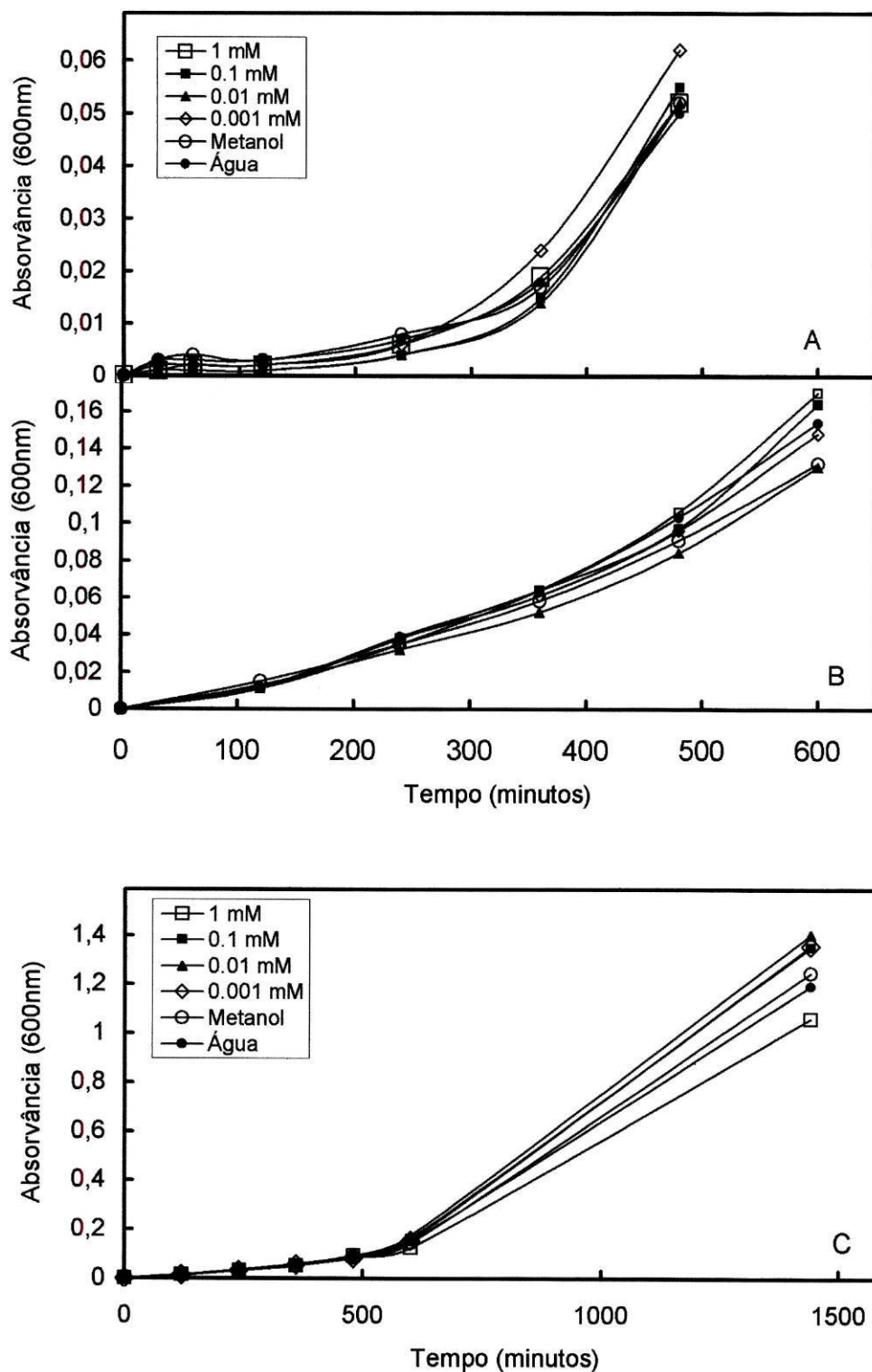


Figura 3.17. Curvas de crescimento da bactéria *Pseudomonas fluorescens* na presença de diferentes concentrações de vindolina em três experiências independentes (A, B, C).

