

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Produção de voláteis por culturas de raízes
transgênicas de *Anethum graveolens*:
Influência da regeneração e da capacidade
de biotransformação

Jorge Miguel Silva Faria

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Produção de voláteis por culturas de raízes
transgênicas de *Anethum graveolens*:
Influência da regeneração e da capacidade
de biotransformação

Jorge Miguel Silva Faria

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Luís Manuel Gaspar Pedro

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2007

“Before them, as they turned west, gentle slopes ran down into dim hazes far below. All about them were small woods of resinous trees, fir and cedar and cypress, and other kinds unknown in the Shire, with wide glades among them; and everywhere there was a wealth of sweet-smelling herbs and shrubs. The long journey from Rivendell had brought them far south of their own land, but not until now in this more sheltered region had the hobbits felt the change of clime. Here Spring was already busy about them: fronds pierced moss and mould, larches were green-fingered, small flowers were opening in the turf, birds were singing. Ithilien, the garden of Gondor now desolate kept still a dishevelled dryad loveliness.

South and west it looked towards the warm lower vales of Anduin, shielded from the east by the Ephel Dúath and yet not under the mountain-shadow, protected from the north by the Eryn Muil, open to the southern airs and the moist winds from the Sea far away. Many great trees grew there, planted long ago, falling into untended age amid a riot of careless descendants; and groves and thickets there were of tamarisk and pungent terebinth, of olive and of bay; and there were junipers and myrtles; and thymes that grew in bushes, or with their woody creeping stems mantled in deep tapestries the hidden stones; sages of many kinds putting forth blue flowers, or red, or pale green; and marjorams and new-sprouting parsleys, and many herbs of forms and scents beyond the garden-lore of Sam. The grotts and rocky walls were already starred with saxifrages and stonecrops. Primeroles and anemones were awake in the filbert-brakes; and asphodel and many lily-flowers nodded their half-opened heads in the grass: deep green grass beside the pools, where falling streams halted in cool hollows on their journey down to Anduin.

The travellers turned their backs on the road and went downhill. As they walked, brushing their way through bush and herb, sweet odours rose about them.”

J.R.R Tolkien

Agradecimentos

Começo por agradecer aos meus pais, cuja ajuda foi fundamental para começar, continuar e acabar este trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Pedro, à Professora Doutora Ana Cristina Figueiredo e à Professora Doutora Helena Trindade que me aceitaram no seu laboratório, orientaram e ajudaram no trabalho laboratorial e reviram, mais do que uma vez, este trabalho. Em particular gostava de agradecer a incondicional disponibilidade que demonstraram.

À recém-mestre Inês Nunes que partilhou esta experiência comigo, pelos inúmeros momentos de confusão laboratorial, pelas gargalhadas, pelo companheirismo e pelas horas frente ao fluxo laminar e em redor da balança.

À recém-mestre Marta Mendes pela ajuda, pelos pequenos-almoços, pelas gargalhadas, pelo companheirismo.

À Marta Bento pela companhia indispensável, pela amizade, pelos Gb de entretenimento disponibilizado.

Ao Nuno por me tirar de dentro do laboratório sempre que pudesse.

À Ana Lúcia, pelos intervalos em que só ela me acompanha,

À Inês, ao Duarte, à Mara, à João e ao Huguinho pela amizade, pela companhia e pelas noites de *Sushi*.

À Sofia, ao Zé, à Xana, à Rafaela, à Marta, à Raquel, à Marisa, à Joana, à Andreia, ao Hélder.

E, por fim, a todos que me acompanharam neste último ano e que contribuíram para este trabalho.

Obrigado.

Abreviaturas

°C - Graus Celsius
°C.min⁻¹ - Graus Celsius por minuto
2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ACCase – Acetil-CoA carboxilase
Acetil-CoA - Acetil co-enzima A
AIB - Ácido indolbutírico
ANA - Ácido naftalenacético
AS - Ácido salicílico
ATT - Álcool acetiltransferase
BA - Benziladenina
BAP - Benzilaminopurina
CGL - Cromatografia gás-líquido
CGL/EM - Cromatografia gás-líquido com espectrometria de massa
cm - Centímetro
cm.s⁻¹ - Centímetros por segundo
CoA - co-enzima A
d.i. - Diâmetro interno
DB-17HT - Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de fenilmetilsilicone
DB1 - Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de metilsilicone
DIC - Detector de ionização de chama
DMAPP - Dimetilalil pirofosfato
DXP - 1-Deoxi-D-xilulose fosfato
eV - Electrão-volt
FPP - Farnesil pirofosfato
g - Grama
g.l⁻¹ - Grama por litro
GC - *Gas chromatography*
GC-MS - *Gas chromatography with mass spectrometry*
GGPP - Geranilgeranil pirofosfato
GPP - Geranil pirofosfato
h - Hora
HMGR - 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
IPP - Isopentenil pirofosfato
IR - Índice de retenção
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
kD - Kilodalton
kV - Kilovolt
m – Metro
mbar - Milibar
MEP - Metileritritol fosfato
mg - Miligrama
mg.l⁻¹ - Miligrama por litro
min - Minuto
ml - Mililitro
ml.min⁻¹ - Mililitro por minuto
mm - Milímetro
mM - Milimolar

