

MARCELO ROGÉRIO DA SILVA

**Análise da distribuição de alcalóides piridínicos
em diferentes fases fenológicas de *Senna
multijuga* (Rich.) Irwin et Barn.**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2011

MARCELO ROGÉRIO DA SILVA

**Análise da distribuição de alcalóides piridínicos
em diferentes fases fenológicas de *Senna
multijuga* (Rich.) Irwin et Barn.**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Silva, Marcelo Rogério da
S586a Análise da distribuição de alcalóides piridínicos em diferentes fases fenológicas de
Senna multijuga (Rich.) Irwin et Barn. / Marcelo Rogério da Silva -- São Paulo, 2011.
69 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2011
Bibliografia.

1. Fabaceae. 2. Fenologia. 3. Mata Atlântica . I. Título

CDU: 582.736

À minha esposa Priscila e meu filho Felipe com amor!

Aos meus pais com saudades!

*“Nunca ande pelo caminho traçado, pois
ele conduz somente até onde os outros
foram”*

Alexander Graham Bell

Agradecimentos

À DEUS, pela proteção e por guiar meus passos na vida.

Neste momento gostaria de agradecer especialmente à minha esposa e companheira Priscila, que segura minha mão, me ajuda, me dá força, conselhos e incentivo para lutar e conquistar meus objetivos. Te amo muito!!!

Ao meu filho Felipe, alegria da minha vida! Seu sorriso renova minha vida a cada dia. Com ele aprendi a ser feliz de verdade. Te amo!!!

Aos meus pais (in memory) que sempre desejaram que eu tivesse sucesso na vida. Amo muito vocês!!!

À minha orientadora Dra. Cláudia, pela orientação desde o treinamento técnico, sempre acreditando em meu potencial e minha competência. Obrigado pela orientação fundamental, ensinamentos, a amizade sincera e o companheirismo em todos os eventos e coletas que participamos juntos. Muito Obrigado!!

Ao Dr. Paulo Moreno, por toda a colaboração prestada, pela competência, ensinamentos, companheirismo, além de inestimável amizade. Muito obrigado!!

Ao meu bom e velho amigo Marcos Enoque, que me acompanha desde a graduação. Obrigado pela amizade, ajuda e conselhos durante todo este tempo.

À Dra. Elaine Monteiro, pela colaboração com ensaios importantes para o trabalho, a ajuda na elaboração de artigos e banners. Muito obrigado!!!

Ao motorista Edmilson, por me ajudar nas diversas coletas com a grua, que mesmo emperrando o motor, sempre esteve bem humorado. Obrigado!!

À Dra. Sônia Dietrich, pelo apoio incondicional desde o início deste trabalho. Obrigado Doutora!!

Ao Dr. Edson Paulo Chu, pelas valiosas dicas em experimentos de cultura, além de fornecer muitos materiais de pesquisa. Muito obrigado!!

Aos pesquisadores do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica, Dra. Luce, Dra. Márcia, Dra. Rita, Dra. Ângela, Dra. Maria Ângela, Dra. Marília e Dra. Lilian, pelos valiosos ensinamentos e companheirismo durante estes anos. Muito obrigado!!

Aos amigos da Fisiologia, Rodrigo Cabral, Celso, Glauco, Ivan, Janaína, Vanessa, Gabriel, Jaimes, Maura, e todos aqueles que me ajudaram a alcançar este objetivo. Obrigado a todos!!

À Mary, pela amizade, por desenvolver a parte burocrática dos projetos, pela compra de materiais. Sempre competente e realizando um excelente trabalho. Muito obrigado Mary!!

À Ana e Cida da secretaria, que dá suporte aos alunos e pesquisadores da Fisiologia. Obrigado!!

Aos coordenadores da Pós-Graduação, Dra. Sônia, Dra. Solange e Dra. Rita, pelo apoio, conselhos e ensinamentos preciosos. Tenho certeza que pelo trabalho que estão desenvolvendo, em breve a Pós-Graduação terá avaliação 7. Muito obrigado!!

Aos funcionários da Pós-Graduação, Márcia R. Ângelo e Antônio Borges, pela indispensável colaboração com os alunos e pela grande amizade. Muito obrigado!!

Ao Dr. Marcos Pivatto (UNESP), pela amizade, ajuda e conselhos importantes para realização deste trabalho. Muito Obrigado!!

À FAPESP e seus assessores, pelas correções, críticas e sugestões valiosas. Mais uma vez muito obrigado pela bolsa concedida, além de reserva técnica para o desenvolvimento do projeto. Parabéns à Instituição e todos os seus funcionários. Obrigado!!

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Principais vias do metabolismo secundário.....	02
FIGURA 2. <i>Conium maculatum</i> & Coniina.....	05
FIGURA 3. Alcalóides.....	06
FIGURA 4. Alcalóides piridínicos.....	07
FIGURA 5. Biossíntese de alcalóides piridínicos.....	09
FIGURA 6. Alcalóides piridínicos de <i>Senna multijuga</i>	10
FIGURA 7. Mecanismo de ação da acetilcolinesterase (AChE).....	11
FIGURA 8. <i>Senna multijuga</i>	13
FIGURA 9. Ocorrência de <i>S. multijuga</i> no Brasil.....	14
FIGURA 10. Vista aérea da área de coleta.....	17
FIGURA 11. Sementes de <i>S. multijuga</i>	18
FIGURA 12. ASE 300 Dionex.....	20
FIGURA 13. Mudas de <i>S. multijuga</i>	30
FIGURA 14. Massa de extrato etanólico 2007/2008.....	32
FIGURA 15. Massa de extrato etanólico de cultivadas.....	33
FIGURA 16. Fração alcaloídica 2007/2008.....	34
FIGURA 17. Fração alcaloídica de cultivadas.....	35
FIGURA 18. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	37
FIGURA 19. Teste de inibição da enzima AChE.....	37
FIGURA 20. Inibição da AChE 2007/2008.....	39
FIGURA 21. Inibição da AChE de plantas cultivadas.....	40
FIGURA 22. Perfil cromatográfico CG/FID.....	41
FIGURA 23. Curvas de calibração.....	42

FIGURA 24. Perfil cromatográfico com padrão interno (PI).....	43
FIGURA 25. Concentração de alcalóides piridínicos 2007.....	44
FIGURA 26. Concentração de alcalóides piridínicos 2008.....	45
FIGURA 27. Concentração de alcalóides piridínicos em cultivadas.....	46
FIGURA 28. Ensaio de CCD com plantas cultivadas.....	47
FIGURA 29. Perfil cromatográfico da fração alcaloídica de raízes.....	48
FIGURA 30. Dados meteriológicos 2007/2008.....	49
FIGURA 31. Análise de alcalóides por CG/EM.....	50
FIGURA 32. Ensaio de germinação de sementes.....	51
FIGURA 33. Ensaio <i>in vitro</i> para formação de calos.....	52
FIGURA 34. Ensaio <i>in vitro</i> com calos.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA I – Dados de coletas de órgãos de <i>Senna multijuga</i> realizadas em diferentes fases fenológicas no ano de 2007.....	19
TABELA II – Dados de coletas de órgãos de <i>Senna multijuga</i> realizadas em diferentes fases fenológicas no ano de 2008.....	19
TABELA III – Curva de calibração 7'-multijuguinona.....	25
TABELA IV – Curva de calibração 12'-hidroxi-7'-multijuguinona.....	26

ÍNDICE

1. Introdução.....	01
1.1 Fases fenológicas e produção de metabólitos secundários.....	01
1.2 Alcalóides.....	05
1.2.1 Biossíntese de alcalóides piridínicos.....	07
1.3 Doença de Alzheimer.....	10
1.4 Generalidade sobre a família Fabaceae.....	11
1.5 <i>Senna multijuga</i>	12
1.6 Cultura <i>in vitro</i> e produção de metabólitos secundários.....	14
2. Objetivo geral.....	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. Material e métodos.....	17
3.1 Material vegetal.....	17
3.1.1 Desenvolvimento da plântula.....	18
3.1.2 Coleta de material nas fases fenológicas.....	18
3.2 Preparo do extrato bruto etanólico e extração da fração alcaloídica.....	20
3.3 Análises cromatográficas.....	22
3.3.1 Purificação da fração alcalóides totais por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	22
3.3.2 Ensaio para detecção de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE).....	23
3.3.3 Análise quantitativa de alcalóides piridínicos.....	24
3.3.3.1 Preparo das amostras com padrão interno.....	24
3.3.3.2 Curva de calibração.....	24
3.3.3.3 Análise qualitativa de alcalóides piridínicos.....	25

3.4 Ensaio de inibição da AChE por microplaca.....	26
3.5 Ensaios de cultura <i>in vitro</i>	27
3.6 Análise estatística.....	28
4. Resultados e discussão.....	29
4.1 Escolha do material vegetal.....	29
4.1.2 Cultivo de mudas de <i>S. multijuga</i>	29
4.2. Extrato etanólico e fração alcaloídica das árvores coletadas (2007/2008).....	30
4.3 Análises por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	36
4.4 Análise da inibição da AChE pelo ensaio de microplaca.....	38
4.5 Análise quantitativa de alcalóides piridínicos.....	40
4.5.1 Curva de calibração.....	41
4.6 Concentração de alcalóides piridínicos nos diversos órgãos de <i>S.</i> <i>multijuga</i>	43
4.7 Dados de temperatura, precipitação e irradiação solar.....	48
4.8 Análise qualitativa de alcalóides por CG/MS.....	50
4.9 Análise dos ensaios de cultura <i>in vitro</i>	51
5. Considerações finais.....	55
6. Conclusões.....	56
7. Resumo.....	57
8. Abstract.....	59
9. Referências bibliográficas.....	61
10. Anexos.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fases fenológicas e produção de metabólitos secundários

As plantas produzem uma grande variedade de compostos químicos, os quais são divididos em dois grupos, metabólitos primários e secundários. O metabolismo primário é considerado como uma série de processos envolvidos na manutenção fundamental da sobrevivência e do desenvolvimento, enquanto o metabolismo secundário consiste num sistema com importante função para a sobrevivência e competição no ambiente (Dixon, 2001).

Segundo Verpoorte (2000), o metabolismo secundário é caracterizado pela sua grande diversidade química, porém é peculiar a cada organismo, podendo, também, interagir com os demais organismos do ambiente. Durante muitos anos, os metabólitos secundários foram considerados como substâncias sem utilidade aparente para as plantas, mas, atualmente, é aceito que estejam envolvidos nas relações da planta com o ecossistema, agindo na defesa contra doenças ou na atração de polinizadores. Os metabólitos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microrganismos simbiotes. Contudo, os metabólitos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, reserva de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais.

As substâncias de origem vegetal possuem um importante papel na terapêutica moderna. Cerca de 25% dos fármacos usados nos países desenvolvidos contém um ou mais ingredientes extraídos de plantas (Hamburger et al. 1991).

A maioria dos metabólitos secundários são acumulados em pequenas quantidades nos vegetais, isso se deve em parte ao fato de serem sintetizados em células especializadas e em

diferentes estágios de desenvolvimento. Tal fato faz com que freqüentemente surjam dificuldades na sua extração e purificação (Croteau *et al.* 2000).

Durante os dois últimos séculos, muitos metabólitos secundários foram purificados e caracterizados estruturalmente devido ao interesse nas suas propriedades medicinais. (Bruneton, 1999). De acordo com Hostettmann *et al.* (1997), as plantas contêm milhares de constituintes com diferenças consideráveis em suas propriedades biológicas.

Segundo Taiz & Zeiger (2004), existem três vias biossintéticas principais do metabolismo secundário: o ácido chiquímico (precursor de compostos aromáticos), o acetato (precursor de ácidos graxos, polifenóis, isoprenos, prostaglandinas) e os aminoácidos (precursores de alcalóides) (Figura 1).

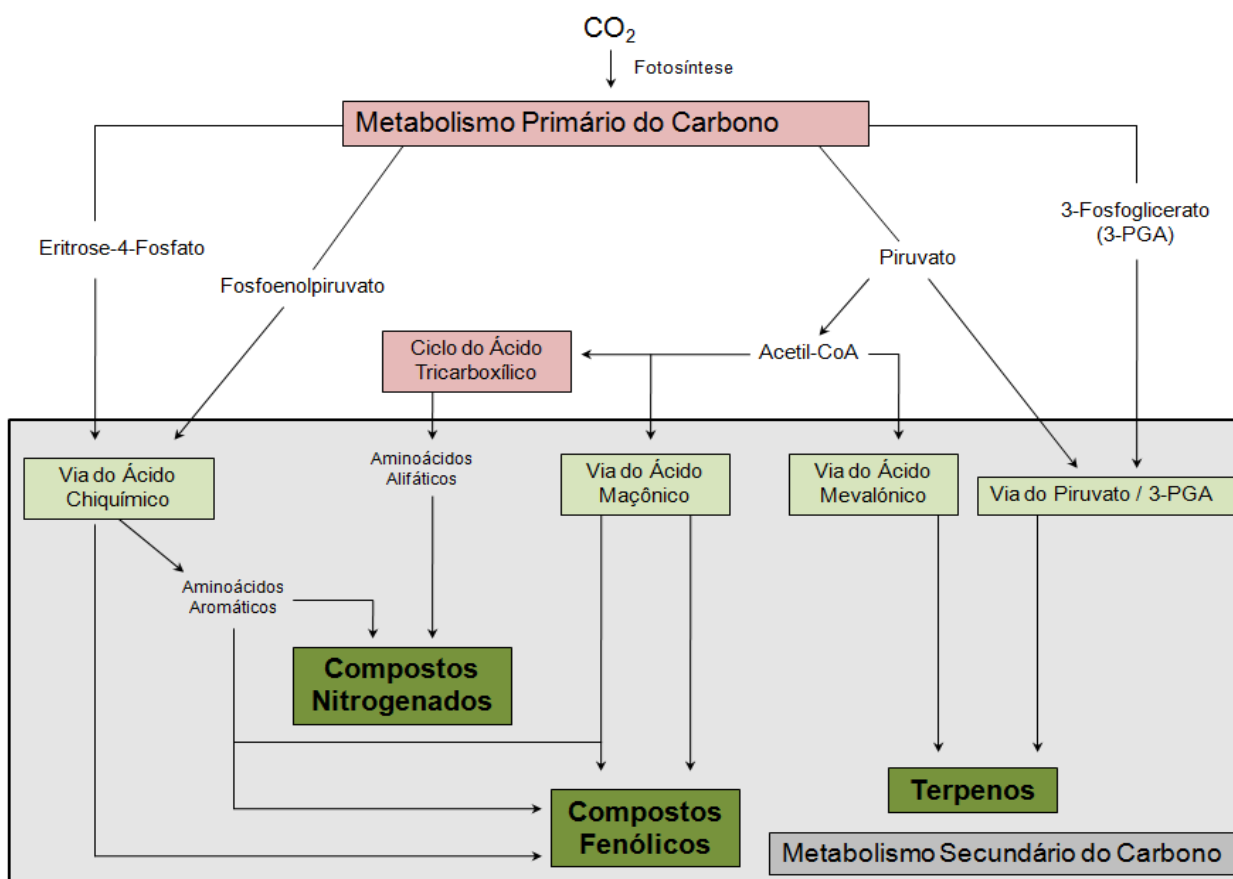


Fig.1. Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações, segundo Taiz & Zeiger (2004).

A observação das fases fenológicas ou fenofases das espécies é uma prática que vem sendo realizada desde os primórdios das civilizações, quando o homem, necessitando de alimento, buscou diferenciar quais espécies poderiam ser utilizadas em sua alimentação nos diferentes períodos do ano (Andreis et al., 2005). Os estudos de fenologia tiveram início há aproximadamente 1.000 anos, na China e em Roma, onde foram encontrados os primeiros registros de observações e calendários fenológicos. Estudos relataram que o termo “fenologia” passou a ser usado a partir da segunda metade do século XIX e foi proposto pelo botânico belga Charles Morren. A fenologia é uma ciência que identifica os fenômenos de floração, frutificação, brotamento e queda de folhas, nas suas mais diferentes e intensas fases, objetivando o conhecimento do ciclo anual das espécies em estudo, o qual está diretamente relacionado às condições climáticas e ao caráter adaptativo de cada espécie em sua área de dispersão (Andreis et al., 2005).

Muitos pesquisadores relataram que a concentração de metabólitos secundários variam de planta para planta e até mesmo em órgãos diferentes da mesma espécie. Kowalski & Wolski (2006), relataram que em *Silphium perfoliatum* a quantidade de fenólicos totais variava em folhas, inflorescências e rizomas. Hyder et al. (2002) relataram que as folhas, caules verdes e raízes de *Larrea tridentado* continham fenólicos totais de 36,2, 40,8 e 28,6 mg por 100g de peso seco, respectivamente. Uma tendência similar de resultados também foi observada por Springer et al. (2002), estudando *Lespedeza capitata*. A maior quantidade de compostos fenólicos presentes nas folhas, em comparação com a de raízes pode ser atribuída à presença ou ausência de luz, que afeta o teor desses compostos fenólicos nesses órgãos. Geralmente há um aumento no conteúdo de fenólicos totais em plantas cultivadas em situações de luminosidade em relação àquelas cultivadas ambiente escuro, porém, esses compostos podem variar em concentração, nos diferentes órgãos da planta, dependendo do grau de exposição à luminosidade (Mole & Waterman, 1987; Mole et al., 1988).

Também deve ser ressaltado que, muitas vezes, as variações na quantidade de metabólitos secundários podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários. Isto pode levar à menor concentração destes metabólitos por diluição, podendo, no entanto, resultar em maior quantidade total, devido ao aumento de biomassa (Spring & Bienert, 1987; Hendriks et al., 1997). Além disso, alguns dos fatores discutidos apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário, como por ex.: desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (Doan et al., 2004).

As folhas de *Gentiana lutea* (Gentianaceae) são ricas em xantonas C-glicosídeos, como a mangiferina, na fase de floração, enquanto xantonas O-glicosídeos, como a isoorientina, são acumulados principalmente antes do desenvolvimento das flores (Menkovic et al., 2000).

Hogedal et al. (2000) observaram que em *Antirrhinum majus* (Scrophulariaceae) no período de floração, a quantidade de iridóides nas folhas é menor do que nas flores e, durante a frutificação, foi observada maior concentração de iridóides nos frutos em comparação com as folhas.

Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos, tais como óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonóides e alcalóides (Hartmann, 1996).

Sabendo-se dos fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, fica clara a necessidade de estudos visando detectar as condições de coleta que

conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

1.2 Alcalóides

Dentro do grupo de metabólitos secundários são encontrados os alcalóides, que são continuamente estudados devido ao elevado número de atividades biológicas a eles atribuídas. Essa classe de compostos é famosa pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos. Já na antiguidade há referência ao uso dessa classe de compostos. Talvez o caso mais famoso seja a execução do filósofo grego Sócrates, condenado a ingerir cicuta (*Conium maculatum*), uma fonte do alcalóide coniina (Figura 2). Os romanos também faziam uso de alcalóides em homicídios. Os principais alcalóides em questão eram a hiosciamina, a atropina e a beladonina, todos derivados de *Atropa belladonna*. Tal uso fez com que mais tarde essa e outras plantas da família solanaceae fossem conhecidas na Europa como “plantas da sombra da noite” ou “night shade” (Peres, 2004).

Dentre eles destacam-se a morfina (hipnoanalésico), usada em pacientes com câncer em fase terminal, a colchicina, utilizada no tratamento da gota, a quinina, como antimalárico, a teobromina e teofilina como diuréticos (Henriques et al., 1999).

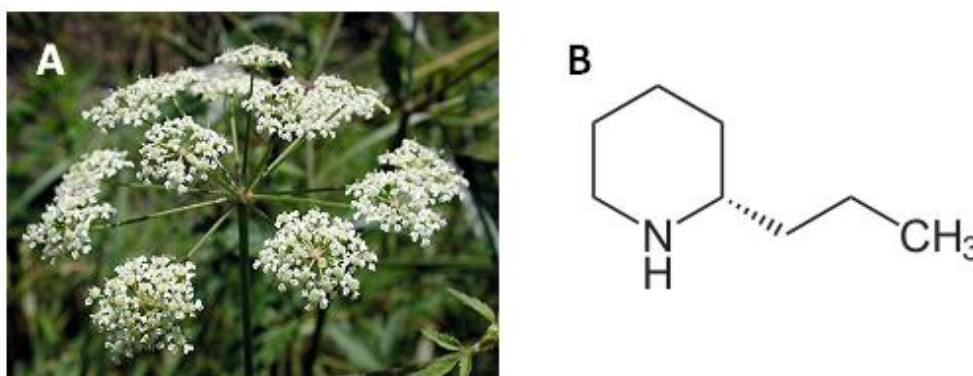


Fig.2. A- *Conium maculatum* (cicuta). B- Alcalóide coniina (causadora da morte de Sócrates).

Fonte: [homepage. mac.com/.../Conium_maculatum_t.jpg](http://homepage.mac.com/.../Conium_maculatum_t.jpg).

Nas plantas, os alcalóides possuem um comprovado papel na defesa contra a invasão de microrganismos. Esta função pode ser exemplificada pelo aumento da concentração de solanina em batatas quando estas são atacadas por microrganismos (Simões et al., 2001).

Os alcalóides (Figura 3), que são derivados de aminoácidos e apresentam um anel heterocíclico com o nitrogênio, são considerados verdadeiros, como por exemplo a quinina (Figura 3). Alcalóides em que o nitrogênio, derivado de um aminoácido, não apresenta anel heterocíclico são considerados protoalcalóides, como exemplo a mescalina. Compostos heterocíclicos nitrogenados que não são derivados de aminoácidos são considerados pseudoalcalóides, como por exemplo a coniina (Dewick, 2002).

