

PLANTAS MEDICINAIS: FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Leonardo Gobbo-Neto e Norberto P. Lopes*

Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Recebido em 7/7/05; aceito em 11/4/06; publicado na web em 31/10/06

MEDICINAL PLANTS: FACTORS OF INFLUENCE ON THE CONTENT OF SECONDARY METABOLITES. Since secondary metabolites represent a chemical interface between plants and surrounding environment, their syntheses are frequently affected by environmental conditions. Thus, variations in the total content and/or of the relative proportions of secondary metabolites in plants can take place. We review the main environmental factors that can streamline or alter the production or concentration of secondary metabolites in plants. How seasonality, circadian rhythm, developmental stage and age, temperature, water availability, UV radiation, soil nutrients, altitude, atmospheric composition and tissue damage influence secondary metabolism are discussed.

Keywords: variations in secondary metabolites; medicinal plants; chemical ecology.

INTRODUÇÃO

Desde o quarto século a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais. Os carrascos gregos, por ex., coletavam suas amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) pela manhã, quando os níveis de coniina são maiores^{1,2}. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos³⁻⁷. De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais⁸.

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários estão expostos a seguir. Deve ser enfatizado, porém, que os estudos sobre influência destes fatores na produção de metabólitos secundários geralmente têm se limitado a um grupo restrito de espécies, predominantemente ocorrentes em regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente importantes e podem ter sofrido fortes pressões seletivas antrópicas visando certas características desejadas. Seu comportamento, portanto, nem sempre é representativo de plantas selvagens ou de outros tipos de habitat.

Também deve ser ressaltado que, muitas vezes, as variações 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^{9,10}. 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.

FATORES QUE INFLUENCIAM O CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento

A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por ex., variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais¹¹⁻¹⁵, lactonas sesquiterpênicas^{16,17}, ácidos fenólicos^{16,18}, flavonóides¹⁹⁻²⁵, cumarinas²¹, saponinas²⁶⁻²⁷, alcalóides^{1,28-31}, taninos³²⁻³⁶, graxas epicuticulares³⁷, iridóides^{22,38,39}, glucosinolatos^{40,41} e glicosídeos cianogênicos^{42,43}.

Os casos mais frequentemente relatados envolvem plantas e/ou metabólitos empregados na terapêutica, podendo ser citados os seguintes exemplos: as folhas de *Digitalis obscura* apresentam as menores concentrações de cardenólídeos, como o lanatosídeo A (Figura 1d), na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão, seguida por uma fase de decréscimo no outono³¹; as concentrações de hipericina (Figura 1c) e pseudo-hipericina na erva de São João (*Hypericum perforatum*, utilizada no tratamento de depressões leves a moderadas) aumentam de cerca de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão⁴⁴; nas folhas de *Ginkgo biloba* as concentrações de biflavonóides, como a ginkgetina (Figura 1f), constituintes ativos dos extratos utilizados para tratamento de distúrbios vasculares periféricos e cerebrais, também apresentam marcantes variações sazonais²³; por outro lado, não há consenso quanto às variações no conteúdo dos ginkgolídeos, devido à existência de resultados contraditórios na literatura⁴⁵; nas raízes de *Panax ginseng* foi detectado um grande aumento na concentração de damarano-saponinas bioativas, tais como o ginsenosídeo (Figura 1g) no verão²⁷; o conteúdo de valepotriatos, como o valtrato (Figura 1a) e derivados do ácido valerênico (Figura 1b), nas raízes de *Valeriana officinalis* (utilizada como sedativo moderado) também apresenta variações marcantes durante o ano⁴⁶; os conteúdos de C-glicosídeos, O-glicosídeos e antraquinonas livres (metabólitos responsáveis pela atividade laxante da planta) nos brotos e folhas da cáscara sagrada *Rhamnus purshiana* flutuam marcadamente durante o ano⁴⁷; no inverno, o ruibarbo (*Rhei rhizoma*) não contém

*e-mail: npelopes@fcrfp.usp.br

antraquinonas, as quais começam a se formar com a chegada da estação quente, a partir da oxidação de antranóis⁴⁷; em estudos que visam determinar a sazonalidade de taxóides, tendo como alvo principal o paclitaxel (Figura 1e - utilizado na terapêutica de câncer de ovário, entre outros) notam-se alterações no decorrer do ano na concentração destes compostos em *Taxus brevifolia* e *T. baccata*; porém, não é possível determinar um padrão de variação, devido a resultados conflitantes na literatura⁴⁸⁻⁵³. Resultados contrastantes também foram encontrados nos estudos envolvendo as antraquinonas de *Aloe arborescens*^{54,55}.

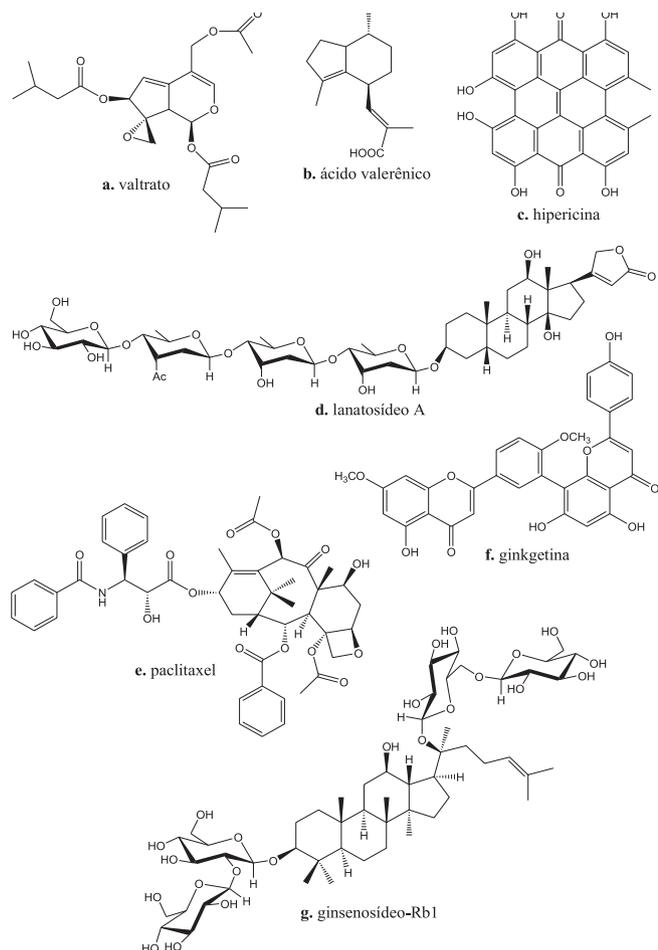


Figura 1. Exemplos de metabólitos secundários que podem ter seu acúmulo alterado por influência da sazonalidade

Existem, também, cada vez mais estudos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar apreciavelmente durante o ciclo dia/noite, tendo sido descritas, por ex., variações circadianas nas concentrações de óleos voláteis^{12,14,56-58}, iridóides³⁸, alcalóides^{1,2,59-61}, glucosinolatos⁶², glicosídeos cianogênicos e tiocianatos⁶³.

Foi notada, por ex., uma variação de mais de 80% na concentração de eugenol (Figura 2b) no óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), o qual atinge um máximo em torno do meio-dia, horário em que é responsável por 98% do óleo essencial, em contraste com uma concentração de 11% em torno de 17h⁵⁶. Os níveis de coniina (Figura 2a) em *Conium maculatum* são maiores quando as coletas são efetuadas pela manhã que no entardecer². O conteúdo total de taxanos (por ex., Figura 1e) em *Taxus media* mostrou-se menor pela manhã, aumentando durante o dia e atingindo um máximo no final da noite⁵¹. Também é inte-

ressante notar que a variação circadiana dos alcalóides majoritários de *Papaver somniferum*, que era atribuída a um rápido “turnover” destes metabólitos, é na verdade causada por uma variação diária no conteúdo de água no látex da planta, o que leva a alterações na concentração, mas não no conteúdo total, de morfina (Figura 2c), codeína e noscapina^{59,60}.