MS/2 - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) diluído para metade
NLS - *Nuclear localisation signal*
p.f. - Peso fresco
p.s. - Peso seco
PAL - Fenilalanina amónia liase
r.p.m - Rotações por minuto
r.t. - Raízes transgênicas
Ri - *Root inducing*
rol - *Root locus*
s - Segundo
SH - Meio de cultura de Schenk e Hildebrandt (1972)
u - Unidades de massa atômica
UV-C - Radiação ultravioleta C
v - Vestigial
v/v - Volume por volume
μA - Microampere
μl - Microlitro
μm - Micrómetro

Resumo

Foram usadas culturas de raízes transgênicas (r.t.) de *Anethum graveolens* para testar a possibilidade de regeneração e para avaliar a influência da capacidade de biotransformação dos álcoois monoterpênicos, mentol e geraniol, no crescimento e produção de voláteis.

A regeneração foi ensaiada em fotoperíodo, de 24h luz em *jiffy pellets* e de 16h luz em caixas de Petri com 20 ml de meio MS/2. Parte destas foi suplementada com higromicina B (2 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹ e 7 mg.l⁻¹) ou ácido salicílico (0,3; 0,5 e 0,8 mM). Outras foram tratadas com radiação UV-C (30 min, 30+15 min, 30+2x15 min, 30+3x15 min), posteriormente à inoculação com extremidades de r.t.

A influência da biotransformação foi analisada pela adição de substrato às culturas 15 dias após a inoculação, numa concentração de 25 mg.l⁻¹. As culturas foram mantidas em meio SH, sob escuridão permanente a 24°C, com agitação a 80 r.p.m. A avaliação do crescimento foi efectuada pelo método da desassimilação e pela medição do peso fresco e peso seco das raízes ao longo de 7 semanas. A componente volátil, extraída por destilação-extracção, foi analisada por CGL e CGL-EM.

A regeneração não foi conseguida. As r.t. submetidas a fotoperíodo de 16h luz revelaram crescimento, reverdecimento e formação de tecido caloso. Estas respostas não foram observadas com a aplicação de higromicina B ou ácido salicílico nem com o ensaio em *jiffy pellets*. Estas condições parecem ser prejudiciais ao crescimento. A componente volátil constitutiva das r.t. de *A. graveolens* é composta, em mais de 50%, por falcarinol (9-52%), apiole (9-24%), ácido palmítico (7-16%), ácido linoleico (4-9%), miristicina (2-8%) e *n*-octanal (2-8%). A adição de mentol ou geraniol não influenciou substancialmente o crescimento. Após a adição, a proporção relativa de mentol decresceu rapidamente num período de 48h e observou-se a concomitante produção de acetato de mentilo. O geraniol adicionado foi biotransformado em, pelo menos, 10 produtos, os álcoois linalol, α -terpineol e citronelol, os aldeídos neral e geranial, os ésteres acetato de citronelilo, de nerilo e de geranilo e os óxidos de nerol e linalol. A proporção relativa de geraniol decresceu rapidamente num período de 48h em detrimento dos produtos. A concentração relativa de todos os produtos de biotransformação detectados diminuiu gradualmente ao longo do tempo de cultura.

Palavras-chave: *Anethum graveolens* L., Apiaceae, regeneração, biotransformação, mentol, geraniol.

Abstract

Anethum graveolens hairy root cultures were used to assess regeneration and evaluate the influence of the biotransformation capacity of the monoterpene alcohols, menthol and geraniol, on growth and production of volatile compounds.

Regeneration was assayed in photoperiod, 24h light in jiffy pellets and 16h light in Petri dishes with 20 ml of MS/2 medium. Some of these were supplemented with hygromycin B (2 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹ e 7 mg.l⁻¹) or salicylic acid (0,3; 0,5 e 0,8 mM). Others were subjected to UV-C radiation (30 min, 30+15 min, 30+2x15 min, 30+3x15 min) after inoculation with hairy root tips.

The biotransformation capacity was assayed by adding substrate, 25 mg.l⁻¹, to the cultured roots 15 days after inoculation. The cultures were maintained in SH medium, in permanent darkness, at 24°C, and 80 r.p.m. Hairy root growth was measured by the dissimilation method and by fresh and dry weight measurement, throughout 7 weeks. The volatile component, extracted by distillation-extraction, was analyzed by GC and GC-MS.