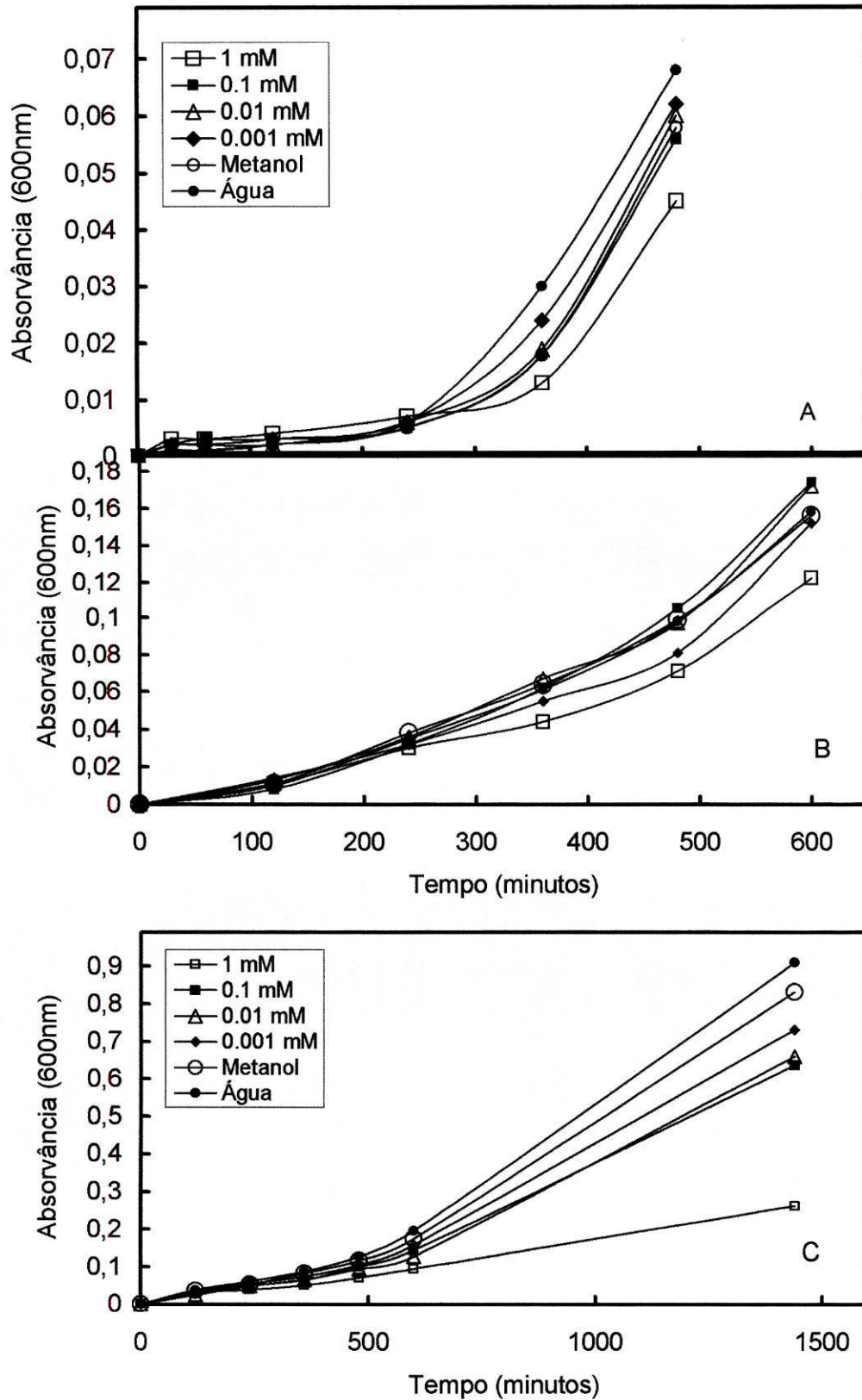


Figura 3.18. Curvas de crescimento da bactéria *Pseudomonas fluorescens* na presença de diferentes concentrações de catarantina em três experiências independentes (A, B, C).