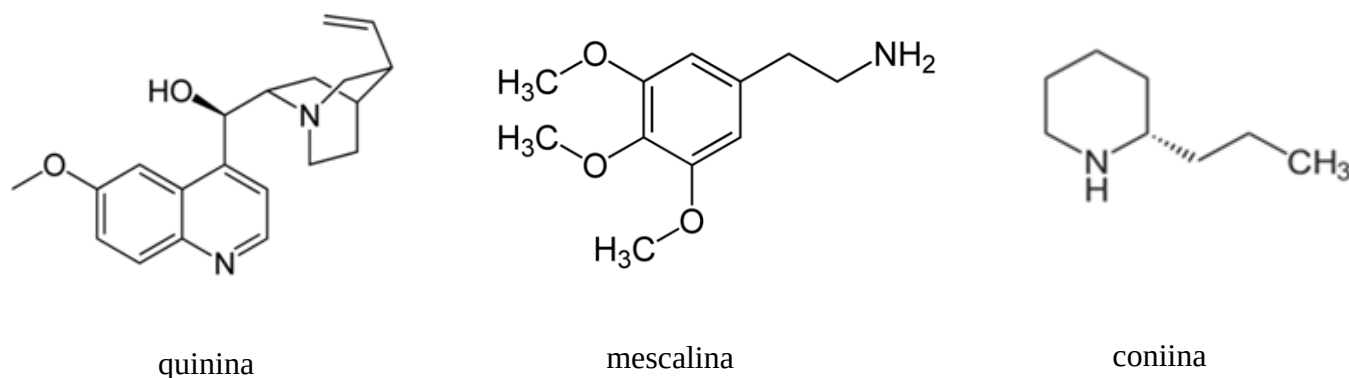


Fig.3. Alcalóides verdadeiros (quinina), protoalcalóides (mescalina) e pseudoalcalóides (Coniina).

Na família Fabaceae ocorrem várias classes de alcalóides como os diterpênicos, indólicos, quinolizidínicos, pirrolizidínicos, isoquinolínicos, piperidínicos, piridínicos, ou mistos (Smolenski & Kinghorn, 1981).

Diversos alcalóides com importância farmacológica foram isolados de diferentes órgãos de plantas da família Fabaceae, como por exemplo a fisostigmina (alcalóide indólico) isolado das sementes de *Physostigma venenosum*, é utilizado como protótipo de inseticidas e inibidor da acetilcolinesterase (AChE), a esparteína (alcalóide quinolizidínico) é isolado de todos os órgãos de *Cytisus scoparius*, e é utilizada nas perturbações da atividade cardíaca e

circulação, a acosmina (alcalóide quinolizidínico) é extraído das raízes de *Acosmium subelegans*, e é utilizado no combate a enxaqueca, asma e perturbações neurológicas, a spectralina (alcalóide piperidínico) é extraído da flores de *Senna spectabilis*, possui ação citotóxica contra fungos e é inibidor da AChE (Sriphong et al., 2003).

Relatos sobre alcalóides piridínicos mostraram que possuem importantes atividades biológicas. Dentre eles, a nicotina, a gentianina e a anabasina (Figura 4), utilizados como inseticidas durante a primeira metade do século XX (Viegas, 2003). A partir de extratos de raízes de *Mallotus apelta*, são obtidos alcalóides piridínicos que mostraram uma atividade significativa anti-HIV (Cheng et al., 1998). Em *Senna spectabilis*, foram encontrados alcalóides piridínicos e piperidínicos dotados de cadeia alifática longa, com atividade citotóxica (Sriphong et al., 2003).

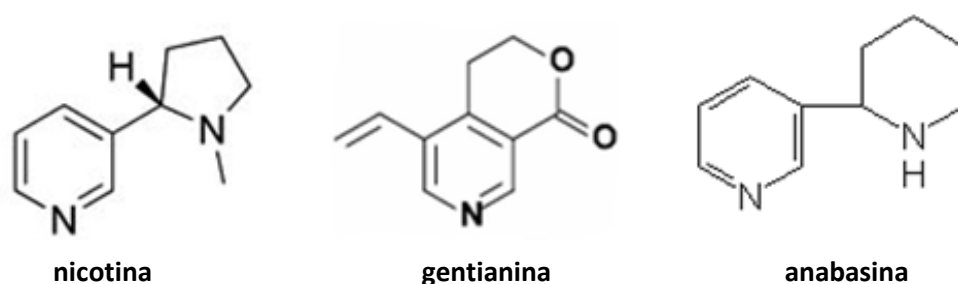


Fig.4. Exemplos de alcalóides piridínicos isolados de plantas.

1.2.1 Biossíntese de alcalóides piridínicos

Os alcalóides piridínicos e piperidínicos podem ser originados através de diversas rotas metabólicas, dentre as quais uma que parte da lisina. Outra via parte de quatro resíduos do acetato, formando um policetoácido que, através da redução, transaminação e ciclização, origina o núcleo piperidina. Ainda há possibilidade da biossíntese do núcleo piridina ocorrer, partindo do glicerol e do ácido aspártico, tendo o ácido nicotínico como intermediário (Simões et al. 2003).

Em plantas, o ácido nicotínico é formado a partir do triptofano (L-Try) ou do ácido aspártico (L-Asp) e dão origem aos alcalóides piridínicos (Zheng e Ashihara, 2004).

Em um estudo realizado por Mazzafera (2004), o alcalóide piridínico “trigonelina”, isolado de *Trigonella foenum-graecum* (Fabaceae) é sintetizado pela reação de uma etapa a partir do ácido nicotínico, fornecido pelo ciclo NAD. No entanto, a produção direta de trigonelina, a partir do ácido quinolínico pode ser uma caminho alternativo ao do ácido nicotínico. Em plantas utilizadas como chá, foi observado que o ácido nicotínico é convertido em glicosídeo do ácido nicotínico, mas não em trigonelina.

Segundo Hibi et al. (1994), a via biossintética para alcalóides tropânicos e piridínicos compartilha um metabolismo de poliaminas durante os primeiros passos da biossíntese, sendo que a putrescina seria o precursor comum dessas poliaminas.

Häkkinen et al. (2007), descreveram que a origem biossintética da nicotina, alcalóide piridínico de *Nicotiana tabacum* começa com a poliamina putrescina, que pode ser formada diretamente pela descarboxilação da ornitina ou indiretamente a partir da arginina em uma reação iniciada também por uma descarboxilase (Figura 5). A putrescina no tabaco pode servir como um precursor na biossíntese de poliaminas ou pode ser convertida em *N*-metilputrescina pela ação da putrescina *N*-metiltransferase (PMT), a primeira etapa na biossíntese de nicotina (Hashimoto e Yamada, 1994).

Em um trabalho realizado recentemente por Serrano et al. (2010), foram identificados dois alcalóides piridínicos (7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona) isolados das folhas de *Senna multijuga* (Figura 6), com estruturas moleculares que ainda não haviam sido descritas na literatura. Estes alcalóides apresentam um grande potencial com relação a novas substâncias bioativas, como por exemplo a atividade inibitória da acetilcolinesterase, que está envolvida na Doença de Alzheimer e miastenia grave e, ainda, atividade contra fungos fitopatogênicos, como *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (Viegas et al., 2004).

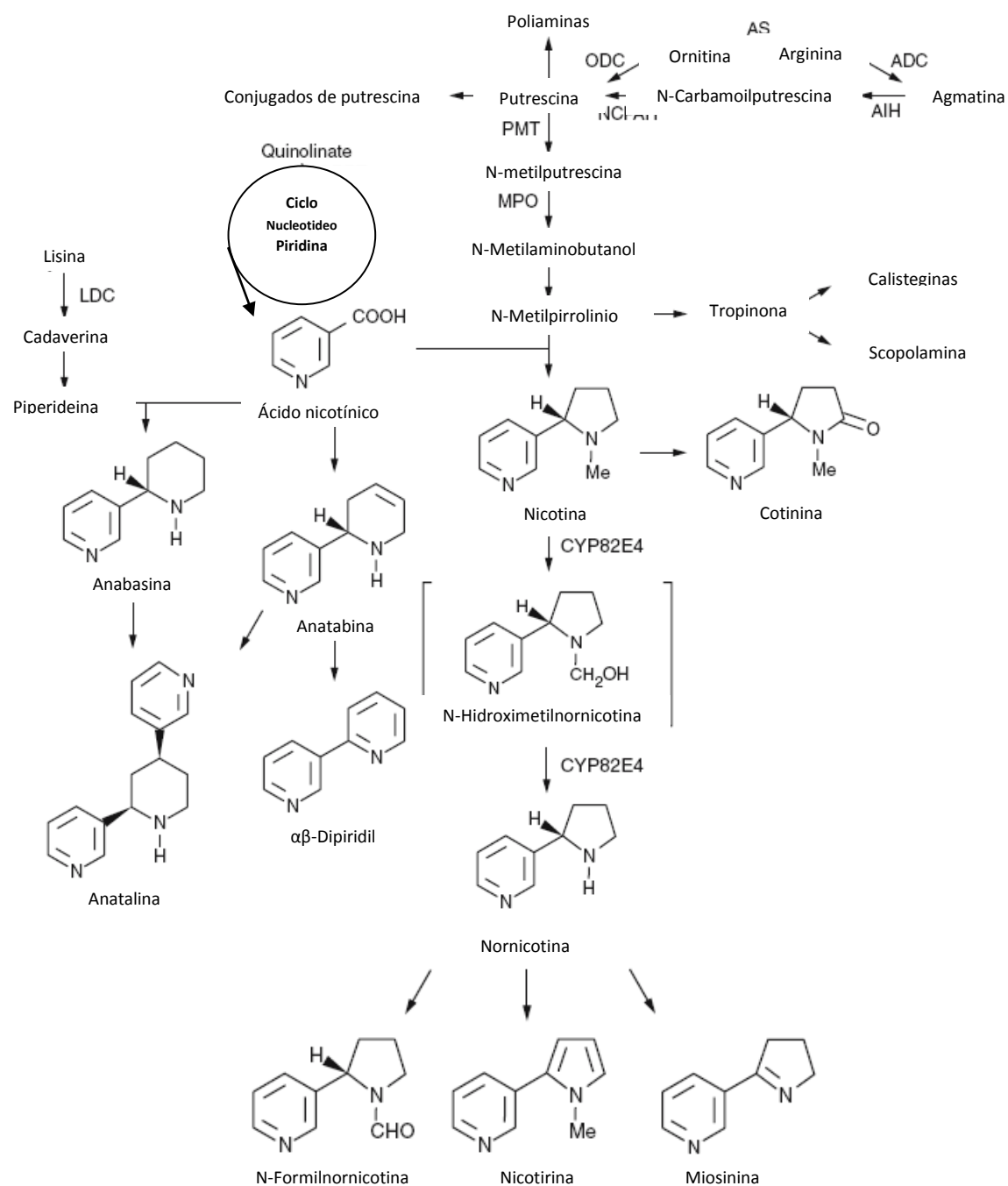


Fig.5. Estrutura e biossíntese de alcalóides piridínicos em *Nicotiana tabacum*. Enzimas listados: ADC (arginina descarboxilase), AIH (agmatina deiminase), AP (aspartato oxidase), AS (arginase) CYP82E4 (N-nicotina demetilase), PMA (lisina descarboxilase), MPO (metilputrescina oxidase), NCPAH (N-carbamoilputrescina amidohidrolase), ODC (ornitina descarboxilase), PMT (N-putrescina metiltransferase), QPRTase (quinolinato fosforibosiltransferase).

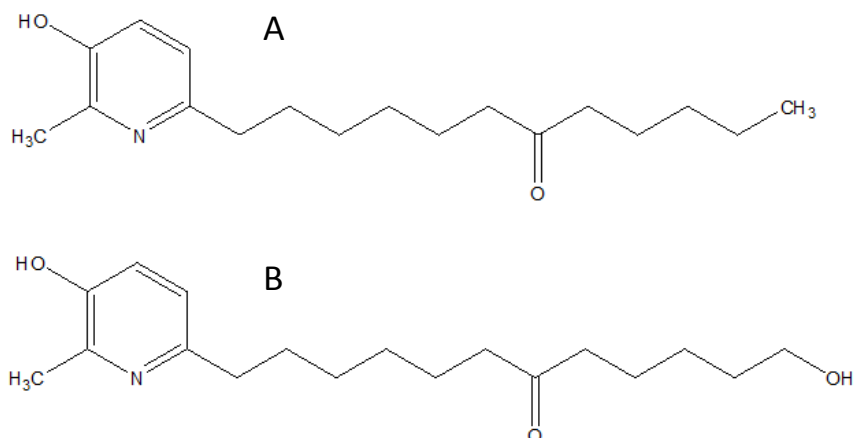


Fig.6. Alcalóides piridínicos isolados das folhas de *Senna multijuga*. A) 7'-multijuguinona. B) 12'-hidroxi-7'-multijuguinona. (Serrano et al., 2010).

1.3 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) foi descrita pela primeira vez na literatura pelo psiquiatra alemão Alois Alzheimer em 1907. Alzheimer, após a autópsia de centenas de cérebros observou que em grande parte de suas análises havia diminuição da massa encefálica, além de manchas escuras e aglomerados fibrilares (Sugimoto et al., 2002). A DA é conhecida erroneamente por “esclerose”, muitos a definem como “mal do século” ou “epidemia silenciosa”, é uma doença pouco divulgada apesar do impacto social gerado, pois, causa grandes modificações nas vidas dos pacientes e de seus familiares. Os mais modernos medicamentos utilizados para tratar os sintomas da DA, baseiam-se em elevar os níveis de acetilcolina inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina. Ensaios desenvolvidos para detectar substâncias capazes de inibir a AChE, estão sendo amplamente utilizados para avaliar um grande número de extratos obtidos de plantas medicinais utilizadas popularmente para melhorar a memória.

Embora não haja cura para essa doença, várias evidências mostraram que inibidores da AChE (Figura 7) ainda são as melhores opções no tratamento sintomático interferindo na progressão da doença (Sugimoto et al., 2002).

A necessidade de novas substâncias tem estimulado a pesquisa pelo desenvolvimento de fármacos que atuem como inibidores enzimáticos (Copeland, 2005), sendo a triagem de substâncias ou compostos capazes de se ligarem à AChE, torna-se interessante para a indústria farmacêutica.

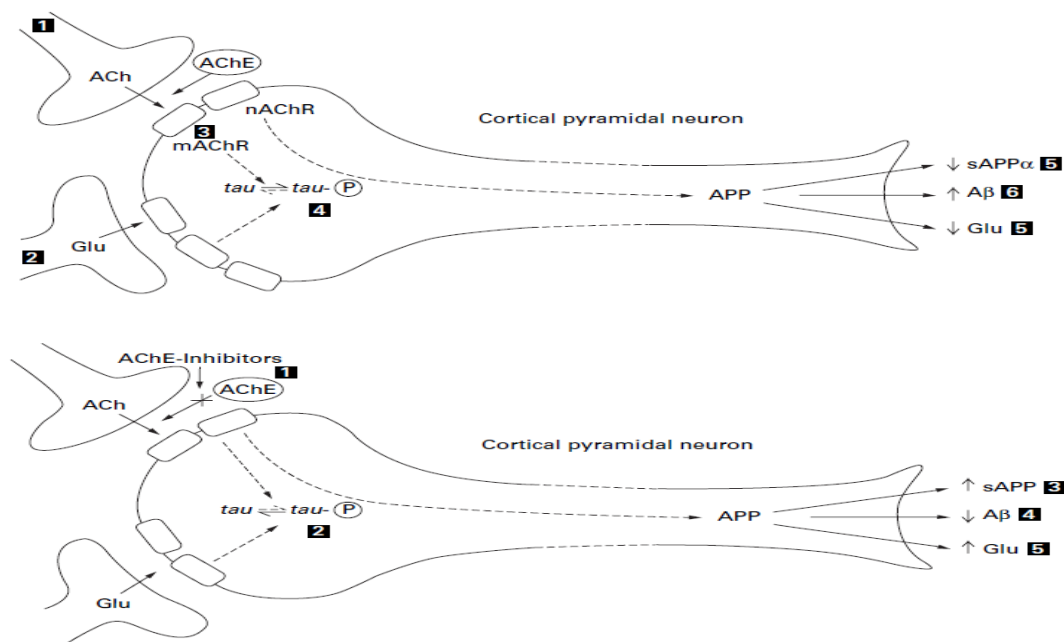


Fig.7. Mecanismo de ação de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE).

1.4 Generalidades sobre a família Fabaceae

A família Fabaceae (Leguminosae), uma das maiores dentre as dicotiledôneas, constitui o elemento principal de muitos tipos de vegetação em várias regiões do mundo, dos picos das serras montanhosas até o litoral arenoso, e da floresta úmida tropical até desertos, havendo até espécies aquáticas. Nos gêneros com numerosos representantes, muitas espécies são elementos característicos de vegetação aberta e perturbada, por serem bem adaptadas à primeira colonização e exploração de tais ambientes devido, em parte, às suas associações com bactérias fixadoras de nitrogênio ou com ectomicorrizas (Lewis, 1987).

Polhill & Raven (1981), mostraram que a família sofreu várias mudanças taxonômicas ao longo do tempo em nível de gênero e de tribo, ainda que as três subfamílias geralmente

reconhecidas tenham sido mantidas: Caesalpinioideae (5 tribos, 152 gêneros), Mimosoideae (5 tribos, 63 gêneros) e Faboideae (31 tribos, 443 gêneros).

Segundo a revisão feita por Irwin & Barneby (1982), na subfamília Caesalpinioideae, a tribo Cassieae, subtribo Cassiinae, compreende 3 gêneros: *Chamaecrista*, *Cassia* e *Senna*.

Revisões na classificação botânica dos gêneros *Cassia* e *Senna* levaram à transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*. Espécies de *Cassia*, juntamente com aquelas com sinonímia *Senna* ou com algumas que mudaram para o grupo *Senna*, constituem um dos maiores gêneros da família Fabaceae (Viegas et al., 2006)

O gênero *Senna* compreende cerca de 200 espécies, como *S. alata*, *S. martiana*, *S. reticulata*, *S. spectabilis* e *S. multijuga* (Irwin & Barneby, 1982)

1.5 *Senna multijuga*

Senna multijuga (Rich.) Irwin et Barn. (Figura 8), sinonímia botânica *Cassia multijuga* Rich., popularmente é conhecida como pau-cigarra, caquera, aleluia e canafístula (Lorenzi, 1992). *S. multijuga* é uma espécie caducifólia, com 2 a 10 metros de altura e 20 a 30 cm de espessura, podendo atingir até 20 metros de altura e 60 cm de espessura, na idade adulta. Apresenta tronco curto, reto e levemente tortuoso. Sua ramificação é irregular e estendida, com copa baixa, arredondada e irregular. As folhas são compostas, com ráquis de até 30 cm ou mais de comprimento, com 18 a 44 pares de folíolos opostos, curto-peciolados, oblongos. As flores são hermafroditas e possuem tom amarelo-vivo, perfumadas, com 4 cm de diâmetro, reunidas em panícula terminal múltipla de até 30 cm de comprimento, revestindo inteiramente a copa. O fruto é um legume reto, achatado lateralmente, castanho escuro, deiscente, marginado, com 9 a 18 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura e numerosas lâminas transversais, contendo 20 a 32 sementes. A semente é plana, lustrosa, compressa, unisseriada, de coloração pardo-esverdeada, com 5 a 8 mm de comprimento por 1,0 a 1,5 mm de largura (Carvalho, 2004).

S. multijuga pode ser encontrada em diversos países da América do Sul (Irwin & Barneby, 1982), sendo que no Brasil, ocorre principalmente em regiões de Mata Atlântica (Figura 9). Ela é muito utilizada para reflorestamento em áreas degradadas, possuindo grande potencial de adaptação em ambientes diferentes (Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994).

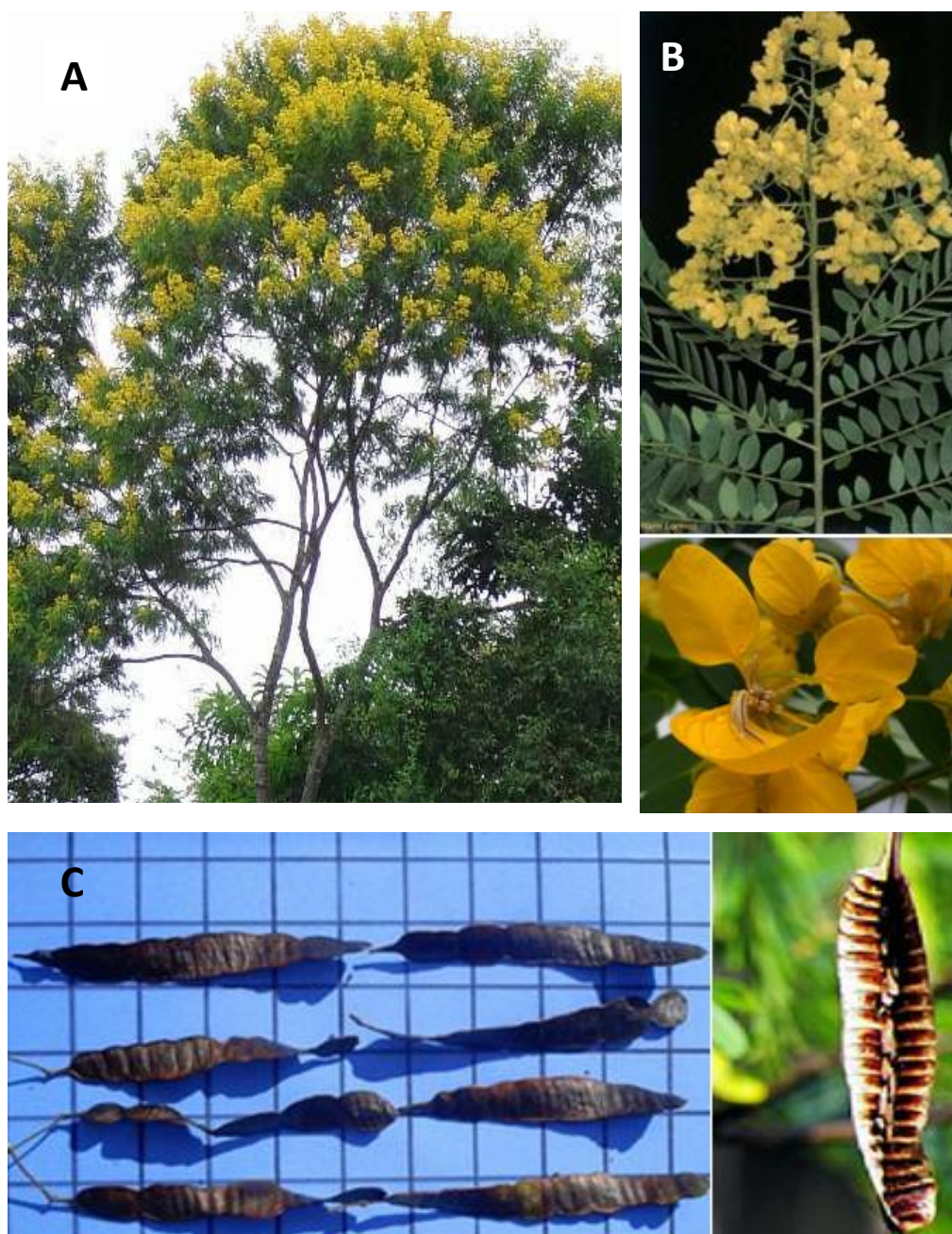


Fig.8. *Senna multijuga*: **A-** Aspecto geral de um indivíduo adulto em época de inflorescência. **B-** Ramo florido e destaque da flor. **C-** Frutos maduros e um exemplar aberto mostrando as sementes.

