

ÁCIDO MYRSINOICO A E DERIVADO: INIBIDORES DA FOTOSSÍNTESE *IN VITRO*

Marcela Carmen de M. Burger, Gracielle S. de Oliveira e Antônio Carlos S. Menezes

Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás - Br 153, 3105, 75132-903 Anápolis - GO, Brasil

Paulo Cezar Vieira e Maria Fátima das G. F. da Silva

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, km 235, 13565-905 São Carlos - SP, Brasil

Thiago A. M. Veiga*

Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Rua Prof. Artur Riedel 275, 09972-270 Diadema - SP, Brasil

Recebido em 27/10/11; aceito em 14/2/12; publicado na web em 30/4/12

MYRSINOIC A ACID AND ITS DERIVATIVE: IN VITRO INHIBITORS OF PHOTOSYNTHESIS. Myrsinoic A acid, isolated from *Myrsine cuneifolia* and its hydrogenated derivative had their effect on photosynthesis tested. The compounds inhibited the electron flow (basal, phosphorylating and uncoupled) from water to methylviologen; therefore, they act as Hill reaction inhibitors in spinach thylakoids. They inhibited partial reactions of PSII electron flow from water to 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone, from water to sodium silicomolybdate, and partially electron flow from diphenylcarbazine to 2,6-dichloroindophenol. Their inhibition sites were at the donor and acceptor sides of PSII, between P_{680} and Q_A . Chlorophyll *a* fluorescence measurements confirmed the behavior of the compounds (*pool* of quinones).

Keywords: *Myrsine cuneifolia*; myrsinoic A acid; photosynthesis.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é um bioma de destaque mundial devido à alta biodiversidade e à ocorrência de espécies endêmicas, sendo o segundo maior bioma brasileiro, superado em área apenas pela Amazônia. Dentre as diversas famílias de plantas que compõem o Bioma Cerrado, encontra-se a família Myrsinaceae, que engloba cerca de 33 gêneros, com 1000 indivíduos largamente distribuídos pelas regiões tropicais do planeta.^{1,2}

Vários compostos isolados de espécies do gênero *Myrsine*, família Myrsinaceae, foram descritos com atividades biológicas, tais como, rapanona, atividade bactericida.³ A citotoxicidade de rapanona foi testada, e observou-se a atividade frente a quatro linhagens de células de: adenocarcinoma (HT-29), epiteloma (Hep-2), câncer de mama (MCF-7) e câncer de estômago (MKN-45).⁴

Através de uma breve revisão bibliográfica, verificou-se que a espécie *Myrsine cuneifolia* (Myrsinaceae) não possuía dados químicos publicados até o momento. Em função disto, bem como do grande potencial biológico apresentado por metabólitos produzidos pelo gênero e, ainda, pelo fácil acesso à planta, a mesma foi escolhida para estudo.

Os produtos naturais têm se mostrado como uma das fontes mais ricas e promissoras de novos compostos com atividade fitotóxica e reguladora do crescimento de plantas.⁵⁻⁹ Contudo, o uso de produtos naturais como herbicidas, ou como modelos para conduzir programas de descoberta de herbicidas, é uma alternativa que não tem sido explorada tanto quanto foi para inseticidas e fungicidas. Produtos naturais fitotóxicos são, em geral, estruturalmente mais complexos que herbicidas sintéticos e não são economicamente obtidos por metodologias sintéticas tradicionais. Esta área está sendo explorada lentamente,¹⁰ talvez pelo pequeno número de pesquisadores envolvidos na área, pela falta de trabalhos em biotecnologia de produção de herbicidas naturais, ou mesmo, pela falta de ensaios que permitam conhecer o mecanismo de atividade dos compostos de interesse.

Nossos estudos sobre a interação de produtos naturais com os sítios da fotossíntese, visando a busca por modelos para herbicidas baseados em substâncias isoladas de plantas e micro-organismos, inicialmente mostraram-se muito interessantes. Os alcaloides flindersina e N-metil-flindersina se comportam de maneira semelhante ao herbicida comercial DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia).¹¹ A N-metil-flindersina apresenta ainda um segundo mecanismo de ação, pois interfere na oxidação da plastoquinona (PQH_2). O policetídeo, lasiodiplodina, possui três mecanismos de ação: inibidor da reação de Hill; inibe parcialmente o complexo enzimático que oxida a molécula de água e interage com o complexo proteico CF_1 (centro catalítico do ATPase), através da inibição da atividade de $CF_1 - Mg^{2+} - ATPase$.¹² A cumarina, siderina, também inibe a reação de Hill; inibe tanto o lado doador, quanto o lado receptor de elétrons do FSII (Fotosistema II) entre $P_{680} - Q_A$ (Centro reacional do FSII - Quinona A), criando os chamados centros silenciosos de reação, o que pode levar ao desenvolvimento de agentes fitotóxicos contra a fotossíntese de plantas daninhas.¹³ Dentro desse contexto, o metabólito isolado do extrato dos frutos de *Myrsine cuneifolia* e seu derivado foram submetidos a uma série de reações enzimáticas que auxiliaram no esclarecimento do (s) mecanismo (s) ação frente à fotossíntese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito das substâncias 1 e 2 sobre o transporte de elétrons não cíclico: reação de Hill

A formação de ATP pode ser inibida em qualquer uma das etapas da cadeia transportadora de elétrons.¹⁴ Dessa forma, para conhecer o efeito dos derivados de ácidos benzoicos sobre a produção de energia, foram investigados seus mecanismos de ação nas três etapas da cadeia de transporte de elétrons. Os resultados mostraram que a evolução de oxigênio em cloroplastos iluminados, tendo metilviologênio (MV) como receptor de elétrons foi inibida na presença de ADP e fostato

*e-mail: tveiga@unifesp.br

inorgânico (Pi). Observou-se que a inibição foi completamente realizada pela presença de NH_4Cl como desacoplante (Figura 1).