Regeneration was not achieved. The 16h light photoperiod roots showed growth, regreening and *calli* formation. These responses were not observed in hygromycin B or salicylic acid treated roots or in jiffy pellets. These conditions appear to be disadvantageous (harmful) to growth. The constitutive volatile component of *A. graveolens* hairy roots is composed, in more than 50%, by falcarinol (9-52%), apiol (9-24%), palmitic acid (7-16%), linoleic acid (4-9%), miristicin (2-8 %) and *n*-octanal (2-8%). The addition of menthol or geraniol did not substantially influence growth. After addition, the relative concentration of menthol quickly decreased in a period of 48h, and a concomitant production of menthyl acetate was observed. This was the only detectable biotransformation product and its relative amount diminished gradually throughout culture time. The added geraniol was biotransformed in, at least, 10 products, the alcohols linalool, α -terpineol and citronellol, the aldehydes neral and geraniol, the esters citronellyl, neryl and geranyl acetates and linalool and nerol oxides. The relative proportion of geraniol quickly decreased in a period of 48h at the expense of the products. The relative concentration of all the detected biotransformation products decreased gradually over time in culture.

Keywords: *Anethum graveolens* L., Apiaceae, regeneration, biotransformation, menthol, geraniol.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Anethum graveolens L. na família Apiaceae.....	1
1.2	Metabolitos secundários	2
1.2.1	Óleos essenciais	3
1.2.1.1	Terpenos	4
1.2.1.2	Fenóis	6
1.2.1.3	Ácidos gordos.....	7
1.2.1.4	Poliacetilenos.....	8
1.2.2	Produção in vitro de metabolitos secundários	9
1.3	Raízes transgênicas (hairy roots).....	10
1.3.1	Infecção com Agrobacterium rhizogenes e estabelecimento de hairy roots..	10
1.3.2	Crescimento e metabolismo secundário	13
1.3.3	Regeneração.....	14
1.4	Biotransformação.....	15
1.4.1	Biotransformação em raízes transgênicas.....	17
1.4.2	Biotransformação de terpenos	17
1.5	Objectivos	18
2	Material e Métodos	19
2.1	Material vegetal	19
2.2	Regeneração.....	19
2.2.1	Regeneração espontânea	19
2.2.1.1	Peat pellets (JIFFY pellets)	19
2.2.1.2	Meio de cultura MS/2.....	20
2.2.2	Regeneração induzida	20
2.2.2.1	Higromicina B	20
2.2.2.2	Ácido salicílico.....	21
2.2.2.3	Radiação Ultravioleta.....	21
2.3	Biotransformação.....	21
2.3.1	Estudo do crescimento.....	22
2.3.1.1	Método da desassimilação	22
2.3.1.2	Medição do peso fresco	23

2.3.1.3	Determinação do peso seco	24
2.3.2	Estudo da componente volátil.....	24
2.3.2.1	Isolamento da componente volátil.....	24
2.3.2.2	Análise da componente volátil	24
2.3.2.2.1	Cromatografia Gás-Líquido de alta resolução	25
2.3.2.2.2	Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa	25
3	Resultados e Discussão.....	26
3.1	Regeneração.....	26
3.2	Biotransformação.....	29
3.2.1	Estudo do crescimento das raízes transgênicas.....	29
3.2.2	Estudo da componente volátil das raízes transgênicas	31
3.2.2.1	Componente volátil constitutiva das raízes transgênicas	31
3.2.2.2	Componente volátil das raízes transgênicas após a adição de mentol....	34
3.2.2.3	Componente volátil das raízes transgênicas após a adição de geraniol..	36
3.2.2.3.1	Álcoois monoterpênicos (linalol, citronelol, α -terpineol).....	37
3.2.2.3.2	Aldeídos monoterpênicos (citral/geranial e neral)	39
3.2.2.3.3	Ésteres de acetato (acetato de citronelilo, nerilo e geranilo).....	40
4	Conclusão	44
5	Perspectivas futuras	46
6	Bibliografia.....	47

1 Introdução

1.1 *Anethum graveolens* L. na família *Apiaceae*

Anethum graveolens (aneto ou endro) é uma planta herbácea aromática que vegeta de Maio a Julho, pouco frequente no centro e sul de Portugal. É uma planta glabra, glaucescente, com um cheiro característico forte e um caule oco, estriado, ramoso, muitas vezes desde a base, com uma envergadura que varia de 10 a 60 cm (Figura 1.1a, b) (Coutinho 1939). Pertence à família das *Apiaceae* (*Umbelliferae*) que compreende cerca de 300 géneros e 3000 espécies aromáticas. Esta família é caracterizada, ao nível das estruturas secretoras, por possuir canais secretores com um conteúdo rico em voláteis e resinas, saponinas triterpenóides, cumarinas, poliacetilenos do tipo falcarinol, monoterpénos e sesquiterpénos (Judd *et al.* 2002). Os canais ou ductos secretores são cavidades alongadas. A sua ontogénese inicia-se a partir de algumas células do parênquima que, através de divisões assíncronas, formam uma cavidade por esquizogenia. O encontro destas cavidades origina os ductos (Cutter 1978). Estas estruturas podem ramificar criando