Fonte: The Virtual Field Herbarium/Leguminosae: www.herbaria.plants.ox.ac.uk, <http://flickr.com/photos/Senna>

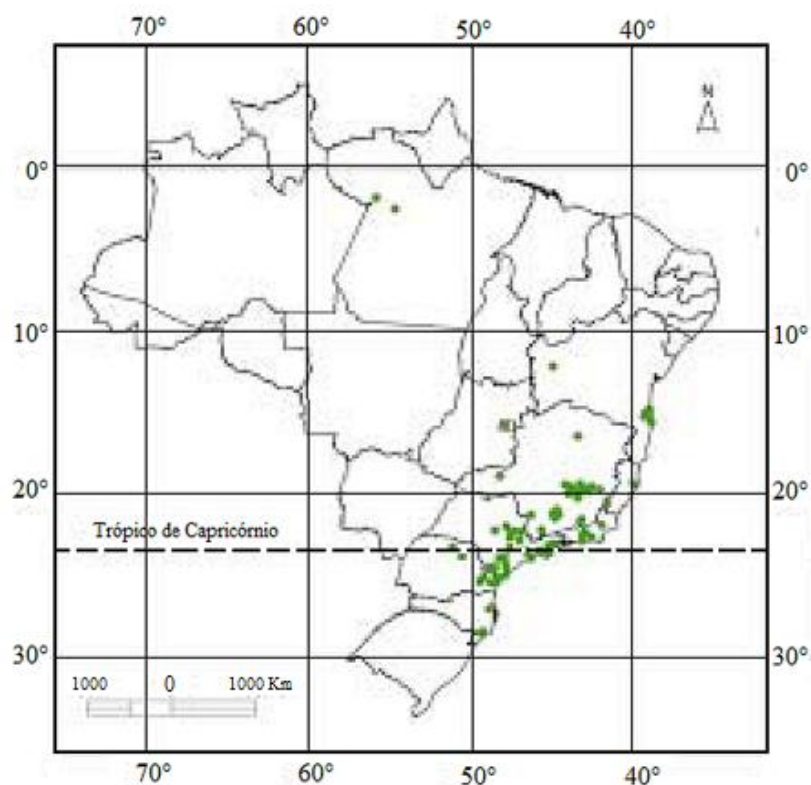


Fig.9. Ocorrência natural de *Senna multijuga* no Brasil. Fonte: Circular Técnica da EMBRAPA (2004).

1.6 Cultura *in vitro* e produção de metabólitos secundários

A grande maioria das plantas medicinais é coletada em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade não são suficientes para atender uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem diversos usos (Pereira, 2003).

Como um sistema experimental, a cultura de células de plantas fornece uma série de vantagens sobre os estudos com plantas íntegras, incluindo a geração de material necessário para os estudos em torno de um ano, células indiferenciadas, estado de desenvolvimento das células relativamente uniforme, ausência da interferência de microrganismos; e mais importante, o ciclo vegetativo reduzido (Croteau et al., 2000).

A germinação de sementes de algumas espécies medicinais pode aumentar muito quando são utilizados métodos de cultura de tecidos, principalmente quando as sementes

apresentam dormência, endosperma reduzido, ou grande infestação de microorganismos (Fay, 1992).

Mais de 100.000 compostos secundários de plantas já foram isolados e identificados, e a cada ano centenas de novas descobertas tem aumentado esse número (Verpoorte et al., 1998). Nesse contexto, a produção de metabólitos secundários pode variar, aumentando ou diminuindo, dependendo da composição do meio de cultura, principalmente quando se modifica a concentração e natureza de compostos com nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, reguladores de crescimento e fonte de carbono ou ainda quando é adicionado ao meio substâncias que interferem na rota metabólica do composto de interesse (Pereira, 2003).

Uma classe de substâncias importantes do ponto de vista farmacológico são os alcalóides indólicos como a ajmalicina, serpentina e reserpina que são acumulados principalmente em espécies do gênero *Rauwolfia*. Estudos com *R. sellowi* mostraram que cultura de células em suspensão foram capazes de acumular no final do estágio de crescimento os alcalóides que são encontrados na planta intacta, sendo a “sellowina” encontrada como composto majoritário nas células cultivadas *in vitro* (Rech et al., 1998). Ensaio de cultura *in vitro* com *Senna multijuga* podem auxiliar a estabelecer condições visando melhorar o rendimento dos alcalóides piridínicos.

2. OBJETIVO GERAL

- Analisar a distribuição e o teor de alcalóides piridínicos em diferentes fases fenológicas de *Senna multijuga*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os teores dos alcalóides piridínicos 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona em indivíduos adultos de *Senna multijuga*;
- Comparar os teores desses alcalóides em folhas, galhos, flores, frutos verdes e maduros de *Senna multijuga*;
- Avaliar o teor desses alcalóides nas fases iniciais de crescimento das plantas;
- Avaliar a atividade anticolinesterásica das frações alcaloídicas obtidas;
- Realizar ensaios de cultura *in vitro* visando um maior rendimento de alcalóides piridínicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Folhas, ramos caulinares sem folhas, flores e frutos foram coletados de quatro indivíduos adultos de *Senna multijuga* ocorrentes em áreas do Instituto de Botânica e da Secretaria da Agricultura e Abastecimento, em São Paulo (Figura 10). Os indivíduos foram marcados como Indivíduo nº1, nº2, nº3 e nº4, respectivamente. Uma amostra do indivíduo 1 (Silva-196) foi coletada, e está depositada no Herbário Maria Eneida P. K. Fidalgo (SP).

Para a obtenção das sementes, frutos maduros foram colhidos diretamente das árvores e alguns coletados no chão após a queda. Em seguida foram deixados ao sol para secar e facilitar a abertura e a liberação manual das sementes (Lorenzi, 1992).



Fig.10. Vista aérea da área de coleta dos indivíduos de *S. multijuga*. Fonte: Google Maps.

3.1.1 Desenvolvimento das plântulas

Para a germinação de sementes de *S. multijuga* foi empregado o protocolo de Ferreira et al. (2004). As sementes (Figura 11) foram imersas em água quente (100°C) por 10 segundos para quebrar a dormência e, posteriormente, colocadas para germinar em bandejas contendo substrato organo-arenoso, sendo cobertas com uma leve camada de substrato peneirado e mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Após este período as mudas foram transplantadas para vasos individuais.



Fig.11. Sementes maduras de *S. multijuga* .

3.1.2 Coleta de material nas fases fenológicas

A coleta dos órgãos disponíveis de cada indivíduo de *Senna multijuga*, foi realizada em diferentes fases fenológicas, por dois anos consecutivos (2007 e 2008), conforme mostrado nas Tabelas I e II. A coleta dos diferentes órgãos da planta foi feita no período da manhã, por volta das oito horas, pois estudos realizados por Martins et al. (1995) e Itenov et al. (1999) relataram que as concentrações de substâncias ativas de plantas variam segundo os

períodos do dia, sendo que os alcalóides aparecem em maior concentração no período da manhã. Dados mensais de temperatura (média, máxima e mínima), de precipitação e irradiação solar foram obtidos do Instituto Astronômico e Geofísico da USP, a partir das medidas diárias obtidas na estação localizada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, portanto próxima às áreas em que crescem as plantas.

Tabela I – Dados de coletas de órgãos de *Senna multijuga* realizadas em diferentes fases fenológicas, no ano de 2007.

Nº Ind.	Data de coleta	Fase fenológica	Órgãos disponíveis						OBS
			Folhas	Galhos	Flores	Frutos verdes	Frutos maduros	Sementes	
01	13/02/2007	Floração	X	X	X				
02	13/02/2007	Floração	X	X	X				
03	13/02/2007	Floração	X	X	X				
04	13/02/2007	Floração	X	X	X				
01	18/04/2007	Frutificação	X	X		X	X	X	Frutos maduros coletados em 29/05/2007
02	18/04/2007	Frutificação	X	X		X	X	X	
03	18/04/2007	Frutificação	X	X		X	X	X	
04	18/04/2007	Frutificação	X	X		X	X	X	
01	21/08/2007	Dormência		X					
02	21/08/2007	Dormência		X					
03	21/08/2007	Dormência		X					
04	21/08/2007	Dormência		X					
01	27/11/2007	Brotação	X	X					
02	27/11/2007	Brotação	X	X					
03	27/11/2007	Brotação	X	X					
04	27/11/2007	Brotação	X	X					

Tabela II – Dados de coletas de órgãos de *Senna multijuga* realizadas em diferentes fases fenológicas, no ano de 2008.

Nº Ind.	Data de coleta	Fase fenológica	Órgãos disponíveis						OBS
			Folhas	Galhos	Flores	Frutos verdes	Frutos maduros	Sementes	
01	07/03/2008	Floração	X	X	X				
02	07/03/2008	Floração	X	X	X				
03	07/03/2008	Floração	X	X	X				
04	07/03/2008	Floração	X	X	X				
01	17/04/2008	Frutificação	X	X		X	X	X	Frutos maduros coletados Em 26/05/2008
02	17/04/2008	Frutificação	X	X		X	X	X	
03	17/04/2008	Frutificação	X	X		X	X	X	
04	17/04/2008	Frutificação	X	X		X	X	X	
01	22/08/2008	Dormência		X					
02	22/08/2008	Dormência		X					
03	22/08/2008	Dormência		X					
04	22/08/2008	Dormência		X					
01	25/11/2008	Brotação	X	X					
02	25/11/2008	Brotação	X	X					
03	25/11/2008	Brotação	X	X					
04	25/11/2008	Brotação	X	X					

3.2 Preparo do extrato bruto etanólico e extração da fração alcaloídica

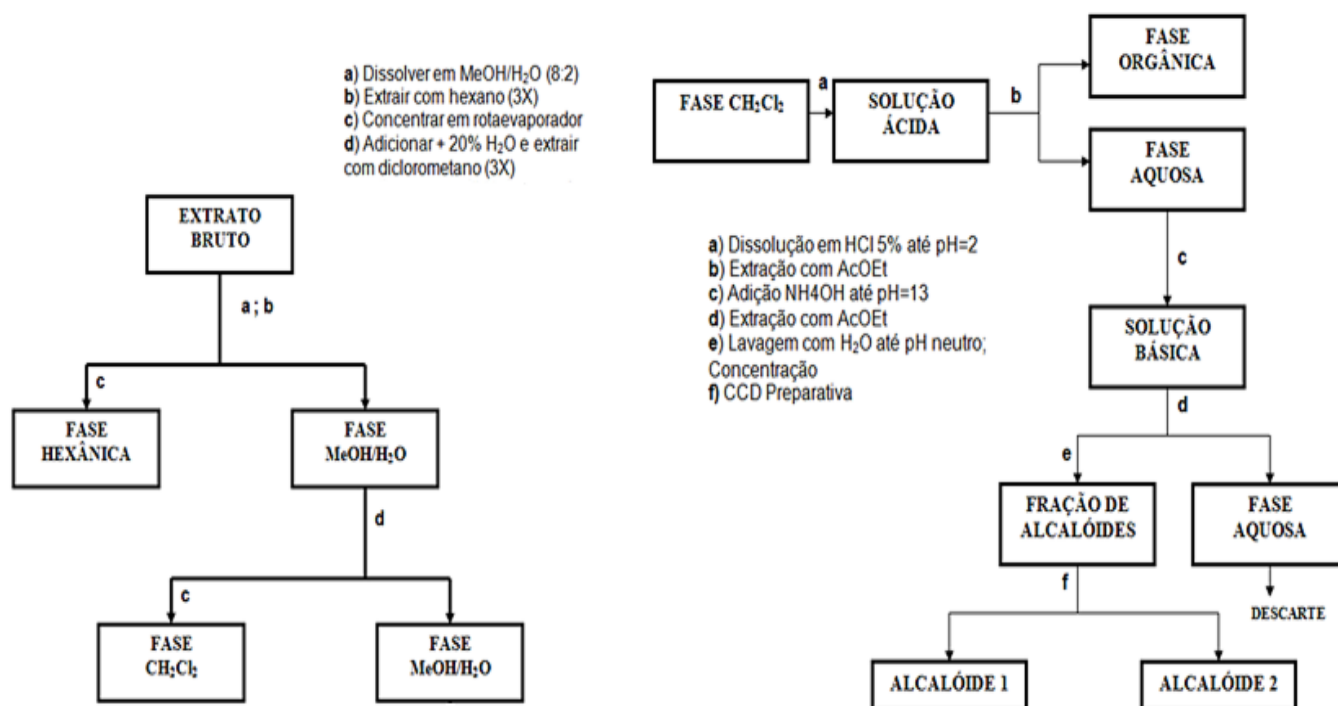
Para um melhor rendimento do extrato bruto etanólico dos diferentes órgãos da planta, o material vegetal pulverizado (100g para cada órgão) foi submetido à extração em extrator automático ASE 300 Dionex (Figura 12). Outras técnicas para se obter extrato bruto das plantas foram realizadas, como a maceração e o ultrassom, mas a utilização do extrator automático ASE300 mostrou resultados superiores, comparado a essas técnicas. A melhor condição estabelecida foi de 60° C por 15min, condição esta que não altera as propriedades químicas e bioativas dos alcalóides piridínicos de *Senna multijuga*. Para a obtenção da fração bruta de alcalóides, foram utilizados dois protocolos de extração ácido-base, sendo o primeiro empregado por Serrano (2006) e o segundo empregado por Sriphong et al. (2003).



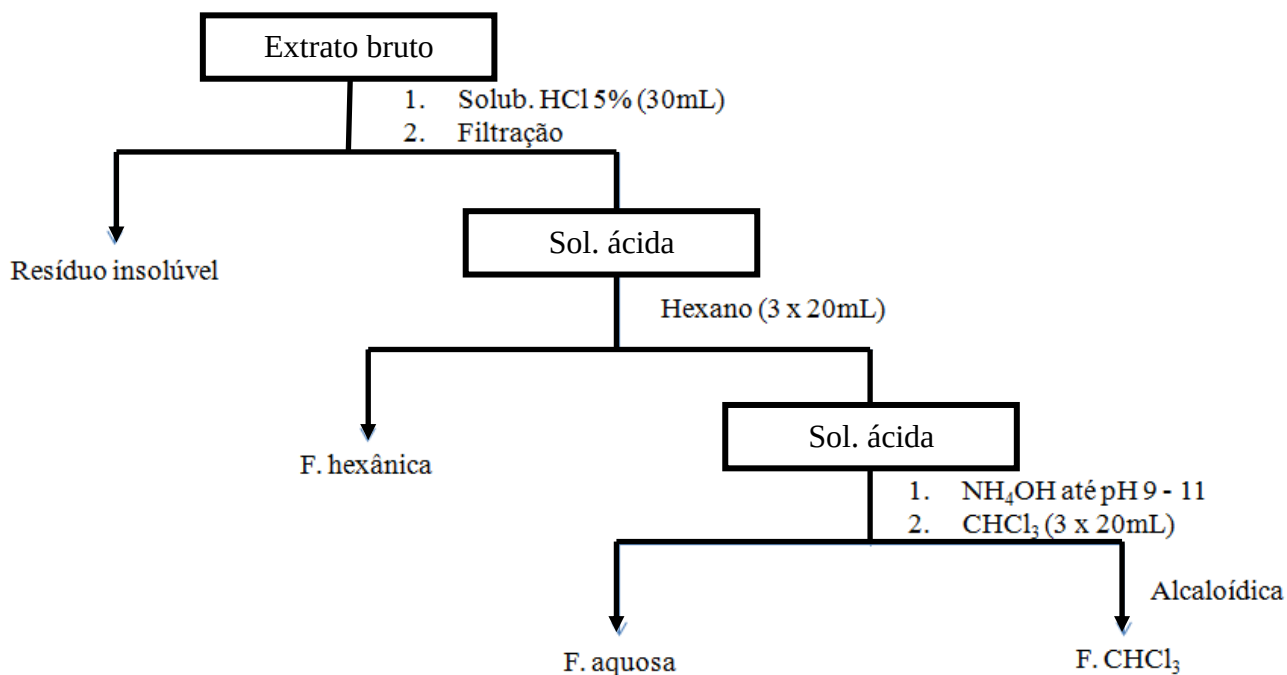
Fig.12. Foto do extrator automático ASE 300 Dionex.

Segundo o protocolo de Serrano (2006), o extrato bruto etanólico após ser concentrado em evaporador rotatório, foi redissolvido em metanol/água (8:2) e particionado sucessivamente com hexano, diclorometano e acetato de etila. Após concentração das frações em evaporador rotatório, a fração solúvel em diclorometano foi tratada com ácido clorídrico

5% em água até pH2 (3x50ml). O pH da fração aquosa foi ajustado entre 12 e 13, usando hidróxido de amônia concentrado. A solução básica resultante foi exaustivamente extraída com acetato de etila, seguida de lavagem com água até pH neutro. A solução obtida foi novamente concentrada, obtendo-se assim a fração bruta de alcalóides (Fluxograma 1). No protocolo de Sriphong et al. (2003), o extrato bruto é dissolvido em solução aquosa ácida a 5%, filtrados e particionados com hexano. Em seguida a solução ácida foi basificada com hidróxido de amônia até pH 13, e particionada com clorofórmio para fornecer a fração alcaloídica (Fluxograma 2).



Fluxograma 1. Extração ácido-base, segundo Serrano (2006)



Fluxograma 2. Extração ácido-base, segundo Sripthong et al. (2003)

3.3 Análises cromatográficas

3.3.1 Purificação da fração alcalóides totais por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As frações brutas de alcalóides obtidas foram submetidas à purificação por cromatografia de camada delgada preparativa de sílica PF₂₅₄ (0,5 mm de espessura, placa de vidro 20 x 20cm, Merck). O sistema de solventes utilizado como fase móvel foi clorofórmio / metanol / hidróxido de amônia (90:7,5:2,5). Após o desenvolvimento das placas os cromatogramas foram examinados sob luz ultravioleta (UV) λ 254 nm, λ 366 nm e as 4 faixas observadas foram marcadas e separadas por processo de raspagem. As sub-frações foram filtradas em funil de placa porosa (diâmetro do poro da placa, 40 nm), o solvente evaporado e

as frações secas e pesadas para cálculo de rendimento e ensaios de atividade anticolinesterásica.

3.3.2 Ensaios para detecção de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE).

A fração alcaloídica foi dissolvida em acetato de etila (10mg/mL). Uma amostra de 30ug (3 µL) da fração foi aplicada em CCD de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, MERCK). A placa foi desenvolvida com clorofórmio / metanol / hidróxido de amônia (36:3:1), e a seguir, borrifada com uma solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) (Solução A) e o solvente evaporado. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a Solução D (Marston *et al.*, 2002). A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os resultados foram observados e fotografados em câmera fotográfica Epson. Soluções:

Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto nº C2880) dissolvida em 1 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7,8), a solução estoque é armazenada a 4 °C, no momento do uso, prepara-se uma solução de acetilcolinesterase 6,66 U acrescida de 0,1% de albumina de soro bovino fração V.

Solução B: 25 mg de acetato de 1-naftil em 10 mL de etanol;

Solução C: 100 mg do sal Fast Blue B em 40 mL de água destilada;

Solução D: mistura de 10 mL da solução B + 40 mL da solução C.

3.3.3 Análise quantitativa de alcalóides piridínicos

As frações alcaloídicas purificados por CCDP foram analisados em cromatógrafo a gás Varian Chrompack CP-3380, com detector de ionização de chama (FID), gás de arraste Hélio, e coluna Supelco SPB-1 (30m X 0,25mm), injeção de 1µL, e concentração da amostra 4,0mg/mL em acetato de etila. Condições de corrida: injetor a 200°C, detector a 300°C, temperatura inicial 100°C por 1 minuto aumentando 5°C por minuto até 300°C permanecendo nesta temperatura por 2 minutos, tempo total de corrida 40min. Para quantificar os alcalóides, foi utilizado como padrão interno (PI) a “espectralina” (alcalóide piperidínico obtido de *Senna spectabilis*), na concentração de 4,0mg/mL, cedido pelo grupo de pesquisa do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.3.3.1 Preparo das amostras com padrão interno

Em um volume de 50µL de solução da fração de alcalóides de *S. multijuga*, na concentração de 4mg/mL em acetato de etila, foram adicionadas mais 50µL da solução com o padrão interno spectralina (PI), isolado das flores de *Senna spectabilis*, também na concentração de 4mg/mL, obtendo-se um volume final de 100µL. As amostras foram filtradas utilizando um sistema constituído de seringa adaptada com uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), diâmetro de poro de 0,45 µm da marca Gelman. O filtrado foi coletado em frasco de 1,5 mL e submetido à análise.