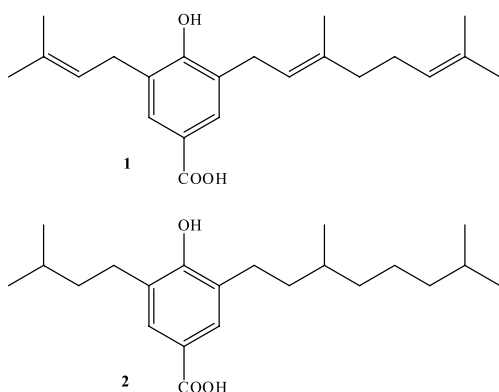


Figura 1. Estrutura química do ácido myrsinoico A (**1**) isolado de *M. cuneifolia* e seu derivado (**2**)

Os reagentes que bloqueiam o transporte de elétrons também inibem a síntese de ATP, a partir da formação do gradiente eletroquímico transmembrana. A força de saída para a síntese de ATP é dependente do fluxo de elétrons. Os compostos que aumentam a permeabilidade de prótons nas membranas de tilacoide desacoplam a fosforilação do fluxo de elétrons. Os agentes desacoplantes inibem a síntese de ATP pela diminuição do gradiente de prótons, porém o transporte de elétrons ainda pode ocorrer sob taxas elevadas. Em contraste, os inibidores diretos da fosforilação oxidativa bloqueiam tal fenômeno e, ainda, a porção do transporte de elétrons, que é consequência do fluxo de prótons ligado à fosforilação.¹⁵ Assim, a inibição descrita da fosforilação produzida pelas substâncias **1** e **2** pode ser explicada pelo seu efeito em cada uma das etapas da cadeia transportadora, através de reações de transferência de energia.

Avaliou-se o efeito dos compostos **1** e **2** sobre as razões de transporte de elétrons em diferentes condições (basal, fosforilante e desacoplado). Na ausência (basal) ou presença (fosforilante) de ADP, Pi, ou NH_4Cl (desacoplado) e usando MV como acceptor de elétrons, os compostos **1** e **2** inibiram a velocidade do transporte de elétrons em cloroplastos iluminados (Figuras 2 e 3). Observou-se que todas as condições do fluxo de elétrons foram inibidas pela substância **1**, com valores de I_{50} de 32,0; 57,0 e 77,0 μM para os transportes basal, fosforilante e desacoplado, respectivamente. O composto **2** apresentou comportamento similar, pois apresentou valores de I_{50} de 25,0; 42,0 e 62,0 μM . A partir desses resultados foi possível concluir que ambos os compostos podem ser classificados como inibidores da reação de Hill.

Localização dos ambientes de interação dos derivados de ácidos benzoicos sobre FSII e FSI e suas reações parciais

Com o objetivo de determinar os sítios de interação na cadeia de transporte de electrons nos tilacoídes, foram analisados os efeitos de **1** e **2** sobre o FSII desacoplado, FSI (Fotosistema I) e suas respectivas reações parciais, usando-se doadores e aceptores artificiais de elétrons, bem como os inibidores apropriados.¹⁶ As substâncias **1** e **2** inibiram o fluxo de elétrons do FSII de H_2O a DCBQ (2,5-dicloro-1,4-benzoquinona) (Figura 4), de H_2O a SiMo (Figura 4) e, ainda, de DPC (difencilcarbazida) a DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) (Tabela 1). Os ácidos **1** e **2** apresentaram I_{50} de 113,0 e 138,0 μM , respectivamente, para a reação FSII: H_2O – DCBQ. Já para a reação parcial FSII: H_2O – SiMo os valores de I_{50} obtidos foram de 151,0 (**1**) e 167,0 (**2**) μM . Verificou-se ainda que **1** e **2** inibiram em 46 e 48%, respectivamente, a 300 μM a reação FSII: DPC – DCPIP (Tabela 1).

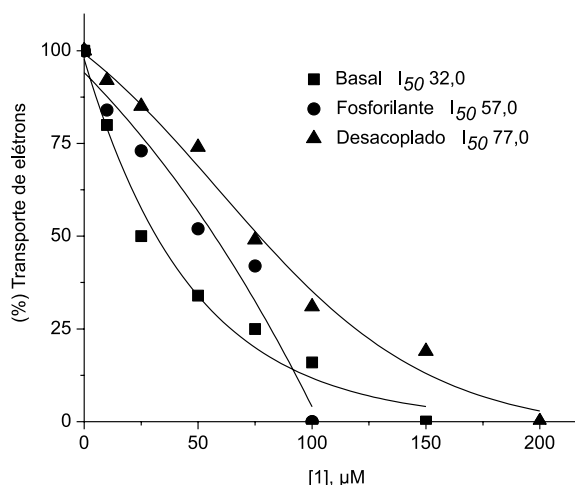


Figura 2. Efeito do composto **1** sobre o fluxo de elétrons (basal, fosforilante e desacoplado) de H_2O – MV em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. Valores das razões dos controles basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) foram 192, 345 e 686 $\mu\text{equiv e}^- \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$, respectivamente