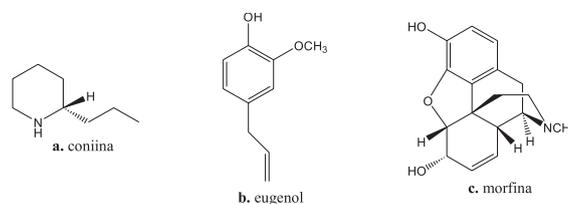


Figura 2. Exemplos de metabólitos secundários que podem ter seu acúmulo alterado por influência do ritmo circadiano

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura^{5,10,47,64-74}. É o caso, por ex., das lactonas sesquiterpênicas produzidas em *Arnica montana*, consideradas os principais princípios ativos desta planta utilizada como anti-inflamatório; enquanto plantas jovens acumulam majoritariamente derivados da helenalina (Figura 3d), a concentração destes compostos é reduzida para praticamente zero após aproximadamente seis semanas contadas a partir da formação das folhas; por outro lado, os níveis de compostos do tipo diidrohelenalina aumentam muito e então se mantêm constantes por um longo período¹⁷. Situação semelhante ocorre com os metabólitos de *Gentiana lutea*, cujas folhas são ricas em C-glicosídeos, como a mangiferina (Figura 3b), na fase de floração, enquanto O-glicosídeos, como a isoorientina (Figura 3a), são acumulados principalmente antes do desenvolvimento das flores²². Em um estudo com *Papaver somniferum* (papoula), o conteúdo de morfina (Figura 2c) aumentou de menos de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ no 50º dia após a germinação para mais de 120 $\mu\text{g g}^{-1}$ no 75º dia; já o conteúdo de codeína se mostrou praticamente constante⁷². No caso do *Tanacetum parthenium*, a porcentagem de partenólídeo (Figura 3c - um dos principais constituintes bioativos desta planta utilizada principalmente na profilaxia da enxaqueca) é maior nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta (antes do surgimento das hastes no ápice das quais surgirão as flores), porém a quantidade total obtida por planta aumenta de cerca de 10 para 20 mg durante o crescimento, devido ao surgimento de flores (as quais, ao contrário das hastes, contêm mais de 1% de partenólídeo) e mais folhas¹⁰. Em *Digitalis obscura* micropropagada foi observado que os conteúdos de lanatosídeo A (Figura 1d - cardenólídeo predominante, responsável por cerca de 65% do total de cardenólídeos) e de digitoxina aumentam consideravelmente com o desenvolvimento da planta⁷⁵.

Convém notar que, especialmente em estudos de campo e com plantas anuais, os efeitos da sazonalidade podem ser confundidos com alterações metabólicas sob controle do processo de desenvolvimento internamente (hormonalmente) controlado pela planta, devendo assim ser considerados em conjunto.

Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maior taxa biossintética de metabólitos⁷, tais como óleos essenciais^{76,77}, lactonas sesquiterpênicas⁹, ácidos fenólicos⁷⁸, alcalóides⁷³, flavonóides e estilbenos⁷¹. De fato, nota-se frequentemente uma correlação inversa entre alta atividade metabólica e produção de aleloquímicos, isto é, um decréscimo na produção de metabólitos secundários (notadamente derivados fenólicos) em períodos de crescimento tecidual rápido^{6,79-82}.

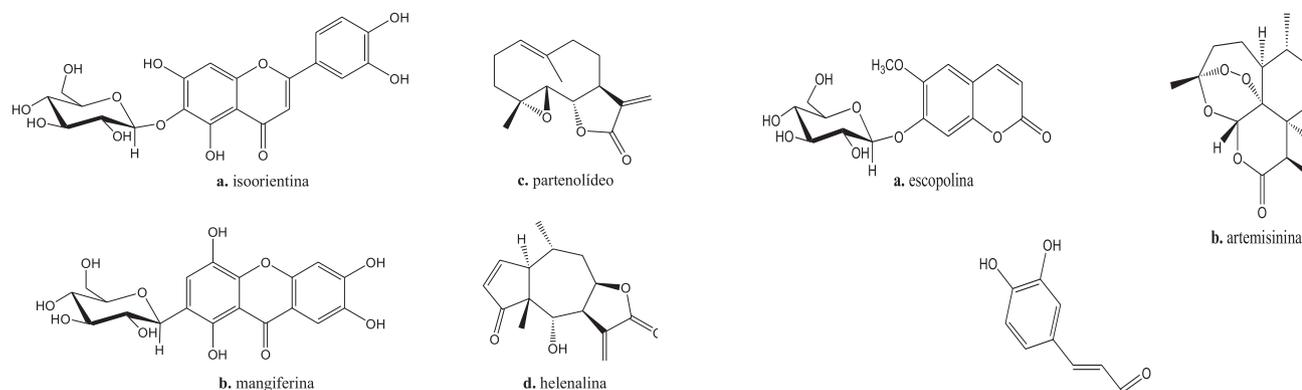


Figura 3. Exemplos de metabólitos secundários cuja concentração na planta pode ser influenciada por sua idade ou estágio de desenvolvimento

Temperatura

Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas freqüentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários⁴⁷. No entanto, talvez pelo fato da temperatura ser, de modo geral, uma consequência de outros fatores, como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários.

As baixas temperaturas têm influências significativas nos níveis de metabólitos secundários. É relatada, por ex., uma correlação positiva entre a intensidade e a duração do frio imposto a mudas de milho (*Zea mays*) e a abundância de antocianinas e mRNA para as enzimas chaves da via fenilpropanoídica, tais como PAL (fenilalanina amônia-liase) e chalcona sintase⁸³. Outro exemplo notório foi observado em *Artemisia annua*: após estresse metabólico causado por geada, verificou-se um aumento de cerca de 60% nos níveis de artemisinina (Figura 4b - substância com apreciável atividade contra cepas susceptíveis e resistentes de *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária), concomitante a uma diminuição de seu precursor biossintético ácido diidroartemisiníco, o que revelou uma rápida mobilização para a conversão deste em artemisinina⁸⁴. Também foi demonstrado, em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), um aumento de quatro a cinco vezes no conteúdo de escopolina (Figura 4a), ácido clorogênico (Figura 4c) e seus isômeros (compostos antioxidantes) após submissão a baixas temperaturas⁷⁸. O aumento nas concentrações de ácido clorogênico e antocianinas relacionados a baixas temperaturas também foram relatados em folhas de *Mahonia repens*, porém neste caso podem estar mais ligados à sazonalidade¹⁸.

A formação de óleos voláteis, em geral, parece aumentar em temperaturas mais elevadas, apesar de dias muito quentes levarem a uma perda excessiva destes metabólitos⁴⁷. As concentrações de algumas substâncias componentes do óleo essencial de *Santolina rosmarinifolia*, entretanto, mostram uma correlação negativa com a temperatura¹³.

Disponibilidade hídrica

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 secundário⁸⁵⁻⁸⁷.