3.5. Estudo da influência dos alcalóides indólicos monoterpénóides na actividade de herbivorismo

Os caracóis são espécies herbívoras com hábitos polípagos sendo, por isso, utilizados em estudos de actividade de dissuasão de herbivorismo (Silva, 1985, Smith et al., 2001). Neste estudo, foram utilizados caracóis da espécie *Helix aspersa* L. para investigar a capacidade de defesa dos alcalóides catarantina, vindolina e AVLB contra o ataque por herbívoros. A actividade de dissuasão de herbivorismo destes compostos foi avaliada utilizando fragmentos de folhas de *Plantago* sp. de tamanho constante tratados com soluções metanólicas dos diferentes alcalóides como descrito por Luijendijk et al. (1996). Foram utilizadas plantas do género *Plantago* devido a estas constituírem um alimento bem aceite pelos caracóis.

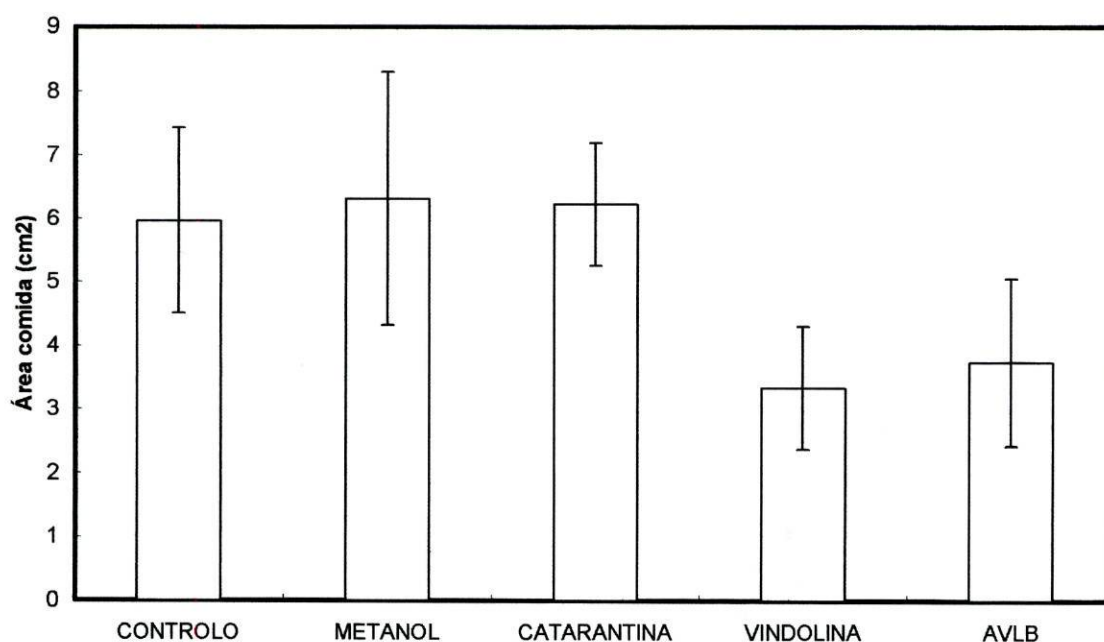


Figura 3. 19. Área de folha comida por *H. aspersa* durante 24 h. As folhas foram tratadas com soluções metanólicas dos alcalóides numa proporção com o peso da folha que resultasse numa concentração estimada de 0,6 mM. Valores representam a média de 6 experiências independentes.