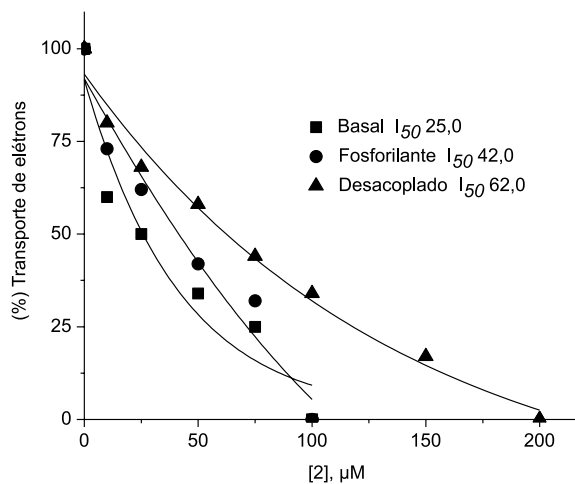


Figura 3. Efeito do composto **2** sobre o fluxo de elétrons (basal, fosforilante e desacoplado) de H_2O – MV em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. Valores das razões dos controles basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) foram 192, 345 e 686 $\mu\text{equiv e}^- \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$, respectivamente

As medidas polarográficas indicaram que o transporte de elétrons no FSII é afetado na presença dos compostos **1** e **2**, prendendo-se ao sítio da ação da quinona A (Q_A), impedindo a transferência de elétrons entre o centro reacional do FSII (P_{680}) e Q_A . Pode-se dizer então que as substâncias **1** e **2** afetam o FSII tanto pelo lado doador quanto pelo lado acceptor de elétrons, prendendo-se ao sítio catalítico localizado entre P_{680} – Q_A (pool das quinonas). A criação de centros de reação “silenciosos” pode ser um dos mecanismos de ação de **1** e **2** e ainda representa um caminho útil para o desenvolvimento de modelos para herbicidas inibidores da fotossíntese de plantas daninhas. Por outro lado, esses compostos não apresentaram efeito sobre o FSI (dados não apresentados).

Medidas dos transientes da fluorescência da Chl a na presença dos compostos 1 e 2

No intuito de colaborar para o esclarecimento do(s) sítio(s) de interação das substâncias **1** e **2** sobre o FSII, cloroplastos frescos e lisos foram incubados por 10 min no escuro, à temperatura ambiente com

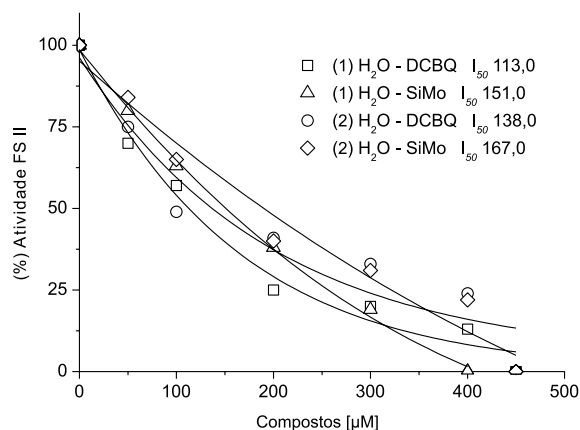


Figura 4. Efeito dos compostos **1** e **2** sobre o fluxo de elétrons no FSII: $H_2O - DCBQ$ e FSII: $H_2O - SiMo$ em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. O valor da razão do controle foi de 545 e 356 $\mu\text{equiv } e^- h^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Chl}$, respectivamente

Tabela 1. Efeito dos compostos **1** e **2** sobre o transporte de elétrons do FSII desacoplado de DPC - DCPIP

[]	mols DCPIP _{red} / mg Chl h		mols DCPIP _{red} / mg Chl h	
	1	%	2	%
0	240	100	240	100
50	202	84	228	95
100	173	72	184	76
200	170	70	150	62
300	130	54	125	52

200 μM de cada uma das substâncias, DCMU 50 μM e Tris 0,8 M, os quais foram usados como controle positivo (Figura 5). O controle dos tilacoides mostrou uma curva de fluorescência polifásica com uma sequência OJIP de transientes similares àqueles previamente publicados por Strasser *et al.*¹⁷ A adição de 50 μM do herbicida DCMU induz um rápido aumento do rendimento da fluorescência durante os primeiros 2 ms de iluminação; isto transforma a sequência regular OJIP numa curva OJ.¹⁷ Quando os cloroplastos são tratados com tris,