3.3.3.2 Curva de calibração

Seis concentrações das soluções padrão foram utilizadas na construção da curva de calibração (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mg/mL), sendo que para o alcalóide 7'-multijuguinona

foram injetadas amostras em triplicata e para o alcalóide 12'-hidroxi-7'-multijuguinona, as injeções foram feitas em quadruplicata. Spectalina (PI) foi injetada na concentração de 4mg/mL. (Tabela III e IV).

3.3.3.3 Análise qualitativa de alcalóides piridínicos

As frações de alcalóides purificados por CCDP, também foram analisadas em sistema hifenado CG/EM, equipamento da série Agilent (Agilent 6890 CG system) com injetor automático (Agilent 7683) e detector seletivo de massas (Agilent 5973 network), nas seguintes condições: injetor a 200°C, detector a 300°C, temperatura inicial 100°C por 1 minuto aumentando 5°C por minuto até 300°C permanecendo nesta temperatura por 2 minutos.

TABELA III (Curva de calibração CG/FID)

Padrão Interno (PI) = Spectalina (4mg/mL)

Amostra = 7'-multijuguinona (7'mna)

Concentração (mg/ml)	n° de injeções	Retenção (min)	Área do pico (7'mna)	Área do pico (PI)	Razões de área Rz (A) área A / área PI	Média de área Rz (A)
5.0	01	13.281	1.211.359	976.588	1.240	1.246
	02	13.230	1.236.235	991.667	1.246	
	03	13.278	1.207.881	964.140	1.252	
4.0	01	13.224	901.213	954.522	0.944	0.972
	02	13.271	981.436	1.014.230	0.967	
	03	13.215	992.155	985.740	1.006	
3.0	01	13.268	734.252	962.877	0.762	0.743
	02	13.271	682.466	955.320	0.714	
	03	13.275	688.239	912.201	0.754	
2.0	01	13.262	449.455	971.448	0.462	0.497
	02	13.202	495.866	958.447	0.517	
	03	13.295	478.913	933.440	0.513	
1.0	01	13.279	281.945	1.056.884	0.266	0.244
	02	13.268	212.103	987.239	0.214	
	03	13.261	264.122	1.045.546	0.252	
0.5	01	13.253	118.258	901.366	0.131	0.120
	02	13.250	102.885	924.355	0.111	
	03	13.230	108.769	905.663	0.120	

TABELA IV (Curva de calibração CG/FID)

Padrão Interno (PI) = Spectalina (4mg/mL)

Amostra = 12'-hidroxi-7'-multijuguinona (12'mna)

Concentração (mg/ml)	n° de injeções	Retenção (min)	Área do pico (12'mna)	Área do pico (PI)	Razões de área Rz (A) área A / área PI	Média de área Rz (A)
5.0	01	13.781	1.189.455	993.741	1.196	1.235
	02	13.730	1.311.082	1.121.756	1.168	
	03	13.778	1.232.106	952.073	1.294	
	04	13.797	1.214.501	947.036	1.282	
4.0	01	13.724	885.933	1.066.533	1.066	0.950
	02	13.771	988.547	1.121.882	0.881	
	03	13.715	924.977	958.430	0.965	
	04	13.712	826.663	929.894	0.888	
3.0	01	13.768	640.922	966.330	0.663	0.720
	02	13.771	775.856	1.010.675	0.767	
	03	13.775	669.454	914.808	0.731	
	04	13.741	799.901	1.097.441	0.719	
2.0	01	13.762	402.655	936.775	0.429	0.478
	02	13.702	486.931	924.078	0.526	
	03	13.795	409.722	983.102	0.416	
	04	13.766	488.210	901.442	0.541	
1.0	01	13.779	247.956	1.033.044	0.240	0.264
	02	13.768	218.886	915.221	0.239	
	03	13.761	271.372	931.799	0.291	
	04	13.713	291.698	1.014.338	0.287	
0.5	01	13.753	135.025	955.106	0.141	0.126
	02	13.750	108.662	967.404	0.112	
	03	13.731	121.334	988.866	0.122	
	04	13.774	130.776	991.977	0.131	

3.4 Ensaio de inibição da AChE por Microplaca

Uma vez detectada a atividade inibidora da acetilcolinesterase pelo extrato ou fração alcaloídica através da autografia, procedemos então, à avaliação quantitativa desta inibição. A atividade anticolinesterásica foi avaliada quantitativamente usando um leitor de microplaca KC4-BIOTEK (BIO-TEK[®] - Instruments, INC. USA), absorvância a 405 nm, baseado no método de Ellman. Nas 96 cavidades da placa, foram adicionados 25 µL de iodeto de acetiltiocolina 15 mM, 125 µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] 3 mM no tampão (C) (DTNB ou reagente de Elleman), 50 µL do tampão (B), 25 µL das amostras dos extratos e frações alcaloídicas dissolvidas em metanol e diluídas 10 x no tampão (A) para obter uma concentração final de 0,1 mg/mL. A absorvância foi medida a 405nm a cada 13 s por 2 vezes. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,22 U/mL) e a absorvância foi medida novamente a cada 10 minutos por 2 vezes. A porcentagem de inibição

foi calculada através da comparação das velocidades da reação das amostras em relação ao branco (10% de MeOH no tampão A) Trevisan & Macedo (2003).

Tampões:

A- Tris/HCl 50 mM, pH=8;

B- Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1% de albumina sérica bovina fraçãoV;

C- Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂.6H₂O;

3.5 Ensaio de cultura *in vitro*

Para obter alcalóides piridínicos através de ensaios de cultura *in vitro*, foram feitas tentativas a partir da germinação de sementes de *S. multijuga*.

A quebra de dormência das sementes foi realizada pela imersão em água quente (100°C) por 10 segundos, em seguida as sementes foram desinfestadas inicialmente em etanol 70% e transferidas para solução de hipoclorito de sódio comercial 100%. Após 30 min sob agitação, as sementes foram lavadas com água destilada estéril (3x), em condições assépticas.

Após a realização da assepsia, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 30 g/L de sacarose e 8 g/L de agar, pH 5,8. Foram utilizadas 12 sementes por placa. O material foi incubado à temperatura de 25 ± 3°C, em fotoperíodo de 16h. Após a germinação, as plantas foram transferidas para frascos individuais, para realização dos experimentos.

Para a regeneração *in vitro* foram utilizadas como explantes as folhas de plantas obtidas por germinação de sementes *in vitro*. Foram utilizadas placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 30 g/L de sacarose e 8g/L de agar, pH 5,8, suplementado com diferentes combinações dos reguladores vegetais ácido indol-butírico (IBA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Plântulas de aproximadamente 5,0 cm de altura (quatro semanas) foram retiradas dos frascos e fragmentadas dentro da câmara de fluxo laminar com o uso de pinça e bisturi previamente esterilizados em autoclave. As folhas foram seccionadas ao meio e inoculadas em meio MS contendo metade das concentrações de macronutrientes, 30 g/L de sacarose e 8g/L de agar, pH 5,8 com diferentes concentrações de 2,4-D a (0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹), e IBA (0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) onde permaneceram incubados por 45 dias, até a formação de calos.

Para cada condição, foram estabelecidas 6 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri com 12 folhas seccionadas. As placas foram divididas e armazenadas em ambiente claro e escuro. Após a formação de calos o material foi submetido à análise de alcalóides piridínicos.

3.6 Análise estatística

Análises estatísticas dos dados foram feitas utilizando a análise de variância one-way (ANOVA)-Tukey's, teste de múltipla comparação. Os valores de "P" abaixo de 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Escolha do material vegetal

Para definir quais indivíduos adultos de *Senna multijuga* seriam utilizados para desenvolver este trabalho, algumas árvores foram observadas previamente a fim de se encontrar aquelas que produzissem flores, frutos e que pudessem ser retirados em quantidades suficientes para realizar os experimentos, não prejudicando seu desenvolvimento natural e sua fenologia. De acordo com Carvalho (1994), As flores aparecem entre dezembro e março de cada ano e, os frutos maduros aparecem entre abril e novembro. Os quatro indivíduos escolhidos para este trabalho desenvolvem estes órgãos, praticamente na mesma época e em grandes quantidades, o que facilitou a coleta do material. Também foram observados indivíduos que produziram flores e frutos em épocas diferentes e em pequenas quantidades, mas, seria preciso coletar praticamente todas as flores, o que prejudicaria seu desenvolvimento. Os diferentes órgãos de *S. multijuga* foram coletados por dois anos consecutivos, conforme mostrado nas Tabelas I e II e, após secagem em estufa, foram moídos e armazenados adequadamente em sacos de papel até o momento das análises.

4.1.2 Cultivo de mudas de *S. multijuga*

Sementes de *S. multijuga* foram retiradas de frutos maduros em maio de 2008. Segundo Carvalho (1994), *S. multijuga* produz uma grande quantidade de sementes dormentes que podem ser armazenadas por um longo período. Este autor cita que sementes de *S. multijuga* são recomendáveis para trabalhos de regeneração de áreas degradadas, sendo que suas sementes se adaptam bem em diferentes tipos de solos.

As sementes foram armazenadas em temperatura ambiente e colocadas para germinar no final de novembro de 2008 (440 sementes), originando 437 mudas, número favorável para

realizar as análises fitoquímicas (Figura 13). Plantas com 3,6 e 9 meses de idade foram coletadas para análise de alcalóides piridínicos, em folhas, caules e raízes.



Fig.13. Mudras de *Senna multijuga* em fase de crescimento.

4.2 Extrato etanólico e fração alcaloídica das árvores coletadas (2007/2008)

Antes de se obter as frações alcaloídicas dos diversos órgãos coletados de *S. multijuga*, foi realizado um estudo prévio de extração no qual se estabeleceu condições favoráveis de rendimento do extrato bruto obtido pelo método de extração acelerada (ASE300), sendo que a condição de temperatura a 60°C e um tempo estático de 15min, não altera ou degrada os alcalóides piridínicos estudados neste trabalho. Também foi estabelecido que para cada extrato bruto fosse utilizado 100g de material seco e moído de cada órgão coletado nas diferentes fases fenológicas, tanto para os indivíduos adultos como para os indivíduos jovens.

A Figura 14 mostra a massa de extrato etanólico dos diferentes órgãos, coletados nos anos de 2007 e 2008. Para cada órgão foi realizada a média de rendimento dos indivíduos ($n=4$). Os dados mostram que, em ambos os casos, o rendimento de extrato etanólico foi similar para os dois anos de coleta, ocorrendo apenas pequenas variações de rendimento entre os órgãos. A análise estatística utilizada (ANOVA) comparou os diversos órgãos entre si coletados nas diferentes fases fenológicas (floração, frutificação, dormência e brotação), entretanto, nos gráficos a seguir são mostradas as diferenças entre os órgãos semelhantes presentes nas diferentes fases, ou seja, as folhas presentes na floração, frutificação e brotação, e os galhos presentes em todas as fases. Os demais resultados, que mostram se houve diferença significativa ($p<0,05$) entre órgãos diferentes, inclusive na mesma fase fenológica, estão presentes em tabelas fornecidas pelo próprio programa estatístico em forma de anexos no item 10 (ANEXOS).

Os dados mostram que, não houve diferença significativa quanto ao rendimento de extrato etanólico entre folhas e galhos nas diferentes fases, durante os anos de 2007 e 2008.

Este resultado preliminar reforça que as extrações realizadas por ASE300 fornecem uma padronização favorável, comparado a outros métodos de extração, como a maceração e o ultrassom.

Também foram realizados experimentos com plantas cultivadas de 3, 6 e 9 meses de idade para avaliar a presença de alcalóides piridínicos nos indivíduos jovens. A Figura 15 mostra a massa (g) de extrato etanólico de folhas, galhos e raízes de *S. multijuga*. Os dados mostram que o rendimento de extrato etanólico foi similar nos diferentes órgãos nos três períodos de coleta e que não houve diferença estatística entre os órgãos semelhantes.

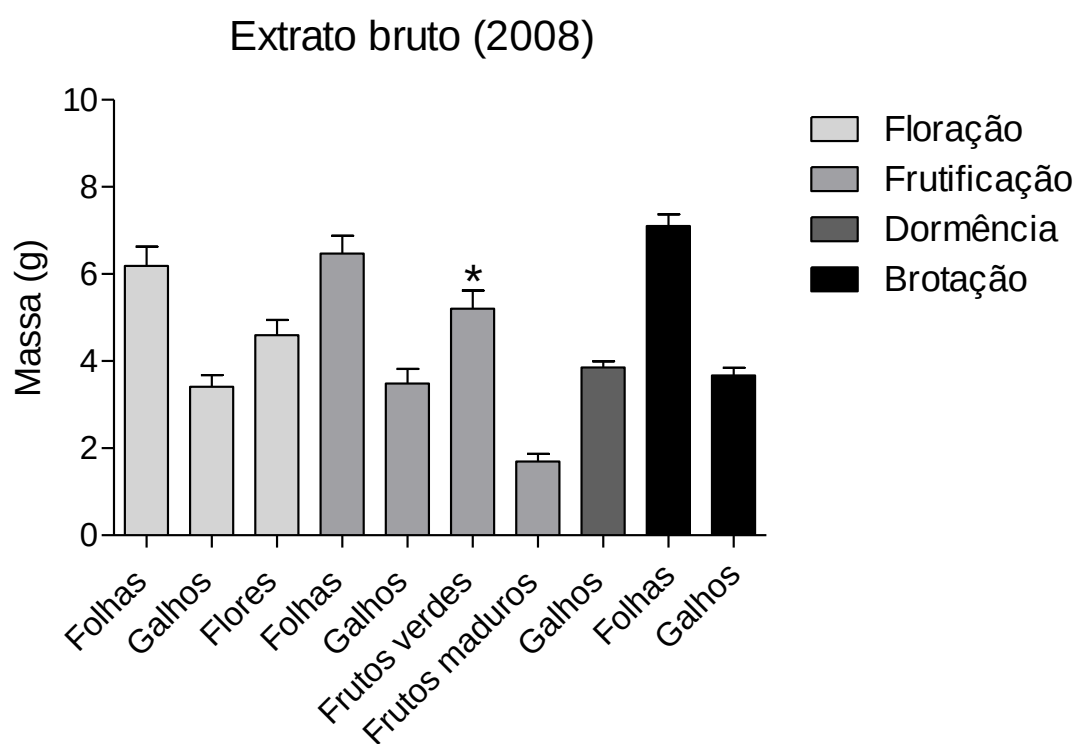
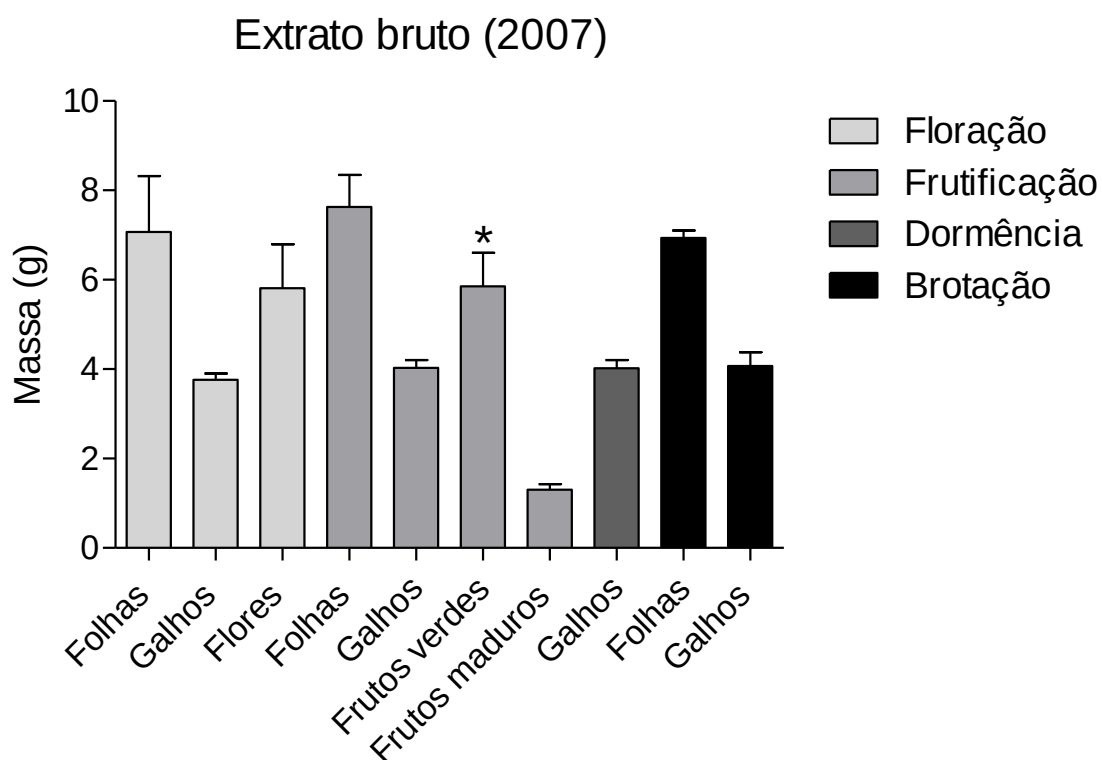


Fig.14. Massa de extrato bruto etanólico de diferentes órgãos de *S. multijuga*, coletados em 2007 e 2008.

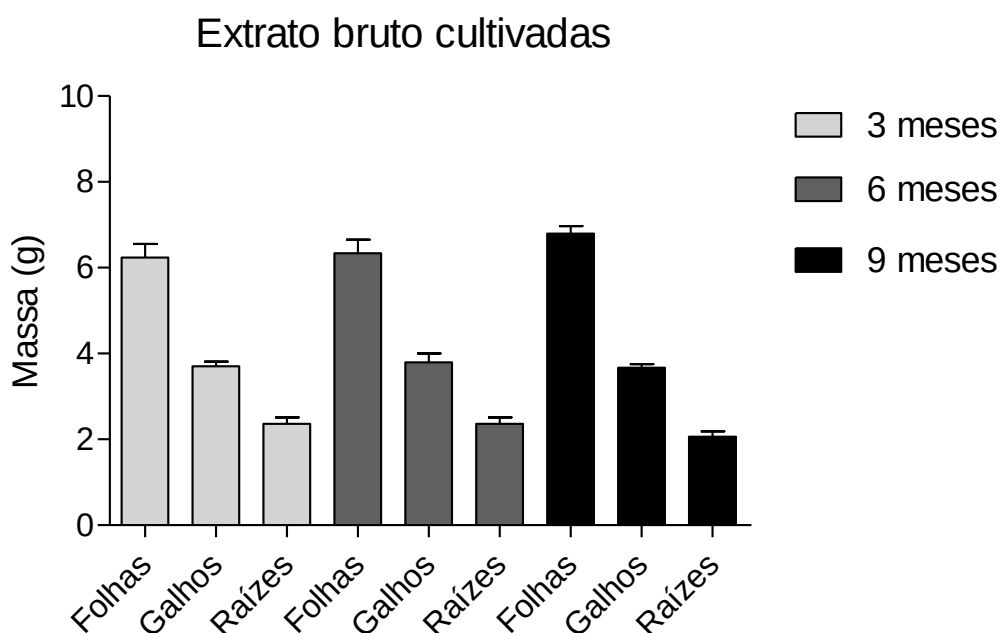


Fig.15. Massa de extrato bruto de diferentes órgãos de *S. multijuga* cultivadas.

A extração de alcalóides foi feita segundo o protocolo de Serrano (2006) para os extratos brutos de 2007 e 2008. Os extratos foram submetidos à partição e fracionamento (conforme o fluxograma 1 em “Material e métodos”), fornecendo uma fração bruta de alcalóides (Figura 16). Os dados mostram a princípio que frações contendo alcalóides são encontradas em todos os órgãos analisados, entretanto, foram observadas diferenças entre as concentrações nos órgãos durante as fases fenológicas. De acordo com Doan et al. (2004), os metabólitos secundários podem variar sua concentração nos diferentes órgãos vegetais. Tanto em 2007 como em 2008, as folhas coletadas no período de brotação, mostram uma diferença significativa com relação às folhas coletadas no período de frutificação ($p < 0,05$). Hendriks et al. (1997) e Spring & Bienert (1987), relataram que muitas vezes, as variações de metabólitos secundários podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários. Em outro estudo realizado por Alves (2003), na maioria das fenofases as folhas jovens alocam uma quantidade maior de escopolamina (alcalóide de Solanaceae) que outras partes da planta.

O mesmo autor cita que a concentração de alcalóides em tecidos mais jovens serviria como proteção contra inimigos naturais.