Os efeitos da chuva na vegetação devem ser considerados em relação ao índice anual, sua distribuição pelo ano, seu efeito na umidade e seu efeito conjunto com a capacidade de absorção de

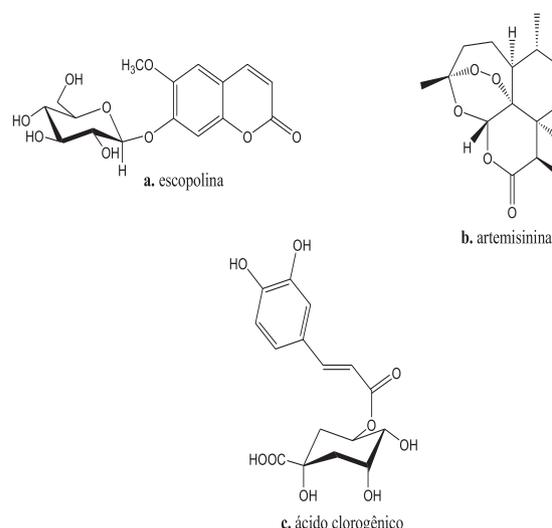


Figura 4. Exemplos de metabólitos secundários cuja concentração pode ser influenciada pela temperatura

água do solo⁴⁷. Exemplos da influência do índice pluviométrico na produção de metabólitos secundários são a correlação positiva de alguns dos componentes do óleo essencial de *Santolina rosmarinifolia*¹³ e a correlação negativa entre a produção de saponinas, como a lemmatoxina (Figura 5a) em *Phytolacca dodecandra*, com os níveis de precipitação²⁶. Em *Hypericum perforatum* há um aumento significativo na concentração de flavonóides, hipericinas (Figura 1c) e ácido clorogênico (Figura 4c) nas flores sob condições de estresse hídrico; porém, há um decréscimo na concentração de hiperforinas (Figura 5b)⁸⁸.

Conforme mencionado, o estresse hídrico freqüentemente tem conseqüências significativas nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há vários relatos de que estas condições geralmente levam a um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundários^{6,79}, como glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos⁸⁹, alguns terpenóides⁹⁰, antocianinas⁹¹ e alcalóides^{92,93}. Com relação a metabólitos fenólicos, os estudos realizados apresentam resultados conflitantes e parece não ser possível estabelecer uma correlação clara entre sua concentração e estresse osmótico^{43,79,94-99}, porém, nem sempre há alterações no acúmulo de metabólitos decorrentes de variações hídricas, como ocorre por ex. com os alcalóides de *Catharanthus roseus*¹⁰⁰. O efeito da seca na concentração de metabólitos é, às vezes, dependente do grau de estresse e do período em que ocorre, sendo que efeitos

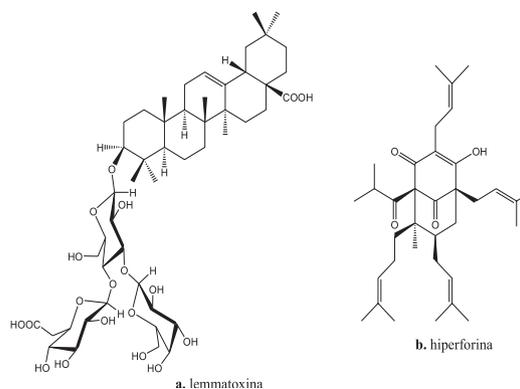


Figura 5. Exemplos de metabólitos secundários cujo acúmulo pode ser influenciado pela disponibilidade hídrica

a curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto a longo prazo é observado um efeito oposto^{6,95,98,101,102}. Outro fator é que a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação; sabe-se que isto se aplica a algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e até mesmo óleos voláteis^{47,101}.

Radiação ultravioleta

As diferentes espécies de plantas estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade e quantidade de incidência luminosa^{6,47,85}. Além disso, existe uma crescente preocupação com os efeitos do aumento de radiação ultravioleta (UV-B, 280–320 nm), decorrente da depleção da camada de ozônio.

Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos¹⁰¹, tais como flavonóides^{99,103,104}, taninos^{94,105} e antocianinas^{18,106,107}. Isso pode ser explicado, principalmente no caso de flavonóides e fenilpropanóides correlatos, pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B^{101,108-110}.

No caso específico dos flavonóides, estes são acumulados principalmente em tecidos superficiais (tais como epiderme, subepiderme, pêlos, cutícula e material epicuticular) e utilizados pela planta como filtros UV, pois absorvem radiação UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa^{101,111,112}. Além disso, também podem atuar como “radical-scavengers” e antioxidantes^{108,113}. O aumento na produção de tais metabólitos “protetores solares” é controlado por enzimas da rota biossintética dos fenilpropanóides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase, entre outras), as quais podem ter sua expressão gênica induzida pela luz¹¹⁴⁻¹¹⁹; no entanto, isto não se aplica a taninos e compostos fenólicos simples, os quais têm absorção máxima em comprimentos de onda consideravelmente mais curtos que os da UV-B¹⁰¹.

É interessante notar, também, o aumento na proporção de glicosídeos de luteolina (por ex., Figura 6b) / glicosídeos de apigenina (por ex., Figura 6c) quando do aumento de radiação UV-B incidente em *Marchantia polymorpha*. Isto não aumenta a capacidade de absorção de UV-B mas, por outro lado, sabe-se que derivados da luteolina são mais efetivos que os da apigenina em dissipar a energia absorvida, aumentando deste modo os níveis de defe-

sa antioxidante¹²⁰. Situação semelhante foi recentemente descrita para a relação flavonóides/hidróxi-cinamatos, onde foi observado um aumento desta proporção por indução luminosa⁹⁹. Isso demonstra que não somente a capacidade de absorver radiação UV-B, mas também a capacidade de atuar como antioxidantes, podem determinar a concentração e composição de metabólitos anti-UV-B⁹⁹.

Estudos mostram que a intensidade de luz é um fator que também influencia a concentração e/ou composição de outras classes de metabólitos secundários⁶, como terpenóides^{9,121-123}, glicosídeos cianogênicos¹²⁴ e alcalóides⁹²⁻¹²⁵. Foi demonstrado, por ex., que no manjeriço (*Ocimum basilicum*) e no tomilho (*Thymus vulgaris*), duas plantas utilizadas na medicina popular e como condimentos, o completo desenvolvimento de tricomas glandulares, onde os óleos essenciais são armazenados, é luz-dependente^{123,126}.

Em *Atropa belladonna*, *Datura stramonium* e *Cinchona ledgeriana* uma exposição total à luz solar leva a um maior conteúdo de alcalóides que a permanência na sombra⁴⁷, comportamento oposto ao apresentado pelos alcalóides de *Tabernaemontana pachysiphon*⁹². Hirata *et al.*¹²⁵ demonstraram que a irradiação de *Catharanthus roseus* (vinca) com radiação UV na faixa entre 290-380 nm estimula a dimerização dos alcalóides catarantina e vindolina em vimblastina (Figura 6a - um antitumoral utilizado na terapêutica de vários tipos de cânceres) aumentando sua produção, bem como de outros alcalóides diméricos. A formação de lactonas sesquiterpênicas nos tricomas do girassol (*Helianthus annuus*) também é influenciada pela luz, sendo que uma exposição intensa leva a um maior nível biossintético⁹. As folhas de hortelã (*Mentha piperita*) mantidas sob condições de dia longo contêm mentol (Figura 6d), mentona (Figura 6e), e somente traços de mentofurano (Figura 6f), enquanto as plantas desenvolvidas sob condições de dia curto apresentam o mentofurano como constituinte majoritário do óleo essencial¹²⁷.

Nutrientes

Na agricultura, a adição de nutrientes, particularmente nitrogênio, é geralmente empregada para aumentar a produção de biomassa. No entanto, os nutrientes afetam não somente o metabolismo primário, mas também influenciam a produção de diferentes metabólitos secundários, e o impacto de mudanças em sua disponibilidade na produção de metabólitos secundários foi revista por Gershenzon⁷⁹. Estes efeitos, de certo modo, não são totalmente previsíveis; tendências podem ser reconhecidas, mas não é possível estabelecer regras sólidas e estáveis⁶. Por outro lado, apesar da reconhecida influência no desenvolvimento vegetal, poucos estudos mostram relações entre pH ou microorganismos do solo e metabolismo secundário⁴⁷.