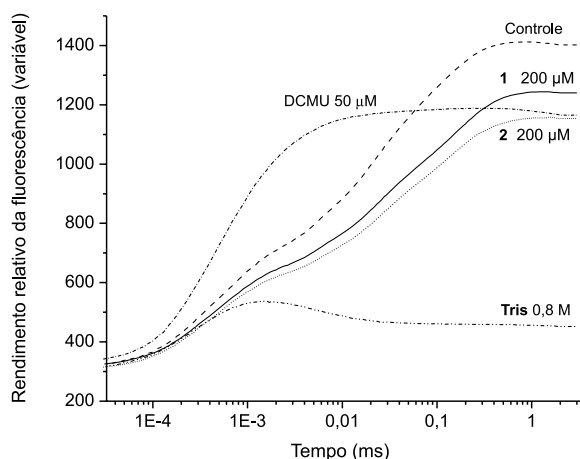


Figura 5. Aumento cinético da fluorescência de cloroplastos frescos e lisos infiltrados com os ácidos **1** e **2**, DCMU 50 μM e tilacoides tratados com Tris 0,8 M. Os controles dos cloroplastos são mostrados para comparação. As curvas de indução de fluorescência (Chl *a*) foram medidas à temperatura ambiente. Os dados são médias de cinco repetições

verifica-se a redução na indução da fluorescência.¹⁸ Isto resulta na redução do rendimento máximo da fluorescência, a banda-K aparece e consiste de um rápido aumento (a 300 μs) seguido por uma redução no rendimento da fluorescência a um nível próximo a F_0 (fluorescência inicial onde todos os níveis, J e I estão ausentes do transiente).^{19,20} As condições dos tilacoides tratados com tris são mostradas também por cloroplastos tratados-aquecidos onde as perdas no OEC (complexo de evolução de oxigênio) ocorrem.

A análise da diferença de cada curva do controle da fluorescência relativa variável, quando a fase O - J foi normalizada entre $F_j - F_0$, $W_t = F_{v,t}/(F_j - F_0)/(F_j - F_0)$, mostra um aumento na supressão do nível J (a 2 ms) e um rápido aumento a aproximadamente 300 μs aparece na presença de **1** e **2**, indicando claramente a criação de uma banda K (Figura 6). O aparecimento da banda K surge a partir de um desequilíbrio no fluxo de elétrons entre os doadores e aceptores de elétrons do sítio do FSII. Nesta condição, o fluxo de elétrons do OEC a Z (resíduo de tirosina) é mais lento que o fluxo de elétrons do P_{680} a Q_A . O rápido aumento da fluorescência inicial é devido à redução de Q_A a Q_A^- seguida pela redução de $P680^+$ por Z sem a participação direta do complexo OEC.¹⁹

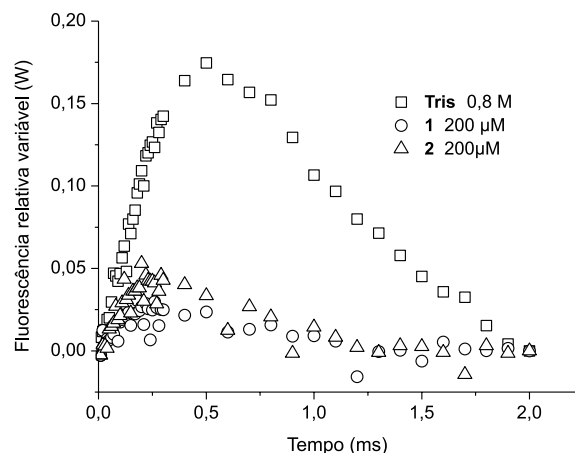


Figura 6. Aparecimento da banda K em aproximadamente 300 μs . Diferença de cada curva do controle com a fluorescência variável normalizada na amplitude $F_j - F_0$. Ácido **192** a 200 μM (o) e derivado **193** a 200 μM (Δ). Cloroplastos incubados com 0,8 M Tris (\square)

A análise do transiente da fluorescência (Chl *a*) claramente indica que o fluxo de elétrons no OEC foi inibido pelos compostos. Quando o OEC é inibido, não há doação de elétrons a Y_z , que por sua vez não reduz P_{680}^+ ; dentro deste contexto, ocorre uma máxima acumulação de P_{680}^+ , $Pheo^+$ e Q_A^- . Strasser *et al.*²¹ propuseram o termo “centro de reação silencioso” como os centros que não podem nem reduzir Q_A e nem voltar a transferir sua energia de excitação às moléculas antena (clorofilas); portanto, as unidades correspondentes ao FSII não contribuem para a fluorescência variável e seus rendimentos de fluorescência são menores.²⁰ Os valores de F_0 foram quase constantes e de F_M diminuíram na presença de **1** e **2**, e os valores mais baixos da área sobre a curva entre F_0 e F_M (Tabela 2) indicam que a transferência de elétrons ao sítio da quinona é bloqueada. Assim, a quinona A (Q_A) do FSII não é reduzida, e estes resultados sugerem a criação dos centros de reação silenciosos,²⁰ devido à interferência das substâncias **1** e **2**.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos gerais

Os experimentos de RMN 1D (^1H , ^{13}C) foram adquiridos em

Tabela 2. Efeito do DCMU, das substâncias **1** e **2** sobre os parâmetros da fluorescência de tilacoides previamente incubados por 10 min no escuro, e com tris 0,8 M, pH 8,0

Substância	F _o	F _M	F _v /F _M	Área
Controle	304	1412	0,785	48821
DCMU (50 µM)	305	1188	0,743	2421
Tris (0,8 M)	299	537	0,443	0
1 (200 µM)	308	1244	0,752	65648
2 (200 µM)	297	1158	0,744	58925

CDCl₃ em espectrômetro Bruker Avance III - 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para carbono), equipado com trocador automático de amostra e sonda de 5 mm BFO (*smart probe* com ATMA®).