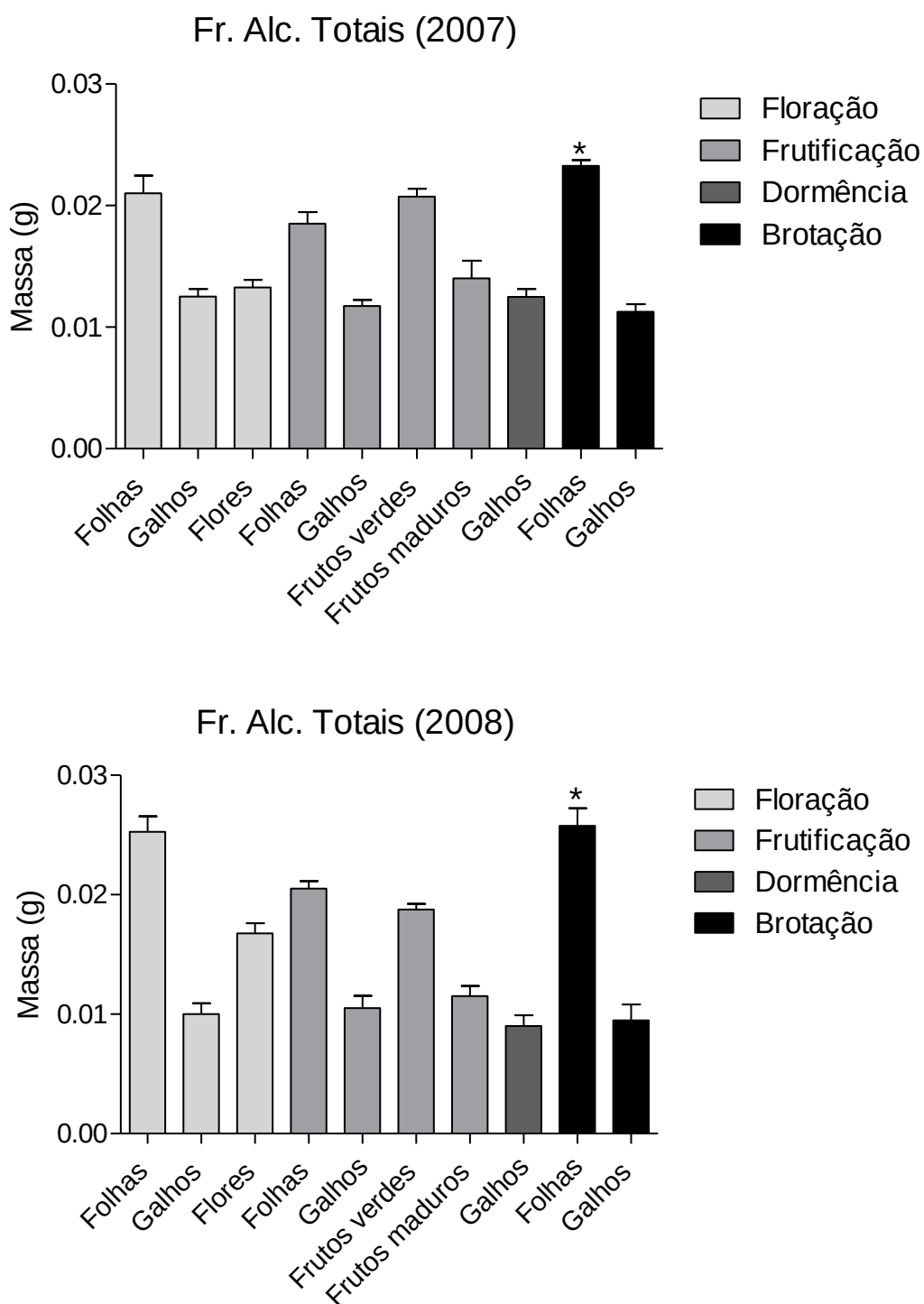


Fig.16. Fração alcaloídica 2007/2008 obtidas dos diferentes órgãos de *S. multijuga*. * $p < 0,05$ vs folhas (frutificação).

Para a obtenção de alcalóides dos indivíduos cultivados, foi utilizado o método de extração ácido-base segundo SripHong et al. (2003), conforme o fluxograma 2 em “Material e métodos”. A Figura 17 mostra as massas das frações de alcalóides totais obtida de folhas, galhos e raízes em três diferentes períodos de coleta. A concentração de alcalóides em folhas de plantas com 9 meses de idade foi maior com relação a concentração em folhas de plantas com 3 e 6 meses de idade $P<0,05$.

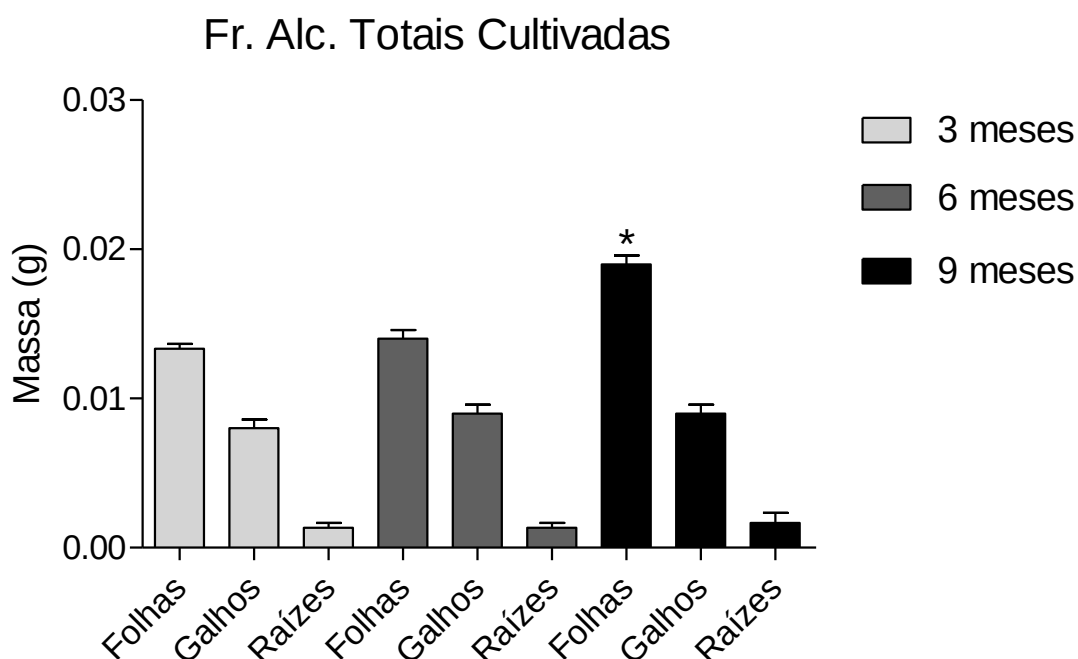


Fig.17. Fração alcaloídica obtida dos diferentes órgãos de *S. multijuga* em plantas cultivadas. * $p<0,05$ vs folhas com 3 e 6 meses de idade.

O estudo realizado por Zheng & Ashihara (2004) revelaram que a trigonelina, alcalóide piridínico isolado de *Trigonella foenum-graecum* (Fabaceae), é encontrado em maior quantidade em folhas jovens com relação às folhas maduras e que estes alcalóides piridínicos também são encontrados nos diversos órgãos de indivíduos adultos de *Trigonella foenum-graecum*. Em *S. multijuga*, também foi observado que há presença de alcalóides piridínicos em diversos órgãos de indivíduos adultos (Figura 16), sendo que a maior concentração de alcalóides aparece em folhas na fase de brotação ($p<0,05$). Em plantas jovens

estes alcalóides também aparecem em maior quantidade nas folhas, quando comparado com os galhos e raízes.

4.3 Análises por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Para verificar a presença de alcalóides piridínicos, uma amostra da fração bruta de alcalóides de folhas na fase de floração (30ug) foi submetida á cromatografia em camada delgada em placas de sílica-gel (Figura 18), e revelada com Iodoplatinato (IP), que é específico para revelação de alcalóides (Figura 18C).

A fração alcaloídica apresentou dois alcalóides majoritários (7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona) os quais foram purificados por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) e aplicados na placa analítica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), juntamente com um padrão de 7'-multijuguinona.

Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (AChE) e incubada em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos. Em seguida borrifada com a solução reveladora. A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. A figura 19 mostra o aparecimento de halo branco sobre um fundo de coloração roxa indicando que houve inibição da atividade enzimática.

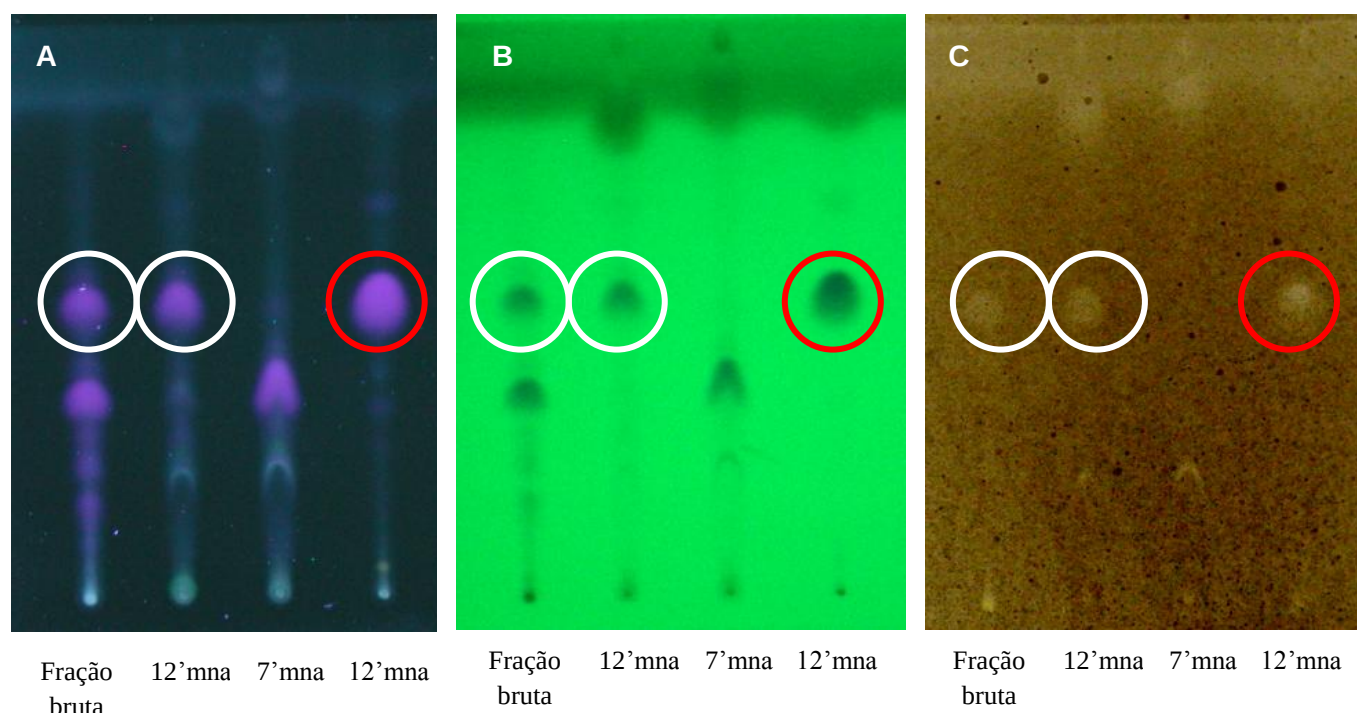


Fig.18. Cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica-gel. **A** – Foto da placa em comprimento de onda de 366nm. **B** – Foto da placa em comprimento de onda 254nm. **C** – Placa revelada com Iodoplatinato (IP). O círculo vermelho corresponde ao padrão (12'-multijuguinona). O sistema de solventes utilizados foi: clorofórmio / metanol / hidróxido de amônia (36:3:1).

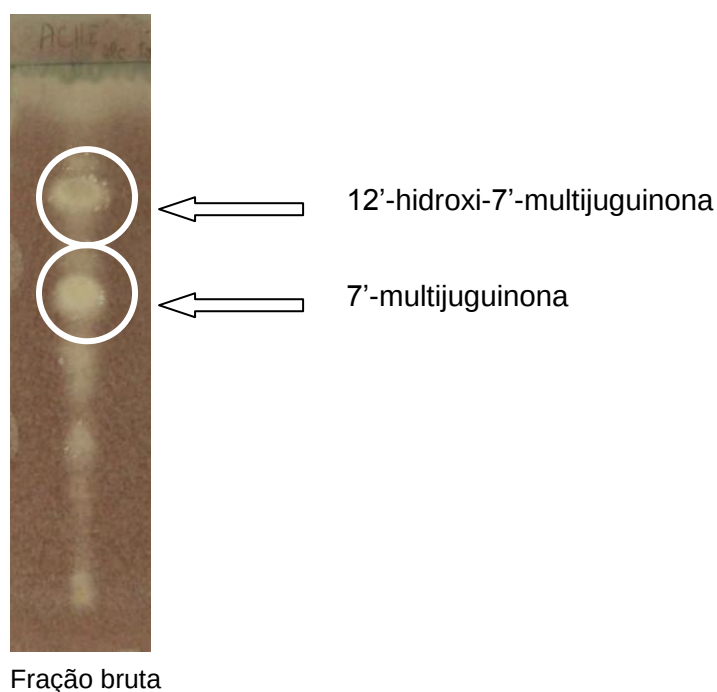


Fig.19. Teste de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os alcalóides 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona, são majoritários e apresentam atividade contra a enzima. O sistema de solventes foi o mesmo utilizado na figura 18.

4.4 Ensaio de inibição da AChE pelo método de microplaca

As frações alcaloídicas obtidas dos diversos órgãos de *S. multijuga*, coletados nos anos de 2007/2008 e de plantas cultivadas, foram analisadas com relação à porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo ensaio de microplaca. Os dados mostram que não houve diferença significativa de inibição entre as frações alcaloídicas obtidas de folhas nas fases fenológicas de 2007 (Figura 20), porém, houve variação na inibição entre os galhos coletados na fase de dormência, com relação aos galhos coletados na fase de floração ($p < 0,05$). Em 2008, foi observado que a inibição da AChE pela fração alcaloídica das folhas na fase de brotação foi significativa com relação as folhas na fase de floração ($p < 0,05$). Também foi observado em 2008 que a inibição pela fração de galhos na fase de dormência foi maior com relação aos galhos na fase de floração.

Os ensaios de inibição da AChE em plantas cultivadas (Figura 21), revelaram que as frações de folhas coletadas nos três períodos (3, 6 e 9 meses) apresentaram atividade de inibição da enzima (não significativa entre elas), atividade que também foi observada com menor intensidade com relação aos galhos. Curiosamente, não foram observadas atividades de inibição da AChE pelas frações de raízes, nos três períodos de coleta. Além disso, nessas frações os rendimentos foram muito baixos, como mostrado anteriormente na Figura 17. Estudos anteriores descreveram que a biossíntese de alcalóides piridínicos é realizada nas raízes, como no trabalho realizado por Kitamura et al. (1991), com *Dubosia myoporoides* (Solanaceae), em que estes alcalóides são posteriormente translocados para outros órgãos da planta. Horiuchi et al. (2006), isolaram alcalóides piridínicos das raízes de *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae), com atividades citotóxicas e anti-HIV, entretanto, em raízes de *S. multijuga*, a atividade de inibição da AChE não foi observada.

No presente estudo, análises foram realizadas para verificar a presença de alcalóides piridínicos em raízes.

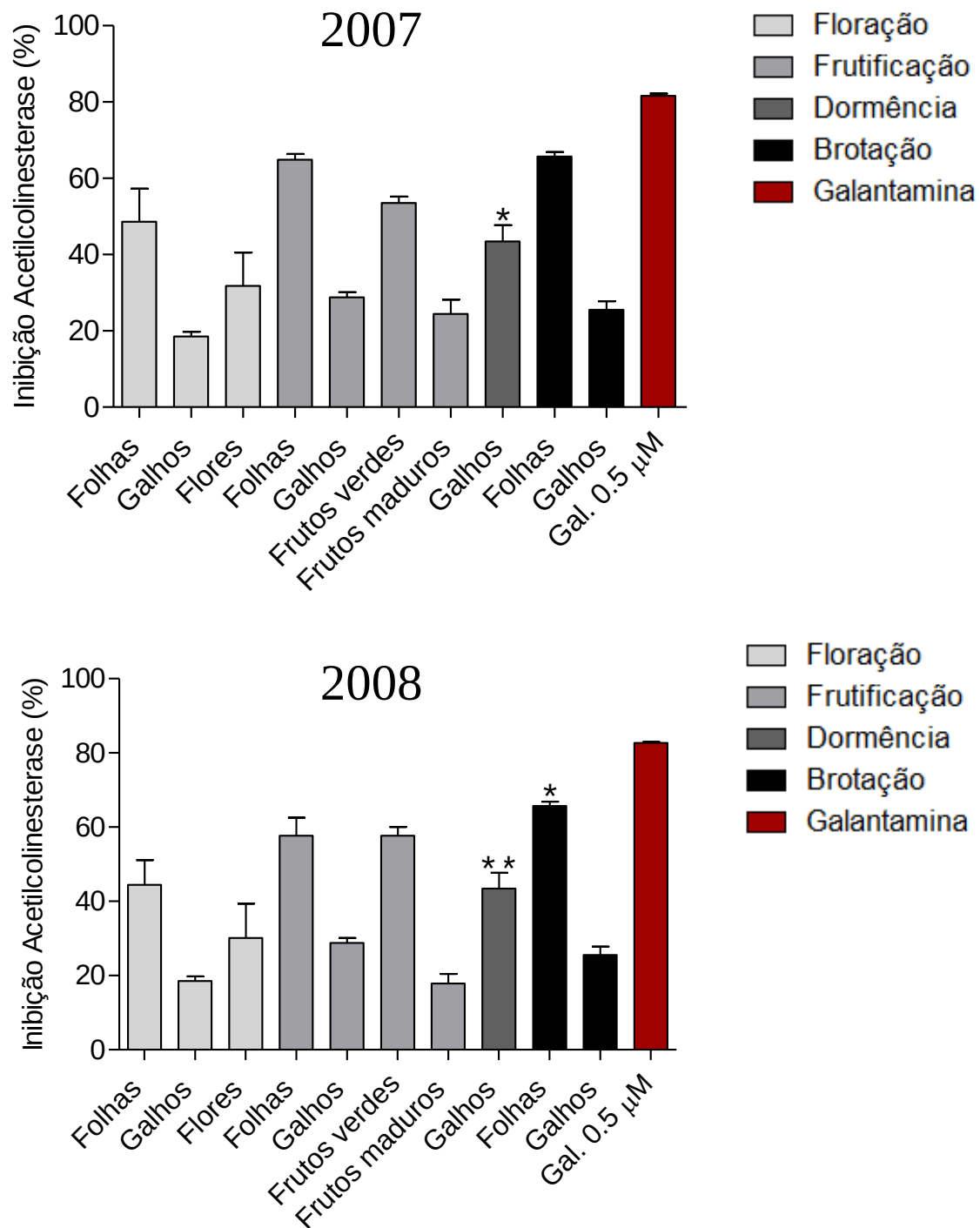


Fig.20. Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo método de microplaca com frações alcaloídicas extraídas dos órgãos de *S. multijuga*, coletados no anos de 2007 e 2008. Para 2007 * $p < 0,05$ vs galhos no período de floração. Para 2008 * $p < 0,05$ vs folhas no período de floração, ** $p < 0,05$ vs galhos no período de floração.

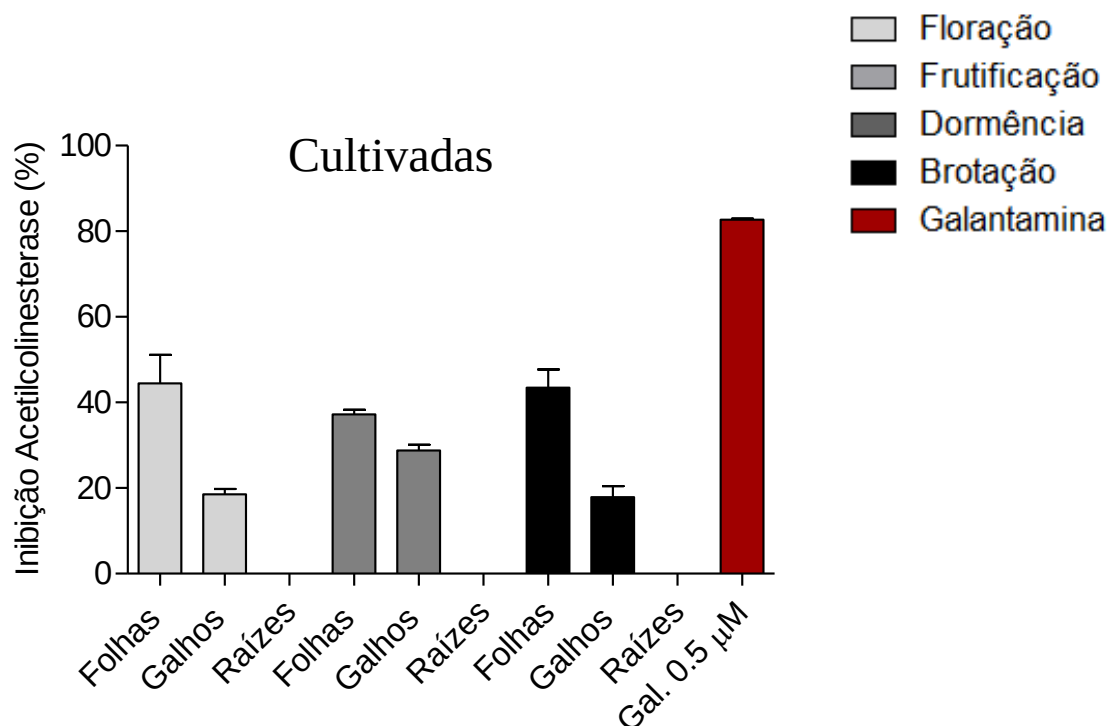


Fig.21. Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo método de microplaca com frações alcaloídicas extraídas dos órgãos de plantas cultivadas de *S. multijuga*.

4.5 Análise quantitativa de alcalóides piridínicos

Análises preliminares foram feitas utilizando o CG-FID para determinar as melhores condições de separação para os alcalóides piridínicos de *S. multijuga*, já que estes alcalóides ainda não haviam sido analisados por esta técnica. As melhores condições de separação para estes alcalóides estão descritas em “material e métodos”. O perfil cromatográfico (Figura 22) mostra a separação dos dois alcalóides majoritários (7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona), presentes nas folhas de *S. multijuga* (floração/2007).