Macronutrientes

A grande maioria dos estudos sobre influência de nutrientes no solo está correlacionada com intensidade de luz incidente e volta para discussões sobre alocação de recursos (hipóteses de balanço carbono/nutrientes), as quais visam estabelecer uma relação entre as disponibilidades de nitrogênio, carbono e luz^{128,131}. Nestes estudos, de modo geral, a produção de metabólitos secundários (exceto os nitrogenados) mostra uma correlação positiva com a proporção carbono/nutrientes (C/N), isto é, em solos pobres em nutrientes, paralelamente à menor taxa de crescimento, geralmente se verifica maior produção de metabólitos secundários, particularmente derivados fenólicos^{79,94,129,130}. Contudo, estas hipóteses não foram totalmente comprovadas, existindo resultados controversos e tentativas de refinamento das hipóteses de balanço C/N^{34,128,130-134}.

Observa-se que estresse nutricional usualmente resulta em aumento nas concentrações de metabólitos secundários, exceto no

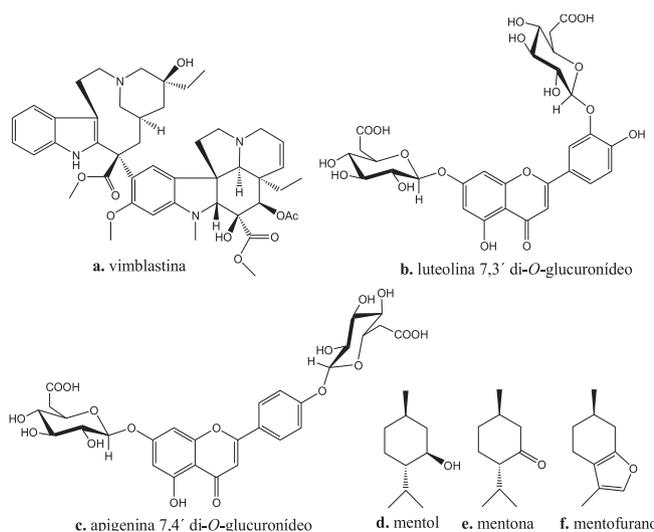


Figura 6. Exemplos de metabólitos secundários que podem ter seu acúmulo alterado por influência da intensidade e/ou quantidade de radiação ultravioleta

caso da deficiência de nitrogênio e enxofre, em que a produção de metabólitos secundários contendo estes elementos é diminuída⁷⁹.

A produção global de metabólitos nitrogenados por uma planta (alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos) geralmente é aumentada com a maior disponibilidade de nitrogênio no solo^{6,79,92}. Entretanto, como consequência do aumento da biomassa da planta, a concentração destes nos tecidos pode diminuir^{6,79}. Além disso, existem evidências de que não é somente a disponibilidade ambiental de nitrogênio em si que influencia o metabolismo secundário, mas sim a quantidade deste que é incorporada aos tecidos da planta⁹⁴. Em solos ácidos, devido a uma redução na taxa de conversão de amônio a nitrato, a incorporação de nitrogênio pode ser inibida, o que tem sido utilizado para explicar estudos que constataram altos níveis de produção de metabólitos secundários (especialmente compostos fenólicos) associados a plantas crescendo nesse tipo de solo⁶. Os níveis de fósforo e potássio, apesar de relativamente pouco estudados, também podem ter efeitos na produção de metabólitos nitrogenados^{6,47,79}.

Uma correlação bem estabelecida é que menores quantidades de metabólitos fenólicos são produzidas em condições de fornecimento abundante de nitrogênio^{135,136}. Os efeitos de nutrientes nos níveis de derivados do ácido chiquímico (especialmente ácidos cinâmicos simples e taninos hidrolisáveis e condensados) são bem documentados e deficiências em nitrogênio, fósforo, enxofre e potássio geralmente resultam em maiores concentrações destes metabólitos^{6,47,94}.

Por outro lado, os metabólitos derivados do mevalonato parecem não mostrar correlações consistentes com mudanças na disponibilidade de nitrogênio, fósforo ou potássio⁷⁹.

Micronutrientes

Há pouca informação disponível sobre o impacto de micronutrientes na produção de metabólitos secundários em plantas. Foi mostrado, por ex., que o fornecimento de manganês e molibdênio, através do borrifamento das folhas com soluções de sais destes elementos, durante o desenvolvimento de *Digitalis grandiflora* (dedaleira) leva a um aumento de mais de duas vezes no conteúdo de heterosídeos cardioativos¹³⁷. Outros estudos relacionando manganês^{75,138,139} e conteúdo de micronutrientes nas folhas¹⁴⁰ à produção de cardioativos foram realizados, porém os resultados são contrastantes.

O tratamento de suspensões celulares de *Catharanthus roseus* com cádmio pode aumentar em mais de três vezes a produção de ajmalicina (Figura 9b), um dos alcalóides de interesse comercial da planta, e sua excreção para o meio de cultura¹⁴¹. Também foi relatado que o tratamento com cádmio ou cobre altera a excreção de alcalóides para o meio em cultura celular de raízes transformadas de *Atropa belladonna*¹⁴². A falta de boro reduz a produção de compostos fenólicos em palmeiras¹⁴³ e o fornecimento de estanho e bismuto aumenta a quantidade de taninos produzidos por *Acacia catuchu*⁶.

Altitude

A altitude também exerce efeitos sobre o desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários em plantas, apesar de existirem relativamente poucos estudos neste sentido. A correlação positiva geralmente existente entre o conteúdo total de flavonóides e a altitude, por ex., é de particular interesse farmacêutico, uma vez que estes são constituintes ativos de um grande número de plantas medicinais^{16,144-146}. Esta correlação pode ser explicada pela maior susceptibilidade à radiação UV em altitudes maiores, uma vez que, conforme comentado anteriormente, os flavonóides são reconhecidos por propiciarem proteção à radiação e seus efeitos.

Foi descrita, por ex., uma significativa correlação positiva entre a altitude do local de coleta (entre 30 e 2950 m) de espécies do

gênero *Leontodon* e o conteúdo total de flavonóides; em contraste, o conteúdo de ácidos fenólicos não mostrou variação altitudinal significativa¹⁶. Um maior conteúdo de compostos fenólicos em *Sedum album* coletada em altitudes maiores (2100 x 240 m) também foi relatado¹⁴⁵. Por outro lado, estudo recente com *Swertia franchetiana* (matéria-prima para elaboração de um importante medicamento popular conhecido como DiDa no Tibet, utilizado no tratamento de uma série de doenças, como desordens do fígado) mostrou que, entre as altitudes de 2200 e 3960 m, dentre os metabólitos secundários bioativos analisados, somente as concentrações das xantonas mangiferina (Figura 3b) e 1,8-diidroxi-3,7-dimetóxi-xantona correlacionaram-se com a latitude, e apenas a última mostrou correlação (negativa, no caso) com a altitude¹⁴⁷.

Metabólitos não fenólicos também podem ser influenciados pela altitude. Uma comparação entre coletas de *Plantago lanceolata* efetuadas em altas altitudes x baixas altitudes revelou maiores concentrações do iridóide catalpol (Figura 7a) nas primeiras⁴. O aumento de altitude leva a um decréscimo no conteúdo dos alcalóides diterpênicos de *Aconitum napellus* e piperidínicos de *Lobelia inflata* e no de óleos voláteis de tomilho e hortelã pimenta⁴⁷. Já o conteúdo de piretrinas (por ex. Figura 7b - substâncias utilizadas comercialmente como inseticidas) em *Chrysanthemum* é maior e, altas altitudes e baixas latitudes⁴⁷.

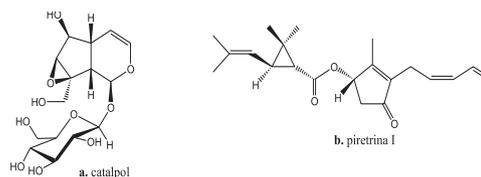


Figura 7. Exemplos de metabólitos secundários que podem ter seu acúmulo alterado por influência da altitude

Poliuição atmosférica

Os poucos trabalhos sobre alterações no metabolismo secundário decorrentes de poluição atmosférica são, de modo geral, bastante limitados e voltados principalmente para as consequências de níveis elevados de O₃ ou de CO₂ no metabolismo de derivados fenólicos.