Material vegetal

Os frutos de *Myrsine cuneifolia* foram coletados no mês de setembro de 2008, em Anápolis-Goiás, no Campus da Universidade Estadual de Goiás, e identificados pela Prof^a Dr^a M. L. dos Santos. A exsicata, n.º. 4215, do material vegetal foi depositada no herbário do departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Goiás.

Extração e isolamento dos constituintes

Os frutos secos de *M. cuneifolia* (400 g) foram macerados e extraídos exaustivamente em etanol a frio. O solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório (45 °C), o que permitiu a obtenção de 62 g do extrato bruto etanólico (MCFrE). Esse extrato foi fracionado por cromatografia em coluna ($\phi = 3,0 \text{ cm} \times h = 20,0 \text{ cm}$), utilizando-se como fase estacionária celulose microcristalina D e eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obtendo-se as frações: hexânica (MCFrEH - 10 g), diclorometânica (MCFrED - 4 g), acetato de etila (MCFrEA - 5 g) e metanólica (MCFrEW - 30 g).

A fração MCFrEH (1 g) foi fracionada por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica *flash* (230-400 Mesh) e como fase móvel diclorometano-acetato de etila 5% ($\phi = 3,0 \text{ cm} \times h = 19,0 \text{ cm}$), o que gerou 22 frações. A reunião das frações 5 - 12, forneceu a o ácido myrsinoico **1** (0,4 g).

Ácido 3-geranil-4-hidroxi-5-(3"-metil-2"-butenil)-benzóico: Ácido myrsinoico A (1)

Óleo amarelado. RMN de ¹H [400 MHz, CDCl₃, δ , J (Hz)]: 7,68 (s; H-2), 7,68 (s; H-6), 3,33 (d; J = 7,2; H-1'), 5,01 (t; J = 7,2; H-2'), 2,03 (s; H-4'), 2,03 (s; H-5'), 5,01 (t; J = 7,2; H-6'), 1,61 (s; H-8'), 1,53 (s; H-9'), 1,70 (s; H-10'), 3,33 (s; H-1''), 5,25 (t; J = 7,2; H-2''). RMN de ¹³C [100 MHz, CDCl₃, δ]: 130,0 (C-1); 131,6 (C-2); 121,0 (C-3); 157,4 (C-4); 123,5 (C-5); 127,0 (C-6); 29,0 (C-1'); 120,8 (C-2'); 138,6 (C-3'); 39,4 (C-4'); 26,0 (C-5'); 126,6 (C-6'); 134,5 (C-7'); 25,3 (C-8'); 17,3 (C-9'); 15,9 (C-10'); 29,3 (C-1''); 120,9 (C-2''); 132,6 (C-3''); 25,4 (C-4''); 17,5 (C-5''); 170,4 (COOH).

Hidrogenação catalítica de 1

Solubilizou-se 0,02 g da substância (**1**) em 4 mL de metanol, seguida da adição de 0,01 mg de paládio adsorvido em carvão (Pd/C). O sistema permaneceu sob atmosfera de gás hidrogênio durante 12 h, sob agitação constante; após este tempo filtrou-se sob celite, o que permitiu a obtenção do derivado (**2**) (0,017 g).

Derivado hidrogenado (2)

Sólido branco amorfo. RMN de ¹H [400 MHz, CDCl₃, δ , J (Hz)]: 7,68 (s; H-2), 7,68 (s; H-6), 0,87 (d; J = 6,6; 2CH₃), 0,97 (d; J = 6,6; 2CH₃), 0,96 (d; J = 6,6; CH₃), 2,62 (m; H-1'), 2,62 (m; H-1''), 1,11-1,67 (m, H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-2'' e H-3'').

Avaliação do potencial herbicida: inibição da reação de Hill

As folhas de espinafre foram obtidas nos supermercados da cidade de São Carlos - SP, em seguida lavadas e secas, para posterior seleção das folhas com maior grau de uniformidade. Para extração dos cloroplastos de espinafre (*S. oleracea* L.), as folhas já livres da nervura central e das extremidades basal e apical (25 g) foram trituradas em liquidificador e submetidas à extração com 100 mL do seguinte meio: sacarose (400 mmol L⁻¹), MgCl₂ (5 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e K⁺-tricina (30 mmol L⁻¹) em pH 8,0 (1 mol L⁻¹ KOH). O meio foi homogeneizado e filtrado com o auxílio de um funil e camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado (4000 rpm, 4 °C e 5 min) e o sobrenadante, eliminado. O precipitado contendo os cloroplastos foi dissolvido em 1 mL do mesmo meio usado no isolamento.²²

Para determinar a concentração de clorofila, duas alíquotas de 20 µL da suspensão de cloroplastos foram transferidas para dois tubos de centrifuga contendo 5 mL de acetona (80%), cada. A amostra permaneceu no escuro por 5 min e, depois, foi submetida à centrifugação (4000 rpm e 5 min). Em seguida, foram feitas medidas de absorvâncias do sobrenadante nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm, de acordo com a Equação 1.²³

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20,2 (A_{645}) + 8,02 (A_{663}) \quad (1)$$