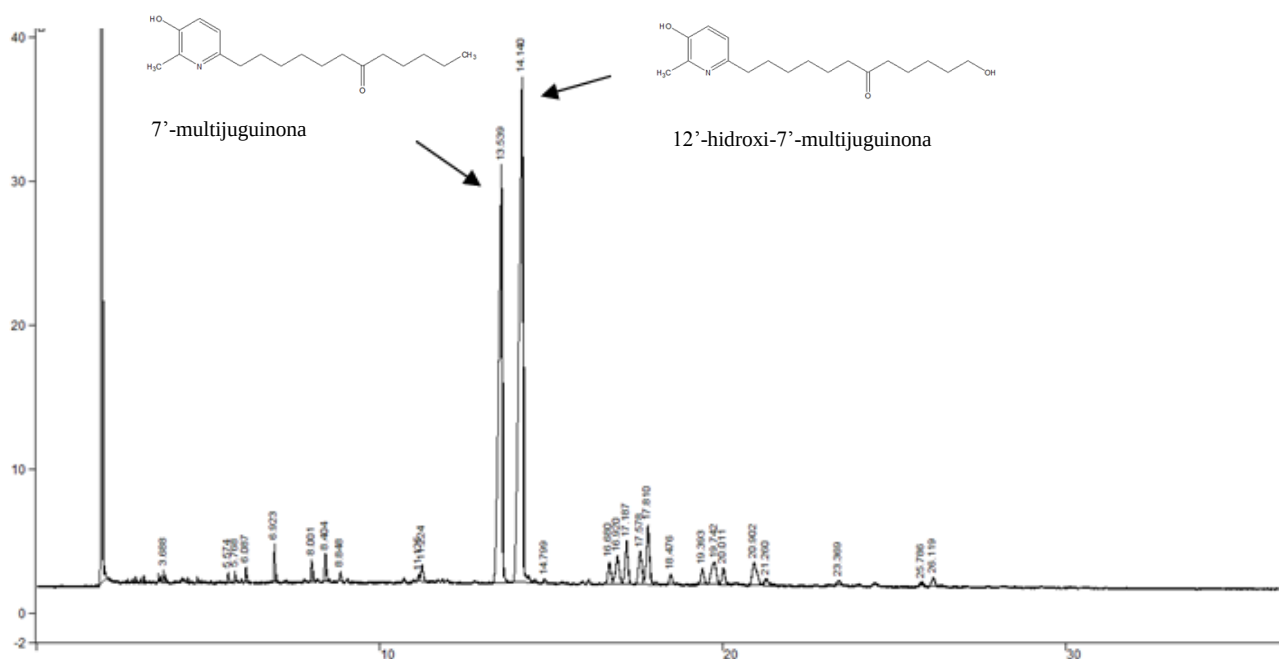


Fig.22. CG/FID. Perfil cromatográfico da fração bruta de alcalóides isolados das folhas de *S.multijuga* (floração/2007).

4.5.1 Curva de calibração

Para quantificar os alcalóides foi construída uma curva de calibração, utilizando padrões de 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona em concentrações diferentes, além do padrão interno (PI) espectralina (tabelas III e IV em “Material e métodos”). A curva obtida para o alcalóide 7'-multijuguinona apresentou $R^2=0,9995$, e para o alcalóide 12'-hidroxi-7'-multijuguinona $R^2=0,9988$ (Figura 23).

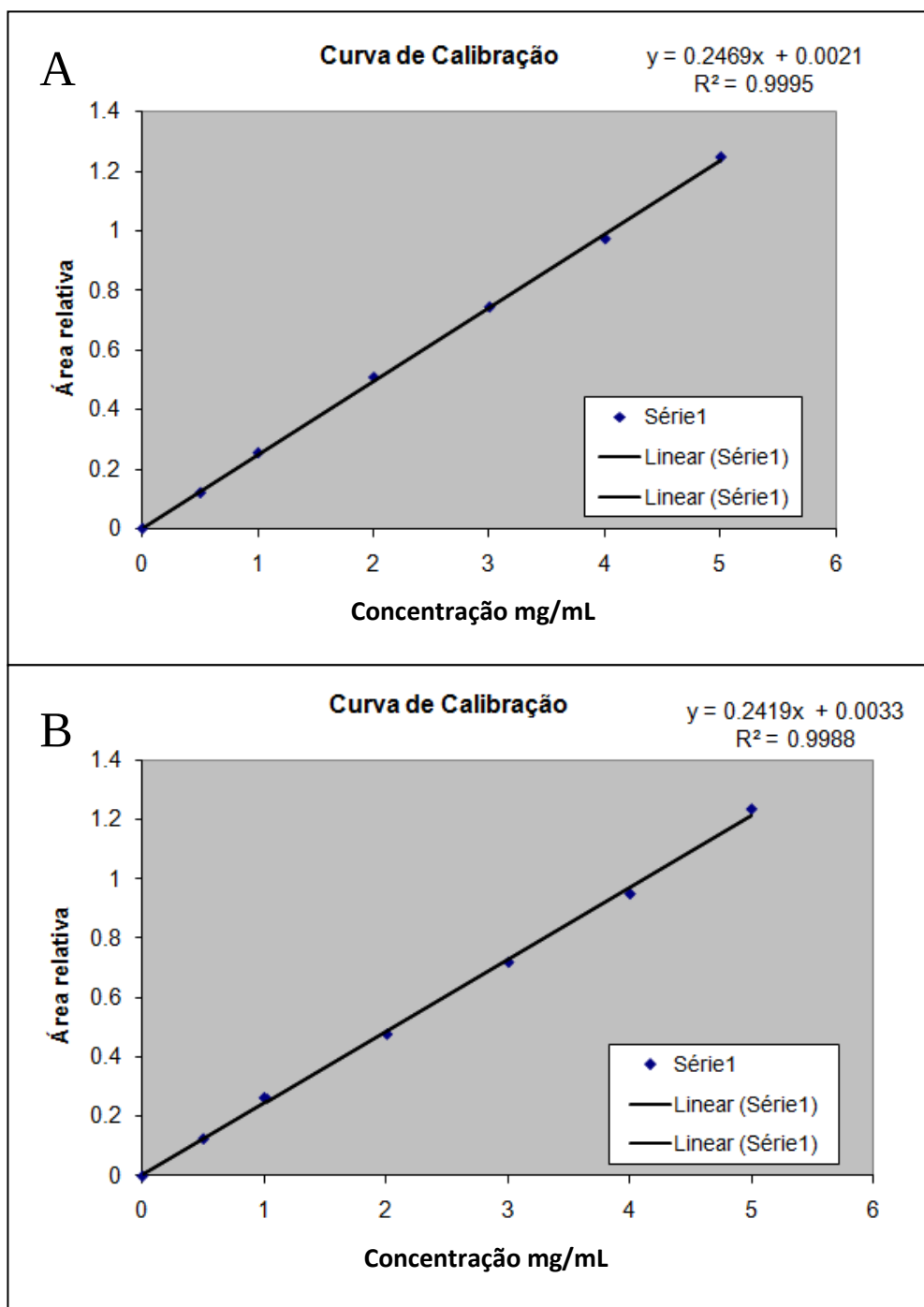


Fig.23. Curvas de calibração. A) 7'-multijuguinona. B) 12'-hidroxi-7'-multijuguinona. O padrão interno (PI) utilizado foi a spectralina, obtida das flores de *Senna spectabilis*.

A Figura 24 mostra uma análise cromatográfica da fração de alcalóides obtida folhas de *S. multijuga* na fase de frutificação (2007), injetada com o padrão interno (PI) spectralina. O resultado indica que o PI utilizado reproduziu um perfil favorável para quantificar os alcalóides piridínicos, já que este não faz parte da amostra, e possui um tempo de retenção próximo a amostra (Collins, 2006).

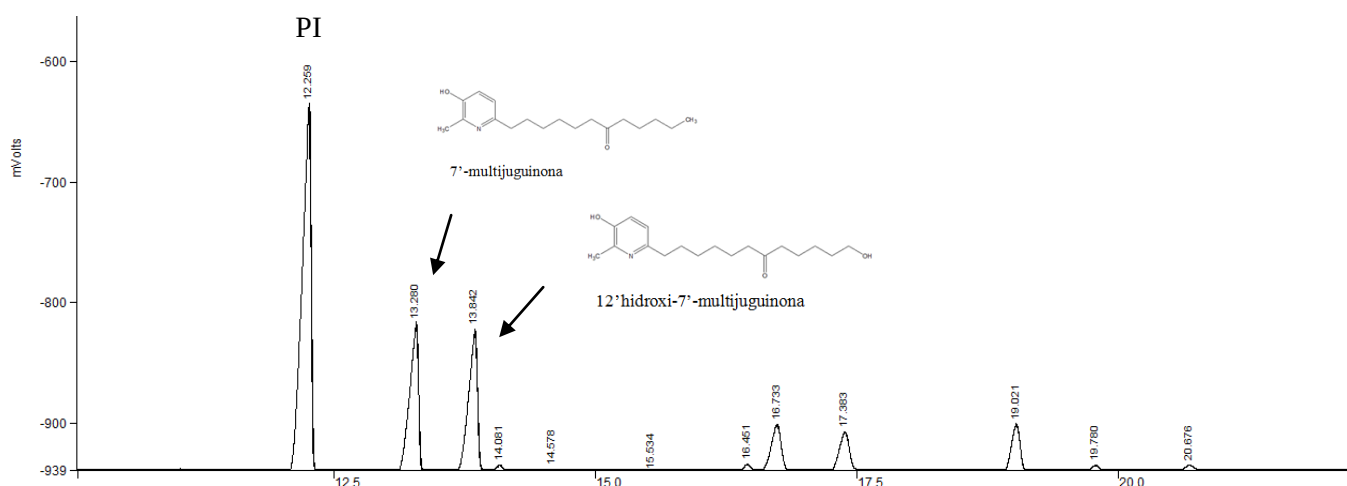


Fig.24. Perfil cromatográfico da fração alcaloídica obtido por CG/FID. A spectralina (PI) foi usada como padrão interno.

4.6 Concentração de alcalóides piridínicos nos diversos órgãos de *S. multijuga*

Após a obtenção das curvas de calibração, as frações alcaloídicas dos diferentes órgãos de *S. multijuga* coletados nas diferentes fases em 2007/2008 e de plantas cultivadas, foram injetadas juntamente com o PI e os alcalóides foram quantificados. A Figura 25, mostra a concentração do alcalóide 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona obtidos das frações de órgãos coletados em 2007. Os resultados indicam que a concentração desses alcalóides é predominante nas folhas, mas não houve diferença significativa entre elas nas diferentes fases, sendo que também não houve diferença entre galhos. Também foi observado que ocorre uma tendência maior de concentração do alcalóide 7'-multijuguinona com relação ao 12'-hidroxi – multijuguinona em todos os órgãos.

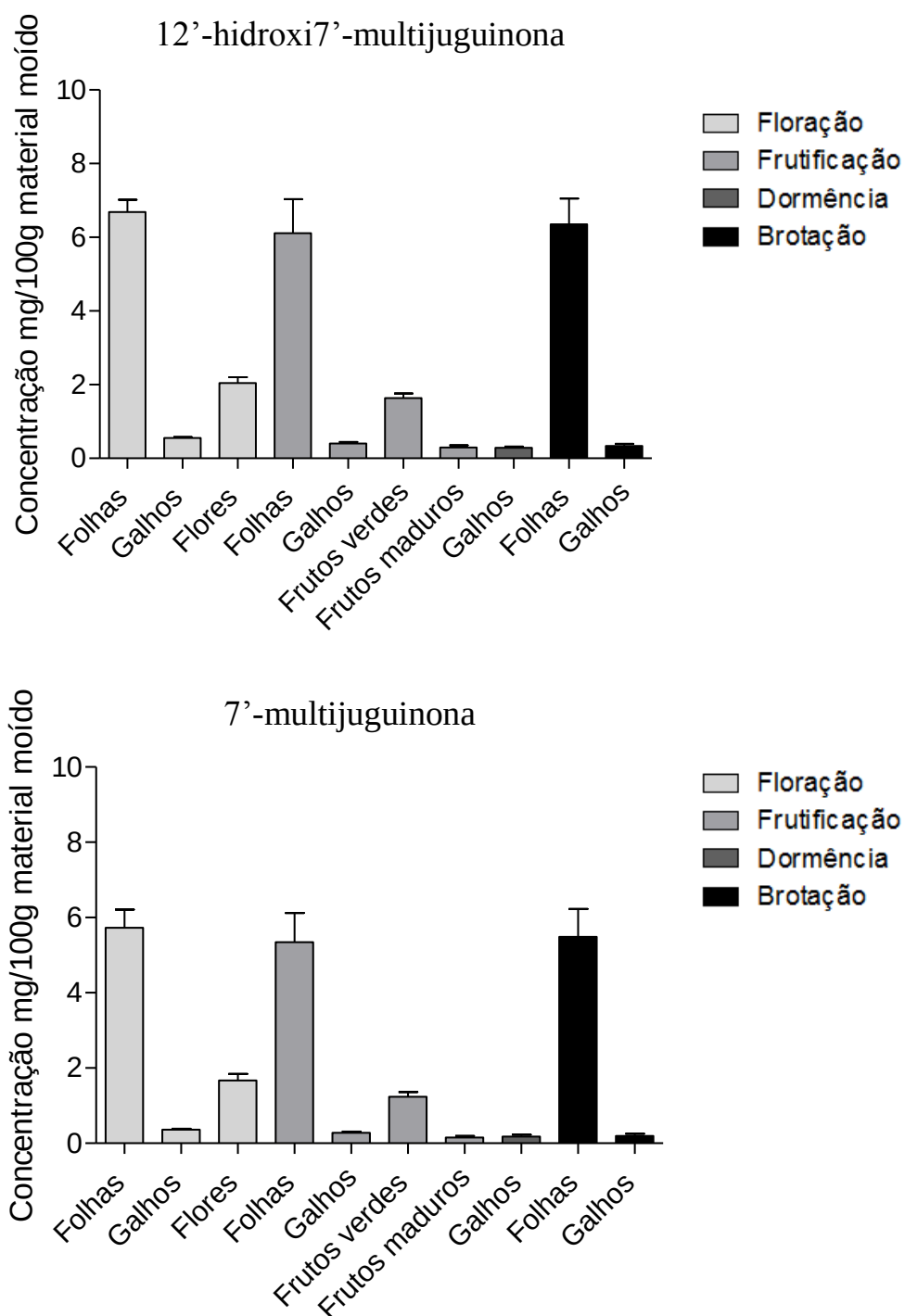


Fig.25. Concentração dos alcalóides piridínicos 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona obtidos de diferentes órgãos de *S. multijuga*, coletados em 2007.

Resultado semelhante foi observado nas concentrações desses alcalóides no ano de 2008 (Figura 26). As folhas acumulam uma quantidade maior de alcalóides, entretanto, neste

ano as folhas coletadas no período de brotação mostraram uma diferença significativa na concentração de ambos os alcalóides com relação às folhas no período de frutificação.

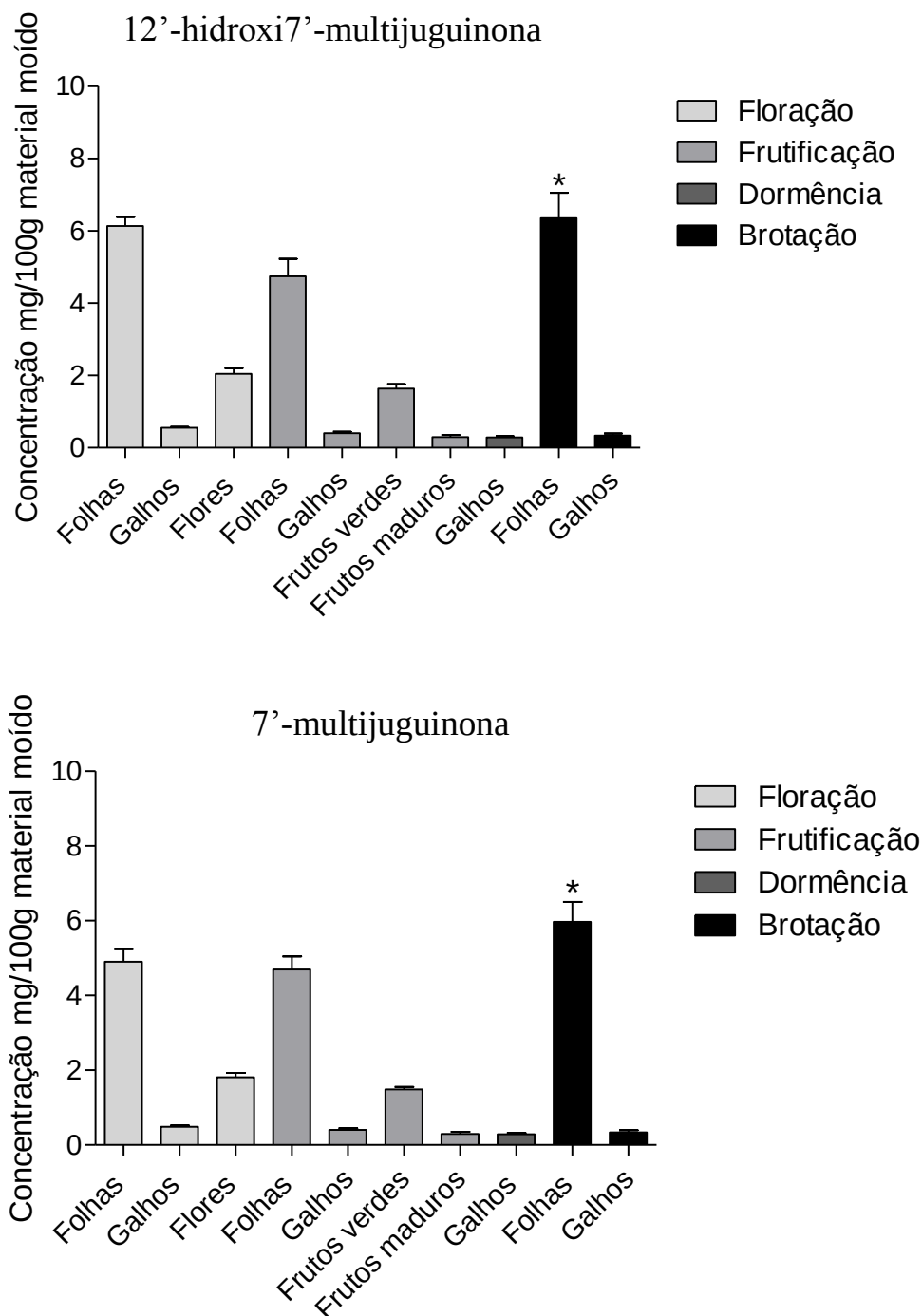


Fig.26. Concentração dos alcalóides piridínicos 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona obtidos de diferentes órgãos de *S. multijuga*, coletados em 2008. * $p < 0,05$ vs folhas no período de frutificação.

As análises dos órgãos de plantas jovens, revelaram que ambos os alcalóides estão presentes em maior quantidade nas folhas e em menor quantidade nos galhos, como observado até agora, no entanto, não foi detectada a presença dos alcalóides 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona em raízes de plantas com 3, 6 e 9 meses de idade (Figura 27).

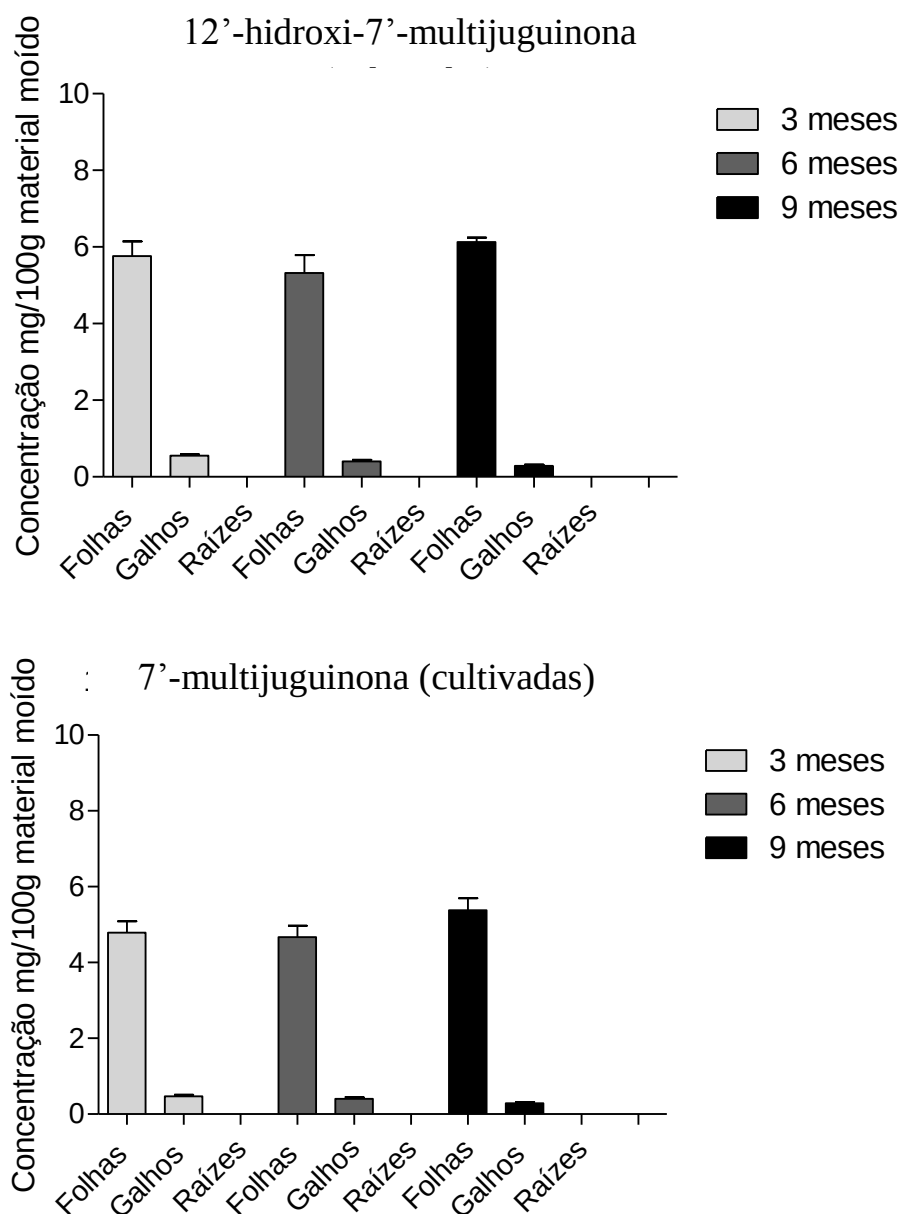


Fig.27. Concentração dos alcalóides piridínicos 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona obtidos de órgãos de plantas jovens de *S. multijuga*.

Amostras das frações alcaloídicas de folhas, galhos e raízes de plantas jovens foram analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD) e revelada com iodoplatinato (Figura 28). Os resultados mostram a presença dos alcalóides 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona em folhas e galhos, exceto em raízes.

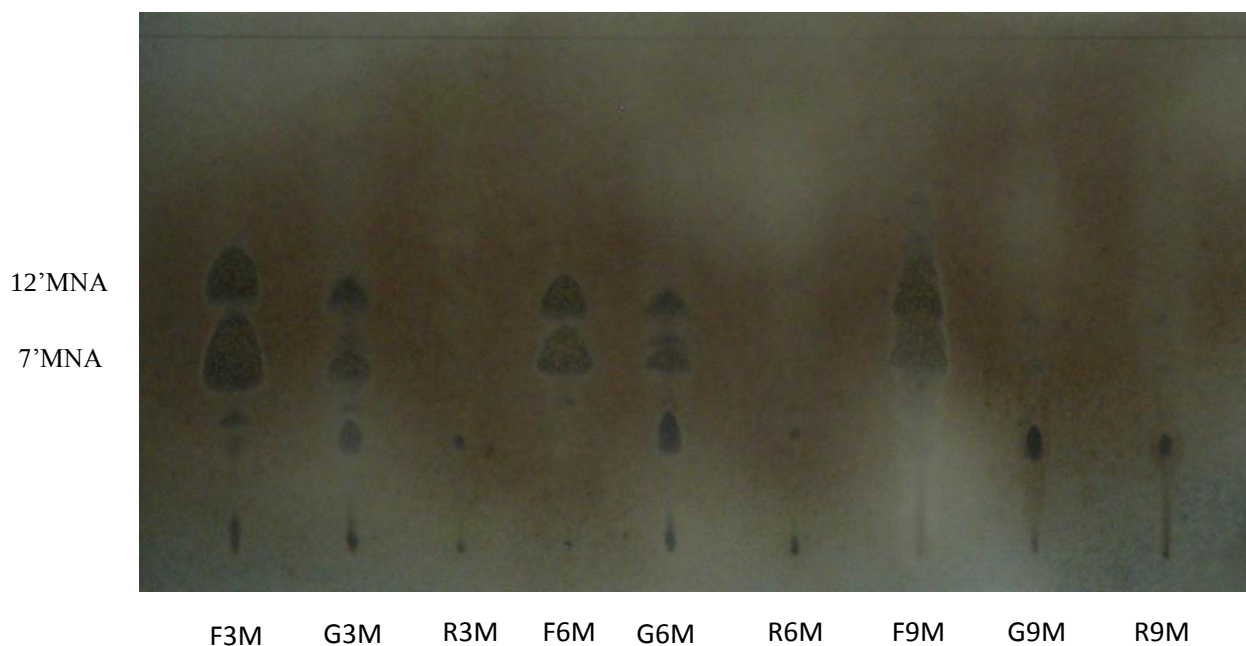


Fig.28. Ensaio em Cromatografia de camada delgada (CCD). Frações obtidas de folhas, galhos e raízes de plantas com 3, 6 e 9 meses de idade, reveladas com iodoplatinato, para detecção de alcalóides.

As análises de raízes de plantas jovens por CG/FID não revelaram a presença de ambos os alcalóides, conforme mostrado na Figura 29, entretanto o cromatograma mostra a presença de um pico a 18min de corrida, sendo provavelmente um outro alcalóide, já que a extração ácido-base é específica para a extração de alcalóides.

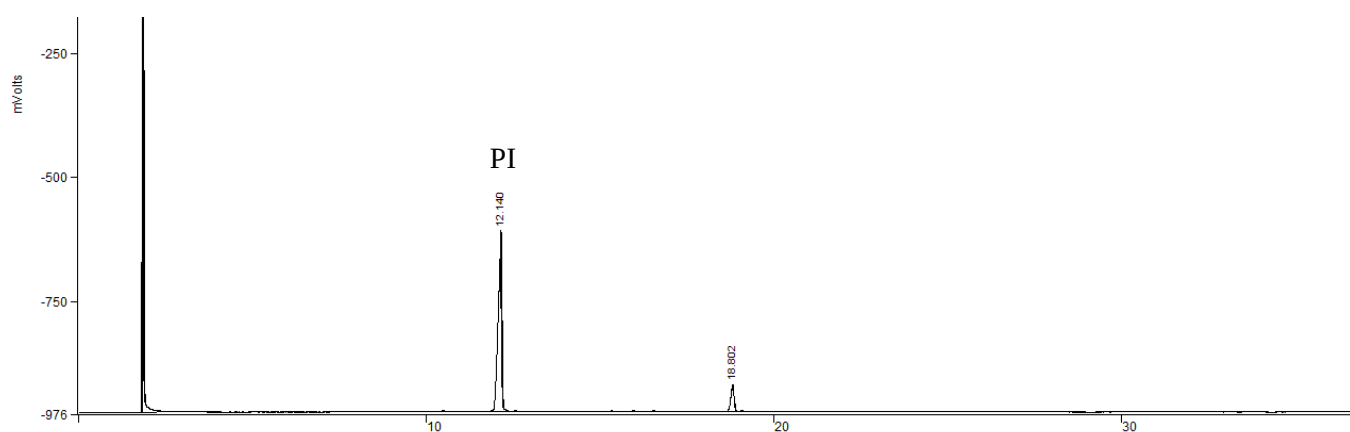


Fig.29. Perfil cromatográfico da fração alcaloídica obtida de raízes de plantas jovens.

O acúmulo de alcalóides em folhas jovens de *S. multijuga* pode estar relacionado à proteção contra microorganismos, sendo que esta função para alcalóides em plantas foi comprovada em trabalhos anteriores (Simões et al., 2001).

4.7 Dados de temperatura, precipitação e irradiação solar

A Figura 30 mostra os dados de precipitação total, irradiação solar e temperaturas máxima e mínima do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), correspondentes ao período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008.

As coletas realizadas em 2007 e 2008 nas diferentes fases fenológicas de *S. multijuga*, coincidiram com as estações do ano, sendo a floração (verão), frutificação (outono), dormência (inverno) e brotação (primavera).

Segundo Morellato et al. (1990), a sazonalidade do clima, principalmente as variações na precipitação, influencia o comportamento fenológico das espécies e deve ser o fator primário relacionado às estratégias fenológicas por elas apresentadas, caracterizadas pela

marcada periodicidade na ocorrência das fenofases (estações bem definidas) e pela pequena variação na sua ocorrência entre anos.

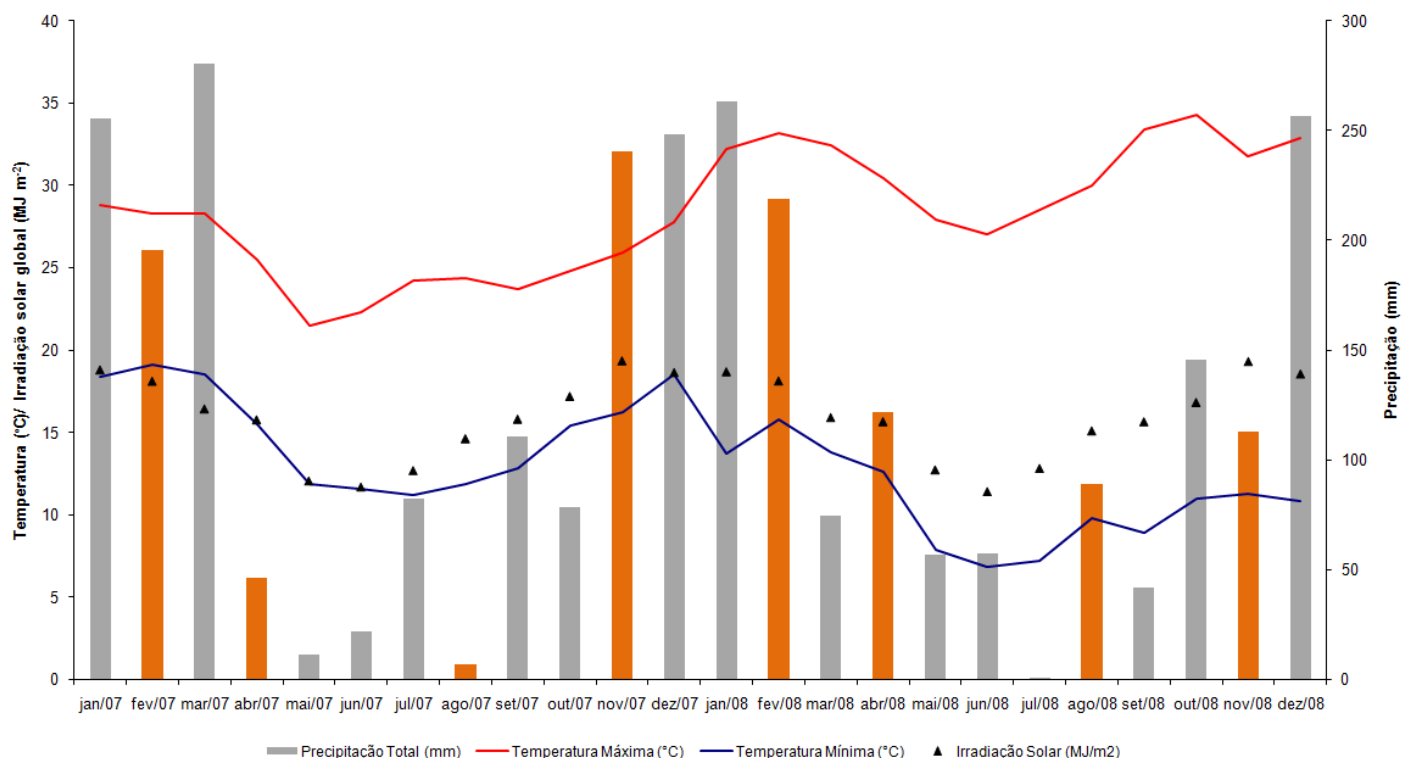


Fig.30. Dados meteorológicos com relação aos anos de 2007 e 2008. Temperatura máxima (linha vermelha) e mínima (linha azul). Irradiação solar (▲). Precipitação (barras cinzas). As barras laranjas correspondem aos períodos de coleta.

Observou-se que o melhor rendimento de alcalóides piridínicos foi obtido pelas folhas de *S. multijuga* nos anos de 2007 e 2008. Segundo Salisbury et al. (1991), fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário. Hoft et al. (1996), também descreveram que o estresse hídrico freqüentemente tem conseqüências significantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, como os alcalóides. Em *S. multijuga*, foi observado que durante os anos de 2007 e 2008, o volume de chuva não afetou a produção de alcalóides piridínicos, já

que os mesmos estão presentes em todas as fases fenológicas, com predominância nas folhas. Também é importante mencionar que no Estado de São Paulo, e em geral na região sudeste, ocorrem chuvas constantes, principalmente nas épocas mais quentes, como observado na Figura 30. A temperatura e a irradiação solar, também não influíram na produção de alcalóides piridínicos.

4.8 Análise qualitativa de alcalóides por CG/EM

Os alcalóides 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona também foram analisados por CG-EM (Figura 31), apresentando m/z de 292 e 291, respectivamente. Segundo Serrano et al. (2010), a massa detectada para o alcalóide 12'-hidroxi-7'-multijuguinona é de 308.2220 $[M+H]^+$.

Em nossas análises, o espectro de massas do alcalóide 12'-hidroxi-7'-multijuguinona não mostra o pico de massa, mas um fragmento de m/z 291, provavelmente pela perda de uma hidroxila (OH), já que isto é comum em alcoóis alifáticos.

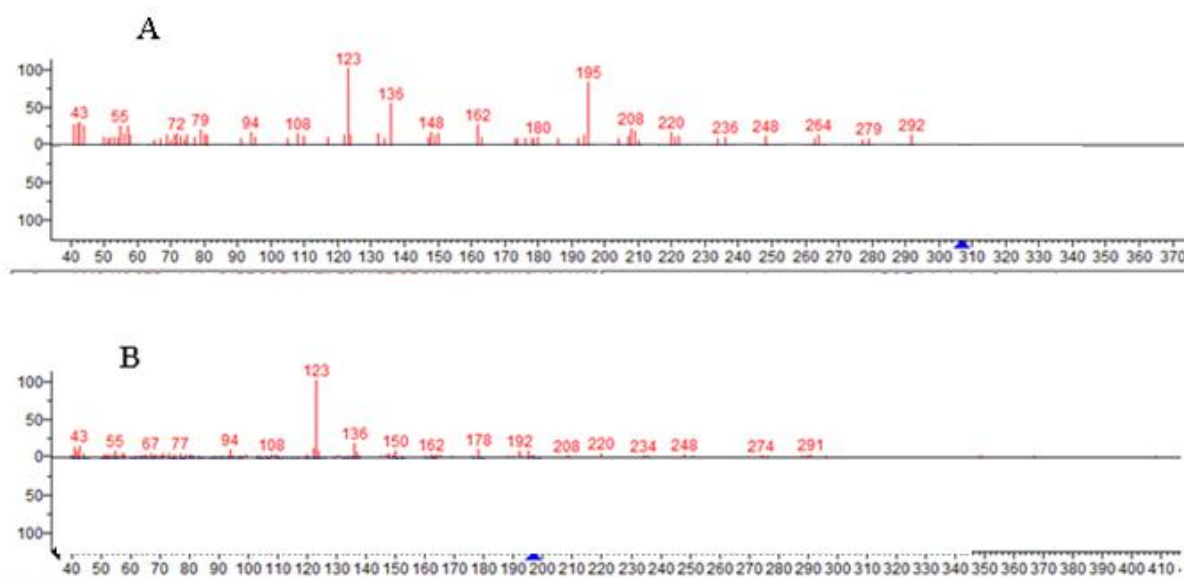


Fig.31. Análise dos alcalóides por CG/EM. A) 7'-multijuguinona. B) 12'-hidroxi-7'-multijuguinona.

4.9 Ensaios de cultura *in vitro*

Ensaios de cultura *in vitro* com *S. multijuga* foram realizados com o objetivo de se obter alcalóides piridínicos, sendo que para esta espécie ainda não existem trabalhos relacionados.

Primeiramente, sementes maduras de *S. multijuga*, após tratamento para quebrar a dormência e desinfestação, foram colocadas em placas de vidro contendo meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 30 g/L de sacarose e 8 g/L de agar, pH 5,8, para avaliar a capacidade de germinação (Figura 32A). Após 15 dias, as plântulas foram transferidas para frascos maiores. Cerca de 30 dias após a germinação, as plântulas cresceram e ocuparam totalmente os frascos (Figura 32B).

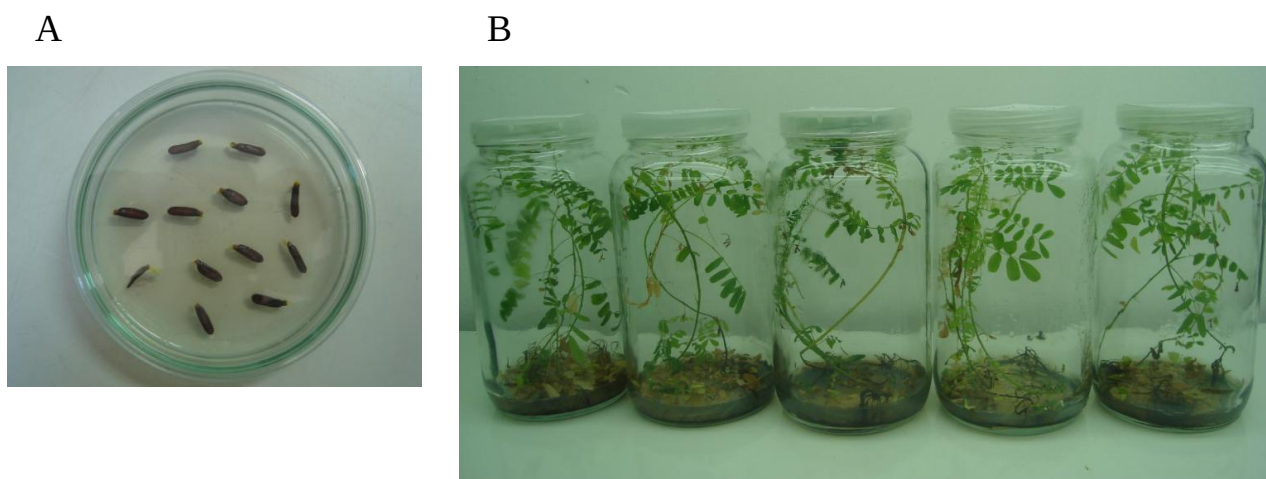


Fig.32. Ensaios de germinação de sementes de *S. multijuga*. A- Sementes em cultura em fase inicial de germinação. B- Plântulas desenvolvidas em frascos contendo meio de cultura.

Após a obtenção das plântulas foi realizada a indução de calos, sendo as folhas utilizadas como explantes, pois é o órgão que acumula maior concentração de alcalóides piridínicos. As folhas foram fragmentadas dentro da câmara de fluxo laminar com o uso de pinça e bisturi previamente esterilizados em autoclave, posteriormente as folhas foram seccionadas ao meio e inoculadas em meio MS contendo metade das concentrações de macronutrientes, 30 g/L de sacarose e 8 g/L de agar, pH 5,8 com diferentes concentrações de

2,4-D a (0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹), e IBA (0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) onde permaneceram incubados por 45 dias, até a formação de calos (Figura 33).

Para cada condição, foram estabelecidas 6 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri com 12 folhas seccionadas (Figura 33A/B). O material foi dividido em ambiente claro e escuro, para verificar eventuais problemas com oxidação. Segundo Laukkanen (1999), a oxidação dos tecidos é uma característica típica em cultura de calos derivados de explantes, na maioria das plantas lenhosas. Esse processo reduz o crescimento de calos e inibe a formação de brotações adventícias. Após a formação de calos o material foi submetido à análise de alcalóides piridínicos.

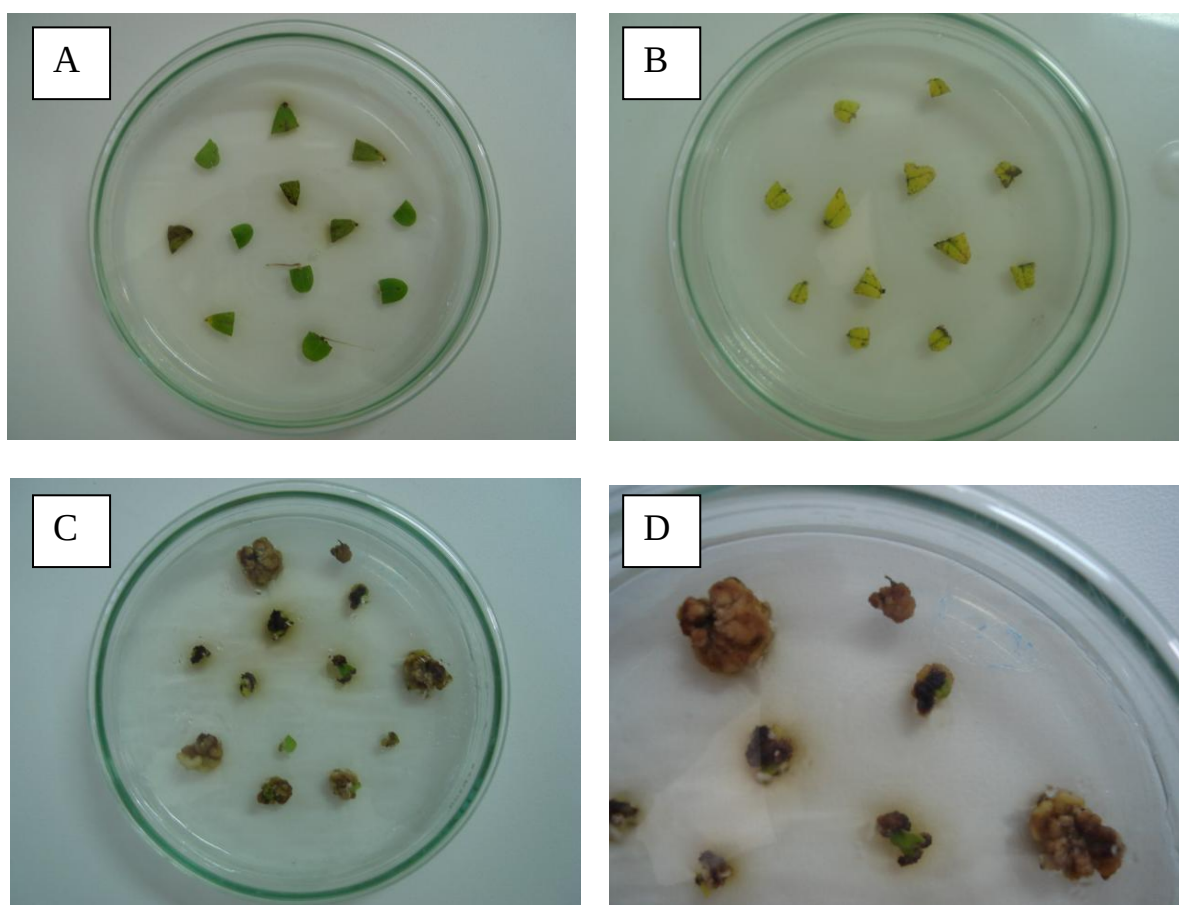


Fig.33. Ensaios *in vitro* para formação de calos obtidos das folhas de *S. multijuga*. **A-** Folhas seccionadas em meio de cultura sem reguladores (escuro). **B-** Folhas sem reguladores (claro). **C-** Formação de calos com tratamento de 2,4D (1,5mg/L) (escuro). **D-** Detalhe de calos de C.

Após cerca de 45 dias, foi observada a formação de calos em apenas placas com tratamento de 2,4D a 1,5mg/L estocadas em ambiente escuro. Mesmo neste ambiente ocorreu oxidação nos calos (Fig.33C/D).

Para tentar resolver o problema de oxidação, os experimentos foram repetidos com a adição de antioxidantes como o ácido cítrico, o ácido ascórbico e o polivinilpolipirrolidona (PVPP), em concentrações de 2, 5 e 10mg/L. As placas, desta vez, foram estocadas em ambiente escuro somente.

Novamente após cerca de 45 dias, os resultados mostraram que a oxidação persistiu em todos os casos. A figura 34 mostra uma placa com tratamento de PVPP a 10mg/L.

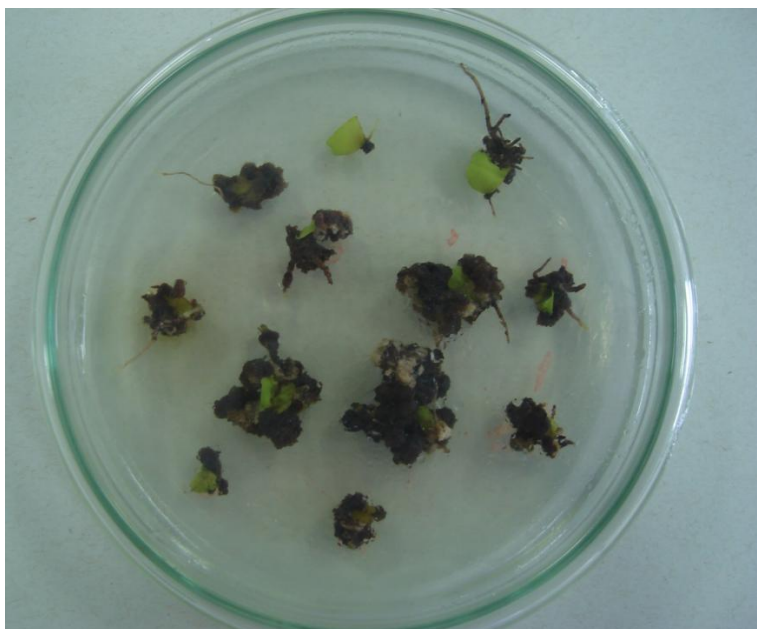


Fig.34. Ensaio *in vitro* revelando formação de calos oxidados. Tratamento com PVPP (10mg/L).

Mesmo havendo oxidação, os calos foram retirados do meio de cultura das diversas placas, formando um “pool” e analisados com relação à presença de alcalóides piridínicos. As plântulas cultivadas *in vitro* separadas em folhas, caules e raízes também foram analisadas para a presença de alcalóides. O protocolo usado para extração de alcalóides foi o de ácido-base (Sriphong, 2003).

Os resultados foram negativos tanto para os calos oxidados quanto para os órgãos separados das plântulas.

Estudos de cultura *in vitro* de *S. multijuga* podem ser aprofundados para tentar obter resultados positivos com relação a formação de calos e produção de alcalóides piridínicos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho mostrou que os alcalóides piridínicos estão presentes em todos os órgãos de *S. multijuga*, com predominância nas folhas, inclusive em indivíduos jovens, com 3, 6 e 9 meses de idade. Com relação aos indivíduos adultos, foram coletados todos os órgãos disponíveis nas diferentes fases, exceto as raízes. Como as raízes de indivíduos jovens não apresentaram alcalóides, foi decidido tirar um pouco de raiz, pelo menos de 1 indivíduo adulto para comparação. Também foi sugerido que sementes fossem analisadas para verificar a presença de alcalóides. Após os procedimentos de extração, e análises para revelação de alcalóides, os resultados foram negativos quanto à presença dos mesmos.

O artigo do trabalho realizado está em fase de redação e será submetido ao “**Journal of Chemical Ecology**”.

6. CONCLUSÕES

- Alcalóides piridínicos foram encontrados e quantificados em todos os órgãos de *S. multijuga*, nas diferentes fases fenológicas durante os anos de 2007 e 2008, com predominância nas folhas;
- Os alcalóides também foram encontrados em plantas jovens, com predominância nas folhas;
- Todas as frações apresentaram atividade biológica na inibição da enzima AChE, sendo que a melhor atividade corresponde à maior concentração de alcalóides nas frações (folhas);
- A análise de alcalóides de *S. multijuga* foi eficiente através de cromatografia a gás (CG/FID);
- Experimentos de cultura *in vitro* revelaram que as sementes de *S. multijuga* germinam sem maiores problemas, entretanto para a formação de calos não oxidados e produção de alcalóides são necessárias novas tentativas e estudos.

7. RESUMO

A fenologia é um estudo que identifica os fenômenos de floração, frutificação, brotamento e queda de folhas, nas suas mais diferentes e intensas fases, objetivando o conhecimento do ciclo anual das espécies em estudo, o qual está diretamente relacionado às condições climáticas e ao caráter adaptativo de cada espécie em sua área de dispersão. A observação das fenofases ou fases fenológicas das espécies é uma prática que vem sendo realizada desde os primórdios das civilizações, quando o homem, necessitando de alimento, buscou diferenciar quais espécies poderiam ser utilizadas em sua alimentação nos diferentes períodos do ano. Em estudos realizados com algumas espécies de plantas, mostraram que metabólitos secundários podem ser acumulados em diferentes órgãos e tecidos durante as fases fenológicas (floração, frutificação, dormência e brotação). Sabe-se também que tecidos mais novos “geralmente” possuem maior taxa biossintética de metabólitos, tais como óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonóides e alcalóides. A espécie *Senna multijuga* (Fabaceae), ocorre principalmente em regiões de Mata Atlântica, sendo popularmente conhecida como pau-cigarra, caquera, aleluia ou canafístula. Dois alcalóides piridínicos (7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona) foram identificados nas folhas de *Senna multijuga*, cujas estruturas moleculares ainda não haviam sido descritas na literatura. Estes alcalóides apresentam um grande potencial com relação a novas substâncias bioativas, como por exemplo a atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE), que está envolvida na Doença de Alzheimer e miastenia grave e, ainda, atividade contra fungos fitopatogênicos, como *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Com o objetivo de analisar os alcalóides piridínicos em diferentes órgãos de *Senna multijuga* (folhas, flores, frutos e caules), amostras de 4 indivíduos adultos foram coletadas durante 2 anos em áreas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Instituto de Botânica de São Paulo. Análises de alcalóides também foram feitas com plantas jovens (3, 6 e 9 meses de idade), além de ensaios de cultura *in vitro*. Os alcalóides piridínicos foram extraídos de diferentes órgãos pelo método ácido-base e análises

quantitativas foram feitas por cromatografia a gás (CG-FID), utilizando-se um padrão interno (PI). Dados de temperatura, precipitação e irradiação solar foram utilizados no presente estudo. O ensaio para avaliação da inibição da enzima AChE foi realizado em microplaca. Os resultados mostraram que os alcalóides piridínicos 7'-multijuguinona e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona estão presentes em todos os órgãos de *Senna multijuga*, coletados em diferentes fases fenológicas, e estão presentes também em órgãos de plantas jovens, exceto nas raízes. A concentração desses alcalóides pode variar em cada órgão da planta, sendo que a maior concentração foi observada nas folhas ($p < 0,05$).

8. ABSTRACT

Phenology is the science that identifies the phenomenon of flowering, fruiting, budding and leaf fall, in its different stages and intense, aimed at understanding the annual cycle of the species studied, which is directly related to climatic conditions and character adaptive for each species in its area of distribution. The observation of the phenological phases of species is a practice that has been done since the early civilization, when man, in needing for food, which sought to differentiate the species could be used in their food in different seasons. There are many studies with different species of plant showing that secondary metabolites can accumulate in different organs during the phenological stages (flowering, fruiting, dormancy and sprouting). It is also known that younger tissues generally have higher rates of biosynthetic metabolites, such as essential oils, phenolic acids, flavonoids and alkaloids. *Senna multijuga* (Fabaceae), occurs almost everywhere in the country, mainly in the Atlantic and it is popularly known as pau-cigarra, caquera, alleluia ou canafístula. Two pyridine alkaloids (7'-and 12' multijuguinona-hydroxy-7'-multijuguinona) were identified from the leaves of *Senna multijuga*, whose molecular structure had not yet been described. Such compounds have great potential with regard to new bioactive substances, such as the inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE), which is involved in Alzheimer's disease and Miastenia grave and also activity against phytopathogenic fungi such as *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium sphaerospermum*. Aiming to analyze the pyridine alkaloids in different organs of *Senna multijuga* (leaves, flowers, fruits and stems), 4 samples of adults were collected during two years in areas of the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Instituto de Botânica de São Paulo . Analysis of alkaloids have also been made with young plants (3, 6 and 9 months of age), and culture assays in vitro. Pyridine alkaloids were extracted from different organs by the acid-base method and quantitative analysis were made by gas chromatography (GC-FID), using an internal standard (IS). Temperature, precipitation and solar radiation data were used in the present study. The assay for assessment of inhibition

of AChE was performed in microplates. The results showed that the pyridine alkaloids multijuginona 7'-12'-hydroxy-and 7'-multijuginona are present in all organs of *Senna multijuga* collected in different phenological stages, and are also present in organs of young plants, except roots . The concentration of these alkaloids can vary in each plant organ, and the highest concentration was observed in leaves ($p < 0.05$).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, M. N. 2003. Alocação de alcalóides tropânicos em *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). Tese de Doutorado. Curso de pòs-Graduação em Biologia Vegetal. Instituto de Biologia. UNICAMP, 92p.

Andreis, C.; Longhi, S. J.; Brun, E. J.; Wojciechowski, J. C.; Machado, A. A.; Vaccaro, S.; Cassal, C. Z. 2005. Estudo fenológico em três fases sucessionais de uma floresta estacional decídual no município de Santa Tereza, RS, Brasil. *Revista Árvore*, 29(1): 55-63.

Brown, J.T. & Charlwood, B.V. 1986. Differentiation and monoterpene biosynthesis in plant cell cultures. In: P. Morris, A.H. Scragg, A. Stafford & M.W. Fowler (eds). *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 68-74.

Bruneton, J. 1999. *Pharmacognosy: phytochemistry medical plants*. 2nd ed. Paris: Intercept. pp 856-865.

Carvalho, P. E. R. 1994. Espécies florestais brasileiras. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa-cnpf/spi, Brasília, 676p.

Carvalho, P. E. R. 2004. Pau-Cigarra – *Senna multijuga*. Circular Técnica da Embrapa/92.

Cheng, X. F.; Meng, Z.; Chen, Z. 1998. A pyridine-type alkaloid from *mallotus apelta*. *Phytochemistry*. 49(7): 2193.

Collins, C.H. 2006. *Fundamentos de cromatografia*. Unicamp, Campinas, 452p.

Copeland, R. A 2005. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal Chemists and Pharmacologists*, Wiley: New Jersey.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, pp.1250-1318.

Dewick, P. M. 2002. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Second Edition. Chichester – New York: John Wiley & Sons Ltd.

Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411: 843–847.

Doan, A.T.; Erwin, G.; Felton, G. 2004. Temporal effects on jasmonate induction of anti-herbivore defense in *physalis angulata*: seasonal and ontogenetic gradients. *Biochem. Syst. Ecol.* 32(2): 117-126.

Fay, M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plant using in vitro methods. *In vitro cell. Dev. Biol.* 28: 1- 4.

Ferreira, R.A.; Davide, A.C.; Motta, M.S. 2004. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn. E *Senna macranthera* (Collad.) Irwin et Barn., num banco de sementes em solo de viveiro. *Revista Brasileira de Sementes*. 26(1): 24-31.

Frankie, G.W.; Baker, H.G.; Opler, P.A. 1974. Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology*. 62(3): 881-919.

Gerson, E.A.; Kelsey, R.G. 1998. Piperidine alkaloids in nitrogen fertilized *Pinus ponderosa*. *Journal of Chemical Ecology*. 25(9): 2027-2039.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*. 30(2): 374-381.

- Häkkinen, S. T.; Tilleman, S.; Świątek, A.; Sutter, V.; Rischer, H.; Vanhoutte, I.; Van Onckelen, H.; Hilson, P.; Inzé, D.; Oksman-Caldentey, K.; Goossens, A.** 2007. Functional characterisation of genes involved in pyridine alkaloid biosynthesis in tobacco. *Phytochemistry*. 68: 2773-2785.
- Hamburger, M.; Marston, A.; Hostettmann, K.** 1991. *Advances in Drug Research*. 20: 167-215.
- Hartmann, T.** 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Exp.* 80: 177-188.
- Hashimoto, T.; Yamada, Y.** 1994. Alkaloid biogenesis: Molecular aspects. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 45: 257–285.
- Hendricks, H.; Wildeboer, Y.A.; Engels, G.; Bos, R.; Woerdenbag, H.J.** 1997. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. *Planta Med.* 63: 356-359.
- Henriques, A.T.; Limberger, R.P.; Kerber, V.A.; Moreno, P.R.H.** 1999. Alcalóides generalidades e aspectos básicos. *In: farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5º ed. Ufrgs editora.
- Hibi, N.; Higashiguchi, S.; Hashimoto, T.; Yamada, Y.** 1994. Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell*. 6: 723–735.
- Höft, M.; Verpoorte, R.; Beck, E.** 1996. *Oecologia* . (107) 160.
- Hogedal, B.D.; Molgaard, P.** 2000. Hplc analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *antirrhinum majus*. *Biochemical systematics and ecology*. 28: 949-962.

Horiuch, M.; Murakami, C.; Fukamiya, N. Yu D.; Chen, TH.; Bastow, KE.; Zhang, DC.; Takaishi, Y.; Imakura, Y.; Lee, KH. 2006. Tripfordines A-C, sesquiterpene pyridine alkaloids from *Tripterygium wilfordii*, and structure anti-HIV activity relationships of *Tripterygium* alkaloids. J. Nat. Prod. 69(9): 1271-74.

Hostettmann, K.; Wolfender, J.L. & Rodrigues, S. 1997. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med.* 63: 2-10.

Irwin, S.H.; Barneby, R. 1982. *Memoirs of the New York Botanical Garden.* V.35, part 2, Bronx, New York.

Itenov K.; Molgaard P.; Nyman U. 1999. Diurnal fluctuations of the alkaloid concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day-night fluctuations of the latex water content. *Phytochemistry.* 52 (7): 1229-1234.

Kitamura, Y.; Miura, H.; Sugii, M. 1985. Change of Alkaloid Distribution in the Regenerated Plants of *Duboisia myoporoides* during development. *Planta Med.* 51(6): 489-491.

Kowalski, R.; Wolski, T. 2006. Evaluation of phenolic acid content in *Silphium perfoliatum* L., leaves, inflorescences and rhizomes. *Electron. J. Polish Agric. Univ.*, 6(1).

Laukkanen, H.; Haggman, H.; Kontunen-Soppela, S.; Hohtola, A. 1999. Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: role of peroxidase and polyphenol oxidase, *Plant Physiology, Bethesda.* 106: 337-343.

Lewis, G.P. 1987. *Legumes of bahia.* Royal Botanic Gardens. Kew, England. 369p.

Lorenzi, H. 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.* Vol.1. Editora Plantarum. Nova Odessa. Sp.

- Loyola-Vargas, V.M. & Vazquez-Flota, F.** 2006. Plant cell cultures protocols. 2 ed. Humana Press Inc. New Jersey, Totowa.
- Martins, E.R.; de Castro, D.M.; Castellani, D.C.; Dias, J.E.** 1995. Plantas Medicinais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 220p.
- Marston, A; Kissling, J; Hostettmann, K.** 2002. A rapid tlc bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Analysis*. 13: 51-54
- Mazzafera, P.** 2004. Catabolism of caffeine in plants and microorganisms. *Front. Biosci.* 9: 1348-1359.
- Menkovic, N.; Savikin-Fodulovic, S. K.** 2000. Chemical composition and seasonal variations in the amount of secondary compounds in *Gentiana lutea* leaves and flowers. *Planta Med* . 66: 178-180.
- Mole, S.; Waterman, P. G.** 1987. Tannins as Antifeedants to Mammalian Herbivores: Still An Open Question? In: *Allelochemicals: Role In Agriculture And Forestry* (Eds.): G.R. Waller. pp. 572-587. American Chemical Society, Washington, DC.
- Mole, S.; Ross, J. A. M.; Waterman, P. G.** 1988. Light induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. I. Chemical Changes. *J. Chem., Ecol.* 14: 1-21.
- Morellato, L. P. C. & Leitão-Filho, H. F.** 1990. Estratégias fenológicas de espécies arbóreas em floresta mesófila na Serra do Japi, Jundiaí, SP. *Revista Brasileira de Biologia*. 50: 163-173.

Newstrom, L.E.; Frankie, G. W.; Baker, H. G. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica*. 26(2): 141-159.

Pereira, A. M. S. 2003. Cultura de tecidos de plantas medicinais. Editora da União das Faculdades do Centro-Norte. Cuiabá-MT. 1: 183-193.

Peres, L. E. P. 2004. Metabolismo Secundário. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ – 25p.

Polhill, R.M.; Raven, P.H. 1981. Advances in legumes systematics. Part 2. Royal Botanic Gardens, Kew, England. 1040p.

Rech, S.B.; Batista, C.V.F.; Schripsema, J.; Verporte, R.; Henriques, A.T. 1998. Cell culture of *Rauwolfia sellowii*: Growth and alkaloid production. *Plant cell, tissue and organ culture*. 54: 61-63.

Salisbury, F. B.; Ross, C. W. 1991. Plant Physiology, 4th ed., Wadsworth Publishing Co.: Belmont.

Serrano, M.A.R. 2006. Estudo da composição química de *Senna multijuga* (leguminosae). Tese de mestrado. Unesp-Universidade Estadual Paulista. Araraquara, São Paulo, Brasil.

Serrano, M.A.R.; Pivatto, M.; Francisco, W.; Danuello, A.; Regasini, L.O.; Lopes, E.M.C.; Lopes, M.N.; Young, M.C.M.; Bolzani, V.S. 2010. Acetylcholinesterase inhibitory pyridine alkaloids of the leaves of *Senna multijuga*. *J. Nat. Prod.* 73(3): 482-84.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. 2001. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3º ed. UFRGS, Rio Grande do Sul. 834p.

- Smolenski, S.J.; Kinghorn, A.D.** 1981. Alkaloids of Caesalpinioideae and Mimosoideae. *In*: **Polhill, R.M.; Raven, P.H.** 1981. Advances in legumes systematics. Part 2. Royal Botanic Gardens, Kew, England. 1040p.
- Spring, O.; Bienert, U.** 1987. Should we be concerned about herbal remedies? *J Plant Physiol.* 130: 441-443.
- Springer, T.L.; McGraw, R. L.; Aiken, G. E..** 2002. Variation of condensed tannins in roundhead *Lespedeza* germplasm. *Crop Sci.*, 42: 2157-2160.
- Sriphong, L.; Sotanaphun, U.; Limsirichaikul, S.; Wetwitayaklung, P.; Pummangura, S.** 2003. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. *Planta medica.* 69: 1051-1054.
- Sugimoto, H.; Ogura, H.; Arai, Y.; Iimura, Y.; Yamanishi, Y.** 2002. Research and development of Donepezil hydrochloride, a new type of acetylcholinesterase inhibitor. *Japanese Journal of Pharmacology.* 89: 7-20.
- Taiz, I.; Zeiger, E.** 2004. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre, Artmed. 719p.
- Trevisan, M.T.S.; Macedo, F.V.V.** 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quim. Nova.* 26(3): 301-304.
- Verpoorte, R.; Van der Heijden, Hoopen. and Memelink, J.** 1998. Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tissue Culture and Biotechnology.* 4: 3-20.
- Verpoorte, R.** 2000. Secondary metabolism. *In*: Verpoorte, R. & Alfermann, A.W. Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers, London, pp.1-29.

Viegas Jr, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química nova*. 26(3): 390.

Viegas Jr, C.; Bolzani, V.S.; Furlan, N.; Barreiro, E.J.; Young, M.C.M.; Tomazela, D.; Eberlin, M.N. 2004. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. *J. Nat. Prd.* 67: 908.

Viegas Jr, C.; Rezende, A.; Silva, D.H.S.; Castro-Gambôa, I.; Bolzani, V.S. 2006. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Quim. Nova*. 29(6): 1279-1286.

Williams-Linera, G.; Meave, J. 2002. Patrones Fenológicos. Manuel R. Guariguata & Gustavo H. Kattan. In: *Ecologia Y Conservacion De Bosques Neotropicales*. Universidad Nacional Autonoma. 407-428p.

Zheng, XQ.; Nagai, C.; Ashihara, H. 2004. Pyridine nucleotide cycle and trigonelline (*N*-methylnicotinic acid) synthesis in developing leaves and fruits of *Coffea arabica*. *Physiol. Plant.* 122: 401-411.

10. ANEXOS