A exposição de plantas de 6 semanas de idade de *Pinus sylvestris* a O₃, na concentração de pelo menos 0,15 μL L⁻¹ por 8 h, resultou em forte indução (aumento de centenas de vezes, dose- e tempo-dependente) na formação dos estilbenos pinosilvina (Figura 8d) e pinosilvina-3-metiléter, assim como da atividade da enzima estilbeno-sintase. Por outro lado, os níveis de pinocembrina e catequina não se alteraram significativamente com este tratamento¹⁴⁸. Alterações no conteúdo de alguns polifenóis, como *p*-hidróxi-acetofenona, piceína (Figura 8c) e 3-*O*-glicosil-kaempferol foram observados nas folhas de abeto (*Picea abies*), porém resultados conflitantes foram obtidos^{148,149}. A fumigação das folhas de soja (*Glycine max*) com O₃ (de 0,25 a 1 μL L⁻¹ por 3 h), paralelamente aos danos foliares, levou a um maior acúmulo dos isoflavonóides cumestrol (Figura 8a), daidzeína (Figura 8b) e sojagol; NO₂ e SO₂ também causaram um acúmulo, porém bem menor, destes isoflavonóides¹⁵⁰.

Foi relatado que *Digitalis lanata* cultivada em casas de vegetação com atmosfera enriquecida com CO₂ (1000 ppm) produziu 3,5 vezes mais digoxina (Figura 8e - um heterosídeo cardioativo utilizado na terapêutica da insuficiência cardíaca congestiva) por hectare que plantas cultivadas no campo⁴⁷. Por outro lado, *Plantago lanceolata* quando cultivada em atmosfera com elevada concentração de CO₂ (700 μL L⁻¹) apresenta concentrações similares ou menores de iridóides que a cultivada em condição ambiente (CO₂ = 350 μL L⁻¹)¹³¹.

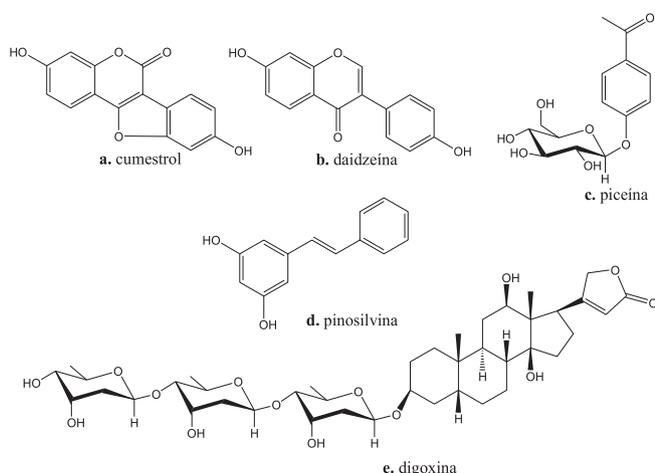


Figura 8. Exemplos de metabólitos secundários que podem ter sua concentração alterada por influência da composição atmosférica

Também há alguns relatos de mudanças quali- e quantitativas em resinas e aumento na emissão de terpenóides voláteis resultantes de tratamentos com SO_2 ou O_3 ¹⁵¹.

Indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos

Fatores mecânicos aos quais as plantas estão susceptíveis, tais como ferimentos, ou mesmo meros estímulos, causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros, também podem influenciar a expressão do metabolismo secundário^{5,141,153,154}.

Danos causados a plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos freqüentemente levam a uma resposta bioquímica, que reduz a aceitabilidade do órgão ou de todo o organismo a ataques futuros^{6,155}. O mais claro exemplo disto é a produção *de novo* de fitoalexinas (compostos geralmente derivados de fenilpropanóides, mas também de terpenóides ou poliacetilenos) em resposta à invasão de patógenos^{6,85,155,156}. Algumas plantas, como tomate e batata, em resposta à alimentação por insetos produzem rapidamente peptídeos inibidores de proteinase, o que pode diminuir significativamente a palatabilidade da planta ou parte dela^{6,157-159}.

Uma outra forma de defesa induzida, aparentemente bem distinta da anterior, é a resposta a curto ou longo prazo à danificação de tecidos vegetais aumentando a produção e o acúmulo de metabólitos secundários já existentes na planta, levando à fuga dos animais^{6,158}. Este acréscimo é, às vezes, uma resposta restrita ao órgão danificado, e outras vezes uma resposta mais geral, podendo afetar a bioquímica vegetal como um todo^{6,160,161}.

A danificação artificial em plântulas de *Catharanthus roseus*, por ex., resultou em um aumento de cerca de 100% no conteúdo dos alcalóides ajmalicina (Figura 9b) e vindolina 48 h após o tratamento; em contraste, o conteúdo de catarantina não sofreu alterações significativas¹⁵³. O acúmulo de alcalóides indólicos monoterpênicos em vinca também se mostrou estimulado pela danificação em folhas jovens, enquanto não foram observadas alterações metabólicas em folhas maduras, o que sugere um maior comprometimento implícito da proteção química com os tecidos mais jovens em relação aos já desenvolvidos¹⁰⁰.

Variando o número de ferimentos artificiais e quantificando o ácido jasmônico resultante após 90 min e a concentração de nicotina (Figura 9a) na planta após 5 dias, foi encontrada uma correlação positiva entre número de ferimentos nas folhas, ácido jasmônico endógeno e acúmulo de nicotina em toda a planta¹⁶⁰. Sabe-se que o ácido jasmônico é um regulador de rotas biossintéticas e responsá-

vel por parte da rota sinalizadora que aumenta notavelmente a síntese *de novo* de nicotina nas raízes de *Nicotiana sylvestris*, de onde ela é distribuída para toda a planta^{155,160}. Portanto, um distúrbio físico em um local específico pode proporcionar um sinal suficiente para induzir respostas em locais distantes e não estimulados¹⁶⁰.

O ferimento artificial das folhas do arbusto *Eriodictyon californicum* resultou em uma diminuição de até 63% no conteúdo de resinas fenólicas das folhas; porém, a composição da resina não mostrou alterações¹⁶¹. Em *Asclepias syriaca* (uma das plantas das quais a borboleta monarca seqüestra os cardenolídeos tóxicos que utiliza como defesa), o acúmulo destas substâncias é rapidamente induzido, atingindo um máximo 24 h após a danificação das folhas e diminuindo praticamente aos níveis constitutivos após 148 h¹⁶². Similarmente, McCloud *et al.*¹⁶³ verificaram que as cucurbitacinas da aboboreira são rapidamente induzidas 1 h após a danificação e retornam aos níveis constitutivos menos de 10 h após. Outros relatos interessantes são os aumentos no conteúdo de taninos¹⁶⁴ e iridóides⁵ em resposta à danificação de folhas por lagartas.

Sabe-se também que o nível de indução pode variar de acordo com o agente causador. De fato, algumas observações têm revelado que injúria causada por alimentação de insetos pode resultar em uma resposta fisiológica diferenciada, na qual a expressão gênica e/ou formação de metabólitos secundários é induzida especificamente ou mais rapidamente, devido a eliciadores presentes na saliva do inseto^{152,165,166}.