Para os ensaios foram utilizadas soluções dos compostos puros, caracterizados e identificados. As soluções das amostras foram preparadas em concentrações variadas, usando solução DMSO (0,5%) como solvente. O fluxo de elétrons fotossintético foi determinado pela captura de oxigênio, utilizando-se um microeletrodo de Clark conectado ao medidor de oxigênio dissolvido, YSI 5300A. Para avaliar a ação das amostras na inibição da reação de Hill, estas foram adicionadas ao meio reacional em concentrações que variaram de 1 a 500 µmol L⁻¹ e as medidas foram comparadas com o controle.²⁴ Para o transporte de elétrons basal, utilizou-se o seguinte meio reacional: clorofila (20 µg mL⁻¹), sacarose (100 mmol L⁻¹), MgCl₂·6H₂O (5 mmol L⁻¹), KCl (10 mmol L⁻¹) e K₃[Fe(CN)₆] (K⁺-tricina), 15 mmol L⁻¹, pH 8 (1 mmol L⁻¹ KOH). A reação teve início com iluminação saturante de 350 W (lâmpada comum) durante 3 min, sob condições aeróbicas.²⁵ Utilizou-se 100 µM de MV [dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio (dicloreto de paraquat)] como aceptor de elétrons. O transporte de elétrons fosforilante foi determinado, assim como o transporte de elétrons basal, adicionando-se à mistura uma solução 1 mmol L⁻¹ de ADP e 3 mmol L⁻¹ K₂HPO₄, KCN (0,1 mmol L⁻¹) para inibir a atividade catalítica. O transporte de elétrons desacoplado foi determinado da mesma forma que o transporte de elétrons basal, adicionando-se à mistura uma solução 5 mmol L⁻¹ de NH₄Cl. As reações parciais na cadeia de transporte de elétrons foram medidas utilizando-se inibidores específicos, como DCMU 10 µmol L⁻¹; 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4-p-benzoquinona (DBMIB) 1 µmol L⁻¹; e os seguintes doadores e aceptores de elétrons: silicomolibdato de sódio (SiMo Na⁺) 100 µmol L⁻¹; difenilcarbazida (DPC) 200 µmol L⁻¹; diaminodureno (DAD), 100 µmol L⁻¹ e metilviologênio (MV) 100 µmol L⁻¹.

Determinação do fluxo de elétrons nos fotossistemas II e I (FSII e FSI) desacoplados e suas reações parciais

O fluxo de elétrons nos FSII e FSI foi medido, assim como no

ensaio para o transporte de elétrons desacoplado. O FSII inicialmente foi medido de H₂O a DCPIP_{reduzido}, ou H₂O a DCBQ, suportados pela evolução de O₂. O meio reacional foi constituído por 1 µM DBMIB, 100 µM DCPIP, 500 µM K₃[Fe(CN)₆] e 6 mM NH₄Cl.²⁵ Em seguida, a substância foi submetida ao transporte de elétrons do FSII (H₂O a SiMo), que foi determinado assim como para FSII, com exceção de 1 µM DBMIB, 100 µM DCPIP, 500 µM K₃[Fe(CN)₆], que foram omitidos e 200 µM SiMo e 10 µM DCMU, que foram adicionados.²⁶

O transporte de elétrons do FSII (DPC a DCPIP_{oxidado}) foi medido através da redução da razão de DCPIP_{ox} com espectrofotômetro e determinado em tilacoides previamente tratados com Tris 0,8 M (pH 8,0) e incubados por 30 min a 4 °C.²⁷ Quando um composto inibe as reações do fotossistema II, o sítio de inibição é comprovado utilizando-se a técnica de fluorescência transiente da clorofila *a* do FSII. A razão de transporte de elétrons do FSI foi determinada através do consumo de O₂ de uma maneira similar à razão do transporte de elétrons basal não cíclico com 10 µM DCMU, 100 µM DCPIP reduzido com 300 µM ácido ascórbico, 50 µM MV e 6 mM NH₄Cl, que foram utilizados como meio reacional.²⁸

Estudos da fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*)

As curvas de indução da Chl *a* foram medidas à temperatura ambiente com um Hansatech Handy PEA (*Plant Effecient Analyzer*) como descrito por Strasser *et al.*¹⁷ O rendimento máximo da fluorescência das amostras foi gerado usando três diodos que emitem luz (650 nm). A duração do pulso foi de 1 s. O meio de reação utilizado foi o mesmo que para as medidas do transporte de elétrons basal. Para monitorar os transientes da fluorescência da Chl *a*, alíquotas de tilacoides adaptados ao escuro contendo 20 µg de Chl foram transferidas a um papel de filtro (1,0 x 1,0 cm). Em seguida, o material foi adicionado em 3 mL do meio e ainda em diferentes concentrações dos compostos testados. As amostras foram mantidas no escuro por 10 min e, em seguida, foram realizadas as leituras dos parâmetros. Os resultados representam a média de cinco repetições, obtidas diretamente através do software PEA Plus Versão 1.02.