Como se pode observar na figura 3.19 a catarantina não influenciou a actividade de herbivorismo dos caracóis enquanto a vindolina e a AVLB inibiram significativamente essa actividade. Na tabela 3.2 estão representadas as percentagens de inibição provocadas

pelos diferentes alcalóides podendo-se observar que a vindolina e a AVLB provocam inibições de quase 50%.

Tabela 3.2 – Percentagem de inibição da actividade de herbivorismo de *H. aspersa* sobre folhas de *Plantago* tratadas com diferentes alcalóides de *C. roseus*.

Tratamento	Inibição (%)
Catarantina	1
Vindolina	47
AVLB	41

4. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste trabalho foi estudada a actividade antifúngica, antibacteriana e antiherbivorismo da catarantina, vindolina e anidrovinblastina.

C. roseus é uma planta muito conhecida pela acumulação nas suas folhas dos alcalóides anticancerígenos VLB e VCR. Além destes dois alcalóides indólicos monoterpénóides, a planta acumula nas suas folhas uma grande quantidade e variedade deste tipo de compostos, sendo os mais abundantes a catarantina, vindolina e AVLB.

Embora haja referências de actividade de defesa para extractos de alcalóides das folhas de *C. roseus* e para os alcalóides triptamina e strictosidina (Meisner et al. 1981; Luijendijk et al., 1996), os três alcalóides principais nunca foram estudados especificamente. Por este motivo, o primeiro passo deste trabalho foi determinar as concentrações dos alcalóides *in planta* para poder, posteriormente, formular conclusões a partir dos resultados de actividade *in vitro*.

O cálculo da concentração dos três alcalóides ao longo do desenvolvimento das folhas permitiu observar que a concentração de catarantina e vindolina diminuiu ao longo do desenvolvimento, enquanto a AVLB aumenta (tabela 3.1.). Estes resultados estão de acordo com o observado anteriormente por Naaranlahti et al. (1991) e apresentam uma boa correlação com a actividade da peroxidase básica que Sottomayor et al. (1996 e 1998) propuseram ser responsável pela dimerização da catarantina e vindolina em AVLB. De facto, Magalhães (2001) observou um aumento de actividade da AVLB sintase-peroxidase com o desenvolvimento das folhas, em plantas do mesmo grupo e idade das utilizadas neste trabalho.

A concentração global dos três alcalóides diminui com o desenvolvimento das folhas de aproximadamente 10 mM até 3 mM, o que representa concentrações bastante elevadas e potencialmente tóxicas, especialmente nas folhas mais jovens, mais nutritivas e com menores defesas mecânicas. Esta correlação e o seu significado em termos de defesa foram também observados e discutidos por Frischknecht et al. (1987).

Os alcalóides são acumulados nos vacúolos e podem por isso atingir concentrações elevadas sem afectar o normal funcionamento das reacções citoplasmáticas. As concentrações de ~10 mM estimada para as folhas jovens de *C. roseus* são, por isso,

compatíveis com a manutenção da vida celular. De facto, elas podem mesmo ser bastante mais elevadas em certas células, pois é possível que os alcalóides se acumulem especialmente na epiderme e em células especializadas – idioblastos e lactíferos – presentes nas folhas de *C. roseus* (Mersey e Cutler, 1986; Sottomayor, 1998; Wink, 1998).

Não parece ser invulgar esta acumulação de concentrações elevadas de compostos secundários nas células vegetais pois Wink (1998) refere uma concentração 200 mM para os alcalóides quinolizidínicos na epiderme de folhas de *Lupinus*.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a vindolina e a AVL B apresentam actividade antifúngica, sendo capazes de inibir ou retardar significativamente o crescimento do protista *Pythium splendens* e dos fungos *Mucor racemosus*, *Rhizopus sexualis*, *Botrytis sp.* Apesar destes alcalóides apresentarem uma actividade inibitória do crescimento de *Botrytis sp.*, este fungo consegue colonizar as folhas de *C. roseus*. No entanto nunca cresce muito e não provoca um efeito muito marcante nas folhas que apresentavam, apenas, além das lesões observadas com o microscópio de fluorescência, uma senescência um pouco mais precoce.