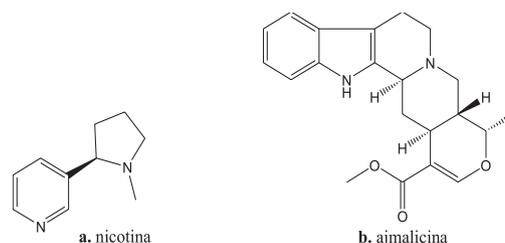


Figura 9. Exemplos de metabólitos secundários que podem ter seu acúmulo alterado por influência de estímulos mecânicos

CONCLUSÕES

Conforme visto, o metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores (Figura 10), sendo que a constância de concentrações de metabólitos secundários é praticamente uma exceção. Por outro lado, estudo recente mostrou que os metabólitos secundários de uma espécie vegetal selvagem, amostrada diretamente em seu habitat em três diferentes populações, se mantiveram em concentrações constantes durante os dois anos do estudo, demonstrando, portanto, que em alguns casos o metabolismo secundário pode não se alterar em função de fatores climáticos, temporais ou ambientais¹⁶⁷.

Os fatores expostos aqui (Figura 10), bem como outros que podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, tais como condições de coleta, estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos^{47,168}. O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis¹⁶⁸. O aprimoramento e o investimento em estudos de domesticação, produção biotecnológica e melhoramentos genéticos de plantas medicinais, ao invés do uso de plantas selvagens coletadas diretamente no campo, deve levar à obtenção de matérias-primas uniformes e de alta qualidade^{47,168}.

O processo legal de regulamentação e legislação de preparados fitoterápicos, devido principalmente a aspectos culturais, é dife-

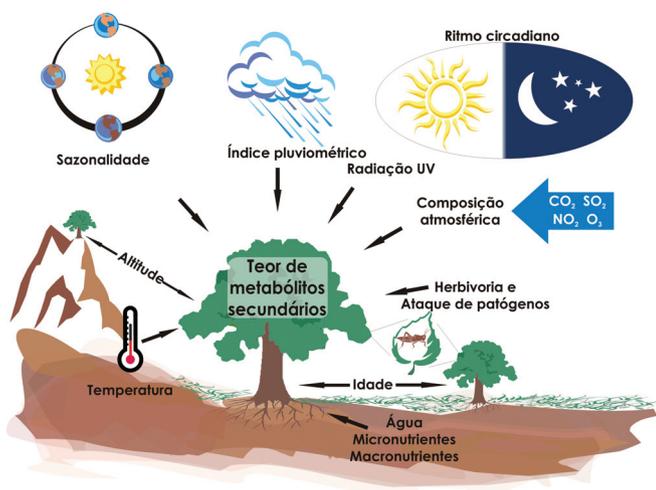


Figura 10. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta

rente em cada país. Muitos países da Europa utilizam plantas medicinais de forma ampla, como a Alemanha e a França que detêm 39 e 29% do total de vendas da União Européia, respectivamente^{169,170}. As legislações européias têm sido ampliadas por normas cada vez mais restritivas, exigindo testes que comprovem a eficácia, qualidade e segurança dos fitoterápicos^{169,170}.

Neste mesmo sentido, no Brasil, resoluções recentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos¹⁷¹. A Resolução-RDC n° 48, de 16/3/2004 exige, com exceção para aqueles fitoterápicos enquadrados como “fitoterápicos tradicionais”, a apresentação de uma série de relatórios que atestem, para o preparado fitoterápico a ser registrado, a segurança e a eficácia, bem como normas de produção e controle de qualidade visando reprodutibilidade e constância de princípios ativos e/ou marcadores característicos da espécie vegetal^{169,171}.

Baseando-se nos relatos aqui apresentados, é evidente que além da importância dos estudos de adulterações e contaminações¹⁶⁹ existe a necessidade de uma análise química detalhada de plantas destinadas ao uso terapêutico. Sabendo-se dos inúmeros fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, fica clara a necessidade de estudos visando detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos. Também se faz necessário um rigoroso controle de qualidade realizado por meio de técnicas analíticas modernas, para garantir constância na composição de metabólitos secundários no preparado fitoterápico em escala industrial. Além disso, o reconhecimento e a compreensão dessas variações poderão, no futuro, auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente.

AGRADECIMENTOS

Ao pós-graduando C. A. Carollo, DFQ-FCFRP, pela colaboração na elaboração das figuras, e ao CNPq pelas bolsas concedidas aos autores.

REFERÊNCIAS

- Robinson, T.; *Science* **1974**, *184*, 430.
- Fairbairn, J. W.; Suwal, P. N.; *Phytochemistry* **1961**, *1*, 38.
- Lindroth, R. L.; Hsia, M. T. S.; Scriber, J. M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 681.
- Darrow, K.; Bowers, M. D.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 1.
- Bowers, M. D.; Stamp, N. E.; *Ecology* **1993**, *74*, 1778.
- Waterman, P. G.; Mole, S. Em *Insect-plant interactions*; Bernays, E. A., ed.; 1st ed., CRS Press: Boca Raton, 1989, vol. 1, cap. 4.
- Hartmann, T.; *Ent. Exp. Appl.* **1996**, *80*, 177.
- Kutchan, T. M.; *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 58.
- Spring, O.; Bienert, U.; *J. Plant Physiol.* **1987**, *130*, 441.
- Hendriks, H.; Anderson-Wildeboer, Y.; Engels, G.; Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; *Planta Med.* **1997**, *63*, 356.
- Schwob, I.; Bessiere, J. M.; Masotti, V.; Viano, J.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 735.
- Angelopoulou, D.; Demetzos, C.; Perdetzoglou, D.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 189.
- Palá-Paúl, J.; Pérez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A.; Palá-Paúl, R.; Sanz, J.; Conejero, F.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 663.
- Lopes, N. P.; Kato, M. J.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S.; Yoshida, M.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 689.
- Pitarevic, I.; Kuflinec, J.; Blačević, N.; Kuštrák, D.; *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 409.
- Zidorn, C.; Stuppner, H.; *Taxon* **2001**, *50*, 115.
- Schmidt, T. J.; Bomme, U.; Alfermann, A. W.; *Planta Med.* **1998**, *64*, 268.
- Grace, S. C.; Logan, B. A.; Adams III, W. W.; *Plant Cell Environ.* **1998**, *21*, 513.
- Brooks, J. S.; Feeny, P.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 769.
- Atkinson, P.; Blakeman, J. P.; *New Phytol.* **1982**, *92*, 63.
- Wilt, F. M.; Miller, G. C.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 53.
- Menkovic, N.; Savikin-Fodulovic, K.; Savin, K.; *Planta Med.* **2000**, *66*, 178.
- Lobstein, A.; Jako, L. R.; Berrurier, M. H.; Anton, R.; *Planta Med.* **1991**, *57*, 430.
- Clark, L. E.; Clark, W. D.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1990**, *18*, 145.
- Jalal, M. A. F.; Read, D. J.; Haslam, E.; *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1397.
- Ndamba, J.; Lemmich, E.; Mølgaard, P.; *Phytochemistry* **1994**, *35*, 95.
- Kim, S. K.; Sakamoto, I.; Morimoto, K.; Sakata, M.; Yamasaki, K.; Tanaka, O.; *Planta Med.* **1981**, *42*, 181.
- Elgorashi, E. E.; Drewes, S. E.; Staden, J. V.; *Fitoterapia* **2002**, *73*, 490.
- Wu, T. S.; Wang, M. L.; Wu, P. L.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 785.
- Bandopadhyay, J.; De, B.; *Int. J. Pharmacog.* **1997**, *35*, 349.
- Roca-Pérez, L.; Boluda, R.; Gavidia, I.; Pérez-Bermúdez, P.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1869.
- Salminen, J. P.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K.; *Phytochemistry* **2001**, *57*, 15.
- Osier, T. L.; Hwang, S. Y.; Lindroth, R. L.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 197.
- Iason, G. R.; Hartley, S. E.; Duncan, A. J.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1993**, *21*, 315.
- Jonasson, S.; Bryant, J. P.; Chapin III, F. S.; Anderson, M.; *Am. Nat.* **1986**, *128*, 394.
- Feeny, P. P.; Bostock, H.; *Phytochemistry* **1968**, *7*, 87.
- Faini, F.; Labbé, C.; Coll, J.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 673.
- Høgedal, B. D.; Mølgaard, P.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 949.
- Bowers, M. D.; Collinge, S. K.; Gamble, S. E.; Schmitt, J.; *Oecologia* **1992**, *91*, 201.
- Agerbirk, N.; Olsen, C. E.; Nielsen, J. K.; *Phytochemistry* **2001**, *58*, 91.
- Rodman, J. E.; Louda, S. M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1985**, *13*, 405.
- Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R.; Gottlieb, O. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1983**, *11*, 367.
- Cooper-Driver, G. A.; Finch, S.; Swain, T.; Bernays, E.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1977**, *5*, 211.
- Southwell, I. A.; Bourke, C. A.; *Phytochemistry* **2001**, *56*, 437.
- Beek, T. A.; Bombardelli, E.; Morazzoni, P.; Peterlongo, F.; *Fitoterapia* **1998**, *59*, 195.
- Bos, R.; Woerdenbag, H. J.; Putten, F. M. S.; Hendriks, H.; Scheffer, J. J. C.; *Planta Med.* **1998**, *64*, 143.
- Evans, W. C.; *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 14th ed., WB Saunders Company: London, 1996, cap. 7.
- Hook, I.; Poupat, C.; Ahond, A.; Guénard, D.; Guéritte, F.; Adeline, M. T.; Wang, X. P.; Dempsey, D.; Breuille, S.; Potier, P.; *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1041.
- Veselá, D.; Aman, D.; Valterová, I.; Vank, T.; *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 319.
- Vance, N. C.; Kelsey, R. G.; Sabin, T. E.; *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1241.
- ElSohly, H. N.; Croom, E. M.; Kopycki, W. J.; Joshi, A. S.; McChesney, J. D.; *Phytochem. Anal.* **1997**, *8*, 124.
- Głowniak, K.; Mroczek, T.; Zobel, A. M.; *Phytomedicine* **1999**, *6*, 135.
- Wheeler, N. C.; Jech, K.; Masters, S.; Brobst, S. W.; Alvarado, A. B.; Hoover, A. J.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 432.
- Beppu, H.; Kawai, K.; Shimpo, K.; Chihara, T.; Tamai, I.; Ida, C.; Ueda, M.; Kuzuya, H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 783.
- Park, M. K.; Park, J. H.; Kim, N. Y.; Shin, Y. G.; Choj, Y. S.; Lee, J. G.; Kim, K. H.; Lee, S. K.; *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 186.