Os diferentes parâmetros técnicos da fluorescência do FSII foram obtidos com a equação do teste OJIP, usando o programa *Bioanalyser*.²⁹ A área entre a curva de fluorescência máxima (F_M) e inicial (F₀) foi alterada pela presença de compostos que interagem com o FSII.^{17,20} A energia medida precisa bloquear todos os centros de reação do FSII, que foi medida pela razão Área/(F_M - F₀). V_J, fluorescência da eficiência quântica variável relativa a 2 ms (fase J). A medida de V_J = (F₂ms - F₀)/(F_M - F₀). V_J é usada como indicador da eficiência fotoquímica primária do FSII. V_I representa a fluorescência variável relativa a 30 ms. A medida de V_I = (F₃₀ms - F₀)/(F_M - F₀); Sm, é a área normalizada.²⁹

A densidade dos centros de reação, RC/Cso, fornece o número ativo proporcional aos centros reacionais (RCs) para a seção cruzada da amostra medida, RC/CSo = PHI(P₀)(V_J/M₀)F₀; índice de desempenho, PI(abs) = (RC/ABS)[PHI(P₀)/(1 - PHI(P₀))] [PSI₀/(1 - PSI₀)]. PSI₀ expressa a probabilidade de excitação aprisionada pela entrada no centro de reação do FSII da cadeia do transporte de elétrons, PSI₀ = Área/(F_M - F₀)V_J.

O número de *turnover* de Q_A indica quantas vezes Q_A é reduzida no tempo t₀ a t_{Fmax} e é medida por N = Sm.Mo(1/VJ); Sm é a área complementar total normalizada, que corresponde à fase O - J. M₀ fornece a inclinação da curva de normalização desde a origem até o aumento da fluorescência, bem como a medida da taxa fotoquímica primária.³⁰ Calcula-se M₀ = 4(F₃₀₀ - F₀)/(F_M - F₀) por 1 ms.

PHI(Po) ou TRo/ABS (eficiência quântica ou relações de fluxo) representam a probabilidade de captura de elétrons ou rendimento da eficiência quântica, expressa a probabilidade de um

fóton ser absorvido e preso pelo centro da reação PSII. Calcula-se PHI(Po) = (Fm(Área)/(FM - Fo)Fo)/Fm. A constante de excitação fotoquímica (k_p) é dada por k_p = (ABS/CS)k_F[(1/Fo)Área/(Fm - Fo)(1/Fm)]. Tem-se ainda k_N, constante de excitação não fotoquímica; K_H (constante por dissipação de calor) e K_F (emissão por fluorescência). Calcula-se k_N = (ABS/CS) k_F (1/Fm). ABS/RC fornece o tamanho efetivo da antena do centro de reação ativo (RC). Este parâmetro expressa o número total de fótons absorvidos pela molécula de clorofila em todos os centros reacionais, ABS/RC = M₀(1/V_J)(1/PHI(P₀)).

CONCLUSÕES

A partir dos frutos de *Myrsine cuneifolia* foi isolado o composto **1** (ácido myrsinoico A). Esse metabólito sofreu reação de hidrogenação catalítica, para a obtenção de um derivado. Neste trabalho, relata-se pela primeira vez o efeito desses compostos sobre a fotossíntese *in vitro* em cloroplastos de espinafre, através de uma série de reações enzimáticas, utilizadas para o esclarecimento de seus mecanismos de ação. Os resultados sugeriram que os compostos possuem mais de um mecanismo de ação. Os compostos que inibem o transporte de elétrons em todas as suas etapas (basal, fosforilante e desacoplado) atuam como inibidores da reação de Hill, através do bloqueio e/ou redução do transporte de elétrons pelo lado acceptor de elétrons (neste caso, o MV). Na literatura são encontrados outros produtos naturais que se comportam de maneira similar: ácido trachiloban-19-oico,³¹ xantorriazol,²⁵ tricolorin A,²⁴ N-metil-flindersina,¹¹ 6-(3,3-dimetilaliloxi)-4-metoxi-5-metilfitalideo,³² butil 7β-hidroxi-6-oxovouacapana-17β-oate,³³ canofilol³⁴ e 1,2,3,4,5,6-hexa-*O*-acetildulcitol.³⁵ Dados obtidos após medidas polarográficas permitiram localizar o sítio de ação dos compostos sobre o FS II. Ambos possuem sítio de interação tanto pelo lado doador, quanto pelo acceptor de elétrons, prendendo-se ao *pool* das quinonas (P₆₈₀ - Q_A). Um terceiro mecanismo de ação foi descoberto através de estudos de fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*), que indicaram que os metabólitos inibem parcialmente o complexo enzimático que provoca a fotólise da molécula de água, ou seja, ocorre a formação de centros de “reação silenciosos”, o que não permite a redução do acceptor primário de elétrons do FS II (Q_A), impedindo a transferência de elétrons. Devido à quantidade razoável obtida de ácido myrsinoico **1** (0,4 g), posteriormente esse composto passará por novas modificações estruturais, no intuito de se obter derivados mais ativos e com maior potencial fitotóxico.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Le Bourlegat, C. A. Em *Fragmentação florestal e alternativas de desenvolvimento rural na região centro-oeste*; Costa, R. B., ed.; Universidade Católica Dom Bosco: Campo Grande, 2003.
2. Borlaug, N. E. Em *Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. Global warming and other eco-myths*; Bailey R., ed.; Competitive Enterprise Institute: Roseville, 2002.
3. Reguero, M. T.; Calle, J.; Mata, R.; *Rev. Colomb. Ciencias Quim. Farm.* **1989**, *17*, 57.
4. Cordero, C. P.; Gómez-González, S.; León-Acosta, C. J.; Morantes-Medina, S. J.; Aristizabal, F. A.; *Fitoterapia* **2004**, *75*, 225.
5. Kimura, Y.; Misuno, T.; Shimada, A.; *Tetrahedron* **1997**, *38*, 469.
6. Kimura, Y.; Misuno, T.; Shimada, A.; Kawano, T.; *Phytochemistry* **1998**, *47*, 323.
7. Kimura, Y.; Shimada, A.; Kusano, M.; Yoshii, K.; Morita, A.; Nishibe, M.; Fujioka, S.; Kawano, T.; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 621.