A catarantina não apresenta actividade antifúngica, mas parece possuir actividade antibacteriana, pois inibiu significativamente o crescimento das duas espécies de bactérias testadas. A vindolina não apresenta actividade antibacteriana.

Estas actividades foram observadas para concentrações de 1 mM e, às vezes, até para concentrações inferiores, tendo portanto um significado biológico, pois as concentrações nas folhas ultrapassam, normalmente, esses valores (tabela 3.1.)

De facto, a catarantina e vindolina parecem estar, normalmente, presentes nas folhas de *C. roseus* em concentrações bastante superiores a 1 mM e poderão, por isso, representar uma barreira importante à infecção por bactérias e fungos, respectivamente. Não foi possível testar concentrações tão elevadas *in vitro* pois isso implicaria uma adição de metanol em quantidades muito elevadas aos meios de cultura, que seria, só por si, extremamente inibitória e impossibilitaria o estudo.

No estudo com *Helix aspersa* observou-se que os alcalóides vindolina e AVL B inibiam muito significativamente o consumo de alimento por estes animais (quase 50%), indicando que estes alcalóides, numa concentração de cerca de 0,6 mM, possuem

actividade antiherbivorismo. Uma vez que, especialmente a concentração de vindolina, ultrapassa largamente os 0,6 mM, é possível que estes alcalóides indólicos possuam um papel efectivo de dissuasão de herbivorismo sobre *C. roseus* na natureza.

Neste trabalho, pretendeu-se estudar o possível papel de cada um dos três alcalóides principais das folhas de *C. roseus* e, por isso, eles foram sempre utilizados em experiências independentes. No entanto, o seu papel pode resultar também da sua associação e, por isso, deveriam também ser realizadas, no futuro, estudo de actividade de misturas de alcalóides. De facto, a actividade da mistura dos três alcalóides pode mesmo ser superior à adição do efeito individual de cada um deles pois Smith et al. (2001) observou a existência de sinergismo entre os glicoalcalóides chaconina e solanina na inibição da alimentação de caracóis.

5. CONCLUSÕES

Os estudos efectuados durante a realização deste trabalho permitem elaborar algumas conclusões importantes sobre a função dos alcalóides indólicos monoterpénoides catarantina, vindolina e anidrovinblastina de *Catharanthus roseus*.

Foi observado que a concentração global dos três alcalóides estudados diminui com a idade da folha, o que pode corresponder a uma maior defesa química nos tecidos mais jovens e tenros, onde as defesas mecânicas são menos eficientes. Estes resultados indicam, também, uma possível remobilização destes produtos, nas folhas senescentes.

Os alcalóides vindolina e anidrovinblastina apresentam actividade antifúngica em concentrações inferiores (vindolina) ou semelhantes (AVLB) às concentrações fisiológicas, enquanto o alcalóide catarantina possui alguma actividade antibacteriana em concentrações inferiores às concentrações fisiológicas. Foi ainda observado que a vindolina e a AVLB apresentam actividade antiherbivorismo em concentrações inferiores às concentrações fisiológicas.

Em resumo, os alcalóides indólicos monoterpénoides vindolina, catarantina e anidrovinblastina parecem possuir um papel de defesa, por vezes multifuncional (vindolina e AVLB), contra stresses bióticos e devem, portanto, contribuir significativamente para a capacidade de sobrevivência das plantas de *C. roseus* na natureza.