56. Silva, M. G. V.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Alencar, J. W.; *Fitoterapia* **1999**, *70*, 32.
57. Loughrin, J. H.; Kemp, T. R. H.; Burton, H. R.; Andersen, R. A.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1417.
58. Loughrin, J. H.; Hamilton-Kemp, T. R.; Andersen, R. A.; Hildebrand, D. F.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2473.
59. Itenov, K.; Mølgaard, P.; Nyman, U.; *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1229.
60. Fairbairn, J. W.; Wassel, G.; *Phytochemistry* **1964**, *3*, 253.
61. Sporer, F.; Sauerwein, M.; Wink, M.; *Acta Hort.* **1993**, *331*, 379.
62. Rosa, E. A. S.; Heaney, R. K.; Rego, F. C.; Fenwick, G. R.; *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *66*, 457.
63. Okolie, P. N.; Obasi, B. N.; *Phytochemistry* **1993**, *33*, 775.
64. Jenks, M. A.; Tuttle, H. A.; Feldmann, K. A.; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 29.
65. Buta, J. G.; Spaulding, D. W.; *J. Plant Growth Regul.* **1997**, *16*, 43.
66. Doan, A. T.; Ervin, G.; Felton, G.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 117.
67. Vogt, T.; Gülz, G.; *Phytochemistry* **1994**, *36*, 591.
68. Scora, R. W.; Kumamoto, J.; Horner, P. F.; Hollenberg, J. L.; *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 279.
69. Wisdom, C. S.; Rodriguez, E.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1983**, *11*, 345.
70. Goralka, R. J. L.; Schumaker, M. A.; Langenheim, J. H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1996**, *24*, 93.
71. Slimestad, R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, *26*, 225.
72. Williams, R. D.; Ellis, B. E.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2085.
73. Höft, M.; Verpoorte, R.; Beck, E.; *Planta Med.* **1998**, *64*, 148.
74. Wilkinson, R. E.; Kasperbauer, M. J.; *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2439.
75. Gavidia, I.; Pérez-Bermúdez, P.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 81.
76. Hall, G. D.; Langenheim, J. H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1986**, *14*, 61.
77. Gershenzon, J.; Maffei, M.; Croteau, R.; *Plant Physiol.* **1989**, *89*, 1351.
78. Koeppel, D. E.; Rohrbach, L. M.; Rice, E. L.; Wender, S. H.; *Physiol. Plant.* **1970**, *23*, 258.
79. Gershenzon, J.; *Rec. Adv. Phytochem.* **1984**, *18*, 273.
80. Crankshaw, D. R.; Langenheim, J. H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1981**, *9*, 115.
81. Palo, R. T.; Sunnerheim, K.; Theander, O.; *Oecologia* **1985**, *65*, 314.
82. Lilov, D.; Angelova, Y.; *Biol. Plant.* **1987**, *29*, 34.
83. Christie, P. J.; Alfenito, M. R.; Walbot, V.; *Planta* **1994**, *194*, 541.
84. Wallaart, T. E.; Pras, N.; Beekman, A. C.; Quax, W. J.; *Planta Med.* **2000**, *66*, 57.
85. Salisbury, F. B.; Ross, C. W.; *Plant Physiology*, 4th ed., Wadsworth Publishing Co.: Belmont, 1991.
86. Hsiao, T. C.; *Annu. Rev. Plant Phys.* **1973**, *24*, 519.
87. Bazaaz, F.; Chiariello, N.; Coley, P.; Pitelka, L.; *Bioscience* **1987**, *37*, 58.
88. Gray, D. E.; Pallardy, S. G.; Garret, H. E.; Rottinghaus, G. E.; *Planta Med.* **2003**, *69*, 1024.
89. Blua, M. J.; Hanscom, Z.; Collier, B. D.; *J. Chem. Ecol.* **1998**, *14*, 623.
90. Lokar, L. C.; Maurich, V.; Mellerio, G.; Moneghini, M.; Poldini, L.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 327.
91. Jung, S.; *Plant Sci.* **2004**, *166*, 459.
92. Höft, M.; Verpoorte, R.; Beck, E.; *Oecologia* **1996**, *107*, 160.
93. Briske, D. D.; Camp, B. J.; *Weed Sci.* **1982**, *30*, 106.
94. Dustin, C. D.; Cooper-Driver, G. A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 99.
95. Horner, J. D.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1990**, *18*, 211.
96. Dement, W. A.; Mooney, H. A.; *Oecologia* **1974**, *15*, 65.
97. Guinn, G.; Eidenbock, M. P.; *Crop Sci.* **1982**, *22*, 614.
98. Mattson, W. J.; Haack, R. A.; *Bioscience* **1987**, *37*, 110.
99. Tattini, M.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Massai, R.; Remorini, D.; Agati, G.; *New Phytol.* **2004**, *163*, 547.
100. Frischknecht, P. M.; Battig, M.; Baumann, T. W.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 707.
101. Waterman, P. G.; Mole, S.; *Analysis of phenolic plant metabolites*, 1st ed., Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994, cap. 3.
102. Medina, E.; Olivares, E.; Diaz, M.; *Oecologia* **1986**, *70*, 441.
103. Cuadra, P.; Harborne, J. B.; Waterman, P. G.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1377.
104. Markham, K. R.; Tanner, G. J.; Caasi-Lit, M.; Whitecross, M. I.; Nayudu, M.; Mitchell, K. A.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1913.
105. Dudt, J. F.; Shure, D. J.; *Ecology* **1994**, *75*, 86.
106. Jeong, S. T.; Goto-Yamamoto, N.; Kobayashi, S.; Esaka, M.; *Plant Sci.* **2004**, *167*, 247.
107. Paré, P. W.; Tumlinson, J. H.; *Plant Physiol.* **1997**, *114*, 1161.
108. Grace, S. C.; Logan, B. A.; *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2000**, *355*, 1499.
109. Delucia, E. H.; Day, T. A.; Vogelmann, T. C.; *Plant Cell Environ.* **1992**, *15*, 921.
110. Ålenius, C. M.; Vogelmann, T. C.; Bomman, J. F.; *New Phytol.* **1995**, *131*, 297.
111. Bieza, K.; Lois, R.; *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 1105.
112. Caldwell, M. M. R.; Robberecht, R.; Flint, S. D.; *Physiol. Plant.* **1983**, *58*, 445.