8. Pillmoor, J. B.; *Pestic. Sci.* **1998**, *52*, 75.
9. Greaves, M. P. Em *Crop Protection Agents from Nature: Natural Products and Analogues*; Copping, L. G., ed.; RCS: Cambridge, 1996.
10. Duke, S. O.; Romagni, J. G.; Dayan, F. E.; *Crop Protection* **2000**, *19*, 583.
11. Veiga, T. A. M.; González-Vázquez, R.; Braga, P. A. C.; da Silva, M. F. G. F.; King-Díaz, B.; Lotina-Hennsen, B.; *Allelopathy J.* **2008**, *21*, 133.
12. Veiga, T. A. M.; Silva, S. C.; Archundia-Camacho, F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Fº, E.; Muller, M. W.; da Silva, M. F. das G. F.; Hensenn, B. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4217.
13. Veiga, T. A. M.; Gonzalez-Vazquez, R.; Oiano Neto, J.; da Silva, M. F. das G. F.; Diaz, B. K.; Hensenn, B. L.; *Arc. Biochem. Biophys.* **2007**, *465*, 38.
14. Mills, J. D.; Mitchell, P.; Schurmann, P.; *FEBS Lett.* **1980**, *191*, 144.
15. Izawa, S.; Winget, C. D.; Good, N. E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *22*, 222.
16. King-Díaz, B.; Macias-Ruvalcaba, N.; Aguilar-Martinez, M.; Calaminici, P.; Lotina-Hennsen, B.; *J. Photochem. Photobiol.* **2006**, *83*, 105.
17. Strasser, R. J.; Srivastava, A.; Govindjee; *Photochem. Photobiol.* **1995**, *61*, 32.
18. Rickert, K. W.; Sears, J.; Beck, W. F.; Brudvig, G. W.; *Biochemistry* **1991**, *30*, 7888.
19. Strasser, R. J.; *Photosynth. Res.* **1997**, *52*, 147.
20. Strasser, R. J.; Tsimilli-Michael, M.; Srivastava, A.; *Adv. Photos. Resp.* **2004**, *19*, 321.
21. Lazár, D.; Pospíšil, P.; Naus, J.; *Photosynthetica* **1999**, *37*, 255.
22. Macias, M. L.; Rojas, I. S.; Mata, R.; Lotina-Hennsen, B.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2137.
23. Romagni, J. G.; Nanayakkara, N. P. D.; Rosell, R.; Dayan, F. E. Em *Allelopathy from Molecules to Ecosystems*; Reigosa, M. J.; Pedrol, N., eds.; Enfield Science, Publishers: New Hampshire, 2002.
24. Achnine, L.; Moreno-Sánchez, R.; Iglesias-Prieto, R.; Pereda-Miranda, R.; Lotina-Hennsen, B.; *Physiol. Plant.* **1999**, *106*, 246.
25. González-Bernardo, E.; King-Díaz, B.; Delgado, G.; Aguilar, M. A.; Lotina-Hennsen, B.; *Physiol. Plant.* **2003**, *119*, 598.
26. Giaquinta, R. T.; Selman, B. R.; Anderson, B. J.; Dilley, R. A.; *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 2873.
27. Vernon, L. P.; Shaw, E. R.; *Plant Physiol.* **1969**, *44*, 1645.
28. Allen, J. F.; Holmes, N. G. Em *Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach*; Hipkinns, M. F.; Baker, N. R., eds.; IRL Press: Oxford, 1986.
29. Bussotti, F.; Strasser, R. A.; Schaub, M.; *Environ. Pollut.* **2007**, *147*, 430.
30. Srivastava, A.; Strasser, R. J.; *J. Scient. Ind. Res.* **1997**, *56*, 133.
31. Hernández-Terrones, M. G.; Aguilar, M. I.; King-Díaz, B.; Lotina-Hennsen, B. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2003**, *77*, 12.
32. Demuner, A. J.; Barbosa, L. C. A.; Veiga, T. A. M.; Barreto, R. W.; King-Díaz, B.; Lotina-Hennsen, B.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, *34*, 790.
33. King-Díaz, B.; Castelo-Branco, P. A.; dos Santos, F. J. L.; Rubinger, M. M. M.; Ferreira-Alves, D. L.; Piló-Veloso, D.; Lotina-Hennsen, B.; *Pestic. Biochem. Physiol.* **2010**, *96*, 119.
34. Torres-Romero, D.; King-Díaz, B.; Strasser, R. J.; Jimenez, I. A.; Lotina-Hennsen, B.; Bazzocchi, I. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10847.
35. de Oliveira, D. M.; Aguilar, M. I.; King-Díaz, B.; Vieira-Filho, S. A.; Pains-Duarte, L.; Silva, G. D. F.; Lotina-Hennsen, B.; *Molecules* **2011**, *16*, 9939.