BIBLIOGRAFIA

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blacwell M. 1996. *Introductory Mycology*, ed. John Wiley & Sons, Inc., fourth edition, New York

Arens H, Stöckigt J, Weiler EW, Zenk MH. 1978. Radioimmunoassay for the determination of the indole alkaloids ajmalicine and serpentine in plants. *Planta Medica* 34: 37-46

Baldwin IT. 1991. Damage-induced alkaloids in wild tobacco, ed. Tallamy DW, Raupp MJ. In *Phytochemical induction by herbivores*. Wiley, New York, pp 47-69

Balsevich J, Bishop G. 1989. Distribution of catharanthine, vindoline and 3',4'-anhydrovinblastine in the aerial parts of some *Catharanthus roseus* plants and the significance thereof in the relation to alkaloid production in cultured cells. In *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*, ed. Kurz WGW, pp.149-153. Springer-Verlag, Berlin

Bashir-Khan M, Harbone JB. 1990. Induced alkaloid defence in *Atropa acuminata* in response to mechanical and herbivore leaf damage. *Chemoecology* 1: 77-80

Baxter RL, Hasan M, Mackenzie NE, Scott AI. 1982. Biosynthesis of the antitumour *Catharanthus* alkaloids: the fate of the 21' α -hydrogen of anhydrovinblastine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 791-793.

Bennet RN, Wallsgrove RM. 1994. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytology* 127: 617-633

Brock TD. 1978. *Biología de los microorganismos*, Ediciones Ómega, S.A., 2ª edición, Barcelona

Chandravadana MV, Nidiry ESJ, Khan RM, Rao MS. 1994. Nematicidal activity of serpentina against *Meloidogyne incognita*. *Fundam. Appl.Nematol.*17 (2): 185-192

Chockalingam S, Nalina Sundari MS, Thenmozhi S.1989. Impact of the extract of *Catharanthus roseus* on feeding and enzymatic digestive activities of *Spodoptera litura*. *J. Environ. Bio.* 10: 303-307

De Luca V, Cutler AJ. 1987. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiolog* 85: 1099-1102

Deus-Neumann B, Stockigt J, Zenk MH. 1987. Radioimmunoassay for the quantitative determination of catharanthine. *Planta Medica* 53: 184-188

Dittmar A. 1998/2001. Tradicional Medicinal Plants of Samoa. <http://www.dittmar.dusnet.de>

Ellis BE. 1998. Metabolism of defence and communication. In *Plant Metabolism*, ed. D.T.Dennis, D.H. Turpin, D.D. Lefebvre and D.B. Layzell, Addison Wesley Langman, England, pp. 148-160

Endo T, Goodbody A, Misawa M. 1987. Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica* 53: 479-482

Errera L. 1887. *Brussels Ac.Bull* 13: 272(citedin *Royal Society Catalogue os Scientific Papers*, Vol.14)

Facchini PJ. 2001. Alkaloid Biosynthesis In Plants: biochesmistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Plant Molecular Biology* 52: 29-66

Frischknecht PM, Bättig M, Baumann TW. 1987. Effect of drought and wounding stress on indole alkaloid formation in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 26: 707-710

Gantet P, Sibénil Y, Benhamron S, Memelink J, Giglioli-Guivarc'h N, Thiersault M, Boisson B, Doireau P. 2001. *Catharanthus roseus* G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures. *Plant Molecular Biology* 45: 477-488

Geerlins A, Martinez-Lozano Ibanez M, Memelink J, van der Heijden R, Verpoorte R. 2000. Molecular cloning and analysis of strictosidine β -D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* 275: 3051-56

Haslam E. 1986. Secondary Metabolism – Fact and Fiction. In *Natural Product Reports* pp. 217-249

Kulkarni RN, Ravindra NS. 1988. Resistance to *Pythium aphanidermatum* in diploids and induced autotetraploids of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica* pp. 356-359

Kutchan TM. 1995. Alkaloid Biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell* 7: 1059-1070

Lichtenthaler H, Schwender J, Dish A, Rohmer M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400: 271-274

Luijendijk TJC, Meijden E, Verpoorte R. 1996. Involvement of strictosidine as a defensive chemical in *Catharanthus roseus*. *Journal of Chemical Ecology* Vol.22, No 8

Mann J. 1987. *Secondary metabolism*. Second edition. Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford

Magalhães M. 2001. Comportamento de enzimas do sistema anti-oxidante durante a ontogenia foliar e sob situações de stress em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto (submetida)

Maraschin M, Verpoorte R. Engenharia do Metabolismo Secundário: optimização da produção de metabolitos secundários em culturas de células vegetais. <http://www.biotecnologia.com>

Meijer AH, Verpoorte R, Hoge JHC. 1993. Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. In *Cytochrome P-450 and secondary metabolism in Catharanthus roseus* pp21- 48

Meisner J, Weissenberg M, Palevitch D, Aharonson N. 1981. Phagodeterency induced by leaves and leaf extracts of *Catharanthus roseus* in the larva of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Economic Entomology* 74 131-135

Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. 2001. ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* Vol.6 No.5: 212-219

Mersey BG, Cutler J. 1986. Differential distribution of specific indole alkaloids in leaves of *Catharanthus roseus*. *Can. J. Bot.* 64: 1039-1045

Moreno PRH, Poulsen C, Heijden R, Verpoorte R. 1996. Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 99-107

Mothes K, Luckner M. 1985. Historical Introduction. In *Biochemistry of Alkaloids*, ed. by Mothes K, Schütte HR and Luckner M, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin

-
- Naaranlahti T, Auriola S, Lapinjoki SP. 1991. Growth-related dimerization of vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus* and effect of wounding on the process. *Phytochemistry* 30: 1451-1453
- Noble RL. 1990. The discovery of vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *BiochemistryCell Biology* 68: 1344-1351
- Osbourn AE. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 1999. *Biology of Plants*. Sixth edition. W.H. Freeman and Company Worth Publishers
- Roberts MF, Wink M. 1998. A short history of alkaloids. In *Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications*, ed. Roberts and Wink, Plenum Press, New York
- Siberil Y. 2001. Facteurs de transcription de type "G-Box Binding Factores" et regulation de la biosynthese des alcaloïdes de *Catharanthus roseus*. Tese de Doutorado. Universidade de Tours. França.
- Silva MTCO. 1985. Food selection by terrestrial molluscs and its ecological consequences for plant communities. Tese de Doutorado. Southampton University.
- Smith DB, Roddick JG, Jones JL. 2001. Synergism between the potato glycoalkaloids alpha-chaconine and alpha-solanine in inhibition of snail feeding. *Phytochemistry* 57 (2): 229-243
- Sottomayor M, López-Serrano M, DiCosmo F, Barceló AR. 1998. Purification and characterization of α -3',4'-anidrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *FEBS Letters* 428: 299-303

Sottomayor M. 1998. Synthesis of α -3',4'-anidrovinblastine in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto

Sottomayor M., Pinto MC, Salema R, DiCosmo F, Pedrenõ MA, Barceló AR. 1996. The vacuolar localization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for the synthesis of α -3',4'-anidrovinblastine in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don leaves. *Plant, Cell and Environment* 19: 761-767

Southon IW, Buckingham J. 1989. *Dictionary of Alkaloids*. London: Chapman and Hall, Ltd

Stevens LH, Blom TJM, Verpoorte R. 1993. Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidina synthase and strictosidina glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Rep.* 12: 573-576

St-Pierre B, De Luca V. 1995. A cytochrome P-450 monooxygenase catalyses the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 109: 131-139

Thomas JC, Adams DG, Nessler CL, Brown JK, Bohnert H. 1995. Tryptophan decarboxylase, tryptamine, and reproduction of the whitefly. *Plant Physiology* 109: 717-720

Waller GR, Nowacki EK. 1978. *Alkaloid Biology and Metabolism in Plants*. Plenum Press, New York

Westekemper P, Wiczorek U, Gueritte F, Langlois N, Potier N, Zenk MH. 1980. Radioimmunoassay for the determination of the indole alkaloid vindolina in *Catharanthus*. *Planta Medica* 39: 24-37

Wink M. 1998. Introduction. In *Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications*, ed. Roberts and Wink, Plenum Press, New York