113. Larson, R. A.; *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1995**, *29*, 175.
114. Chappell, J.; Hahlbrock, K.; *Nature* **1984**, *311*, 76.
115. Logemann, E.; Tavernara, A.; Schulz, W.; Somssich, I. E.; Hahlbrock, K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2000**, *97*, 1903.
116. Jones, D. H.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1349.
117. Zucker, M.; *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1972**, *23*, 133.
118. Schmelzer, E.; Jahnhen, W.; Hahlbrock, K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1988**, *85*, 2989.
119. Bharti, A. K.; Khurana, J. P.; *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 765.
120. Markham, K. R.; Ryan, K. G.; Bloor, S. J.; Mitchell, K. A.; *Phytochemistry* **1998**, *48*, 791.
121. Karousou, R.; Grammatikopoulos, G.; Lanaras, T.; Manetas, Y.; Kokkini, S.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2273.
122. Johnson, C. B.; Kirby, J.; Naxakis, G.; Pearson, S.; *Phytochemistry* **1999**, *51*, 507.
123. Yamaura, T.; Tanaka, S.; Tabata, M.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 741.
124. Burns, A. E.; Gleadow, R. M.; Woodrow, I. E.; *Oecologia* **2002**, *133*, 288.
125. Hirata, K.; Asada, M.; Yatani, E.; Miyamoto, K.; Miura, Y.; *Planta Med.* **1993**, *59*, 46.
126. Ioannidis, D.; Bonner, L.; Johnson, C. B.; *Ann. Bot.* **2002**, *90*, 453.
127. Voirin, B.; Brun, N.; Bayet, C.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 749.
128. Koricheva, J.; Larsson, S.; Haukioja, E.; Keinänen, M.; *Oikos* **1998**, *83*, 212.
129. Coley, P. D.; Bryant, J. P.; Chapin III, F. S.; *Science* **1985**, *230*, 895.
130. Bryant, J. P.; Chapin III, F. S.; Klein, D. R.; *Oikos* **1983**, *40*, 357.
131. Fajer, E. D.; Bowers, M. D.; Bazzaz, F. A.; *Am. Nat.* **1992**, *140*, 707.
132. Jones, C. G.; Hartley, S. E.; *Oikos* **1999**, *86*, 27.
133. Koricheva, J.; *Oikos* **2002**, *98*, 537.
134. Herms, D. A.; Mattson, W. J.; *Q. Rev. Biol.* **1992**, *67*, 283.
135. Bryant, J. P.; Chapin III, F. S.; Reichardt, P. B.; Clausen, T. P.; *Oecologia* **1987**, *72*, 510.
136. Price, P. W.; Waring, G. L.; Julkunen-Tiitto, R.; Tahvanainen, J.; Mooney, H. A.; Craig, T. P.; *J. Chem. Ecol.* **1989**, *15*, 1117.
137. Letchamo, W.; *Planta Med.* **1986**, *5*, 421.
138. Hagimori, M.; Matsumoto, T.; Obi, Y.; *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 565.
139. Ohlsson, A.; Berglund, T. J.; *J. Plant Physiol.* **1989**, *135*, 505.
140. Roca-Pérez, L.; Boluda, R.; Pérez-Bermúdez, P.; *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* **2004**, *167*, 79.
141. Zheng, Z.; Wu, M.; *Plant Sci.* **2004**, *166*, 507.
142. Lee, K. T.; Yamakawa, T.; Kodama, T.; Shimomura, K.; *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2343.
143. Rajaratnam, J. A.; Hook, L. I.; *Exp. Agric.* **1975**, *11*, 59.
144. Polle, A.; Mössnang, M.; Schönborn, A.; Sladkovic, R.; Rennenberg, H.; *New Phytol.* **1992**, *121*, 89.
145. Bachereau, F.; Marigo, G.; Asta, J.; *Physiol. Plant.* **1998**, *104*, 203.
146. Veit, M.; Bilger, W.; Mühlbauer, T.; Brummet, W.; Winter, K.; *J. Plant Physiol.* **1996**, *148*, 478.
147. Yang, H.; Duan, Y.; Hu, F.; Liu, J.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 861.
148. Rosemann, D.; Heller, W.; Sandermann, H.; *Plant Physiol.* **1991**, *97*, 1280.
149. Heller, W.; Rosemann, D.; Osswald, W. F.; Benz, B.; Schönwitzer, R.; Lohwasser, K.; Kloos, M.; Sandermann, H.; *Environ. Pollut.* **1990**, *64*, 353.
150. Keen, N. T.; Taylor, O. C.; *Plant Physiol.* **1975**, *55*, 731.
151. Riemer, J.; Whittaker, J. B. Em ref. 6, cap. 3.
152. Raymond, P.; Weber, H.; Diamond, M.; Farmer, E. E.; *The Plant Cell* **2000**, *12*, 707.
153. Vázquez-Flota, F.; Carrilo-Pech, M.; Minero-García, Y.; Miranda-Ham, M. L.; *Plant Physiol. Biochem.* **2004**, *42*, 623.
154. Cipollini Jr., D. F.; *Oecologia* **1997**, *111*, 84.
155. Heil, M.; Bostock, R. M.; *Annals of Botany* **2002**, *89*, 503.
156. Harborne, J. B.; *Introduction to ecological biochemistry*, 3rd ed., Academic Press Limited: London, 1989, cap. 10.
157. Graham, J. S.; Hall, G.; Pearce, G.; Ryan, C. A.; *Planta* **1986**, *169*, 399.
158. Harborne, J. B. Em ref. 156, cap. 7.
159. Hilder, V. A.; Gatehouse, A. M. R.; Sheerman, S. E.; Barker, R. F.; Boulter, D.; *Nature* **1987**, *330*, 160.
160. Baldwin, I. T.; Zhang, Z. P.; Diab, N.; Ohnmeiss, T. E.; McCloud, E. S.; Lynds, G. Y.; Schmelz, E. A.; *Planta* **1997**, *201*, 397.
161. Johnson, N. D.; Brain, S. A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1985**, *13*, 5.
162. Malcolm, S. B.; Zalucki, M. P.; *Ent. Exp. Appl.* **1996**, *80*, 193.
163. McCloud, E. S.; Tallamy, D. W.; Halaweish, F. T.; *Ecol. Entomol.* **1995**, *20*, 51.
164. Schultz, J. C.; Baldwin, I. T.; *Science* **1982**, *217*, 149.
165. Korth, K. L.; Dixon, R. A.; *Plant Physiol.* **1997**, *115*, 1299.
166. Neuvonen, S.; Haukioja, E.; Molarius, A.; *Oecologia* **1987**, *74*, 363.
167. Sakamoto, H. T.; Gobbo-Neto, L.; Cavalheiro, A. J.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1396.
168. Calixto, J. B.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**, *33*, 179.
169. Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 519.
170. Silano, M.; De Vincenzi, M.; De Vincenzi, A.; Silano, V.; *Fitoterapia* **2004**, *75*, 107.
171. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>, acessada em Novembro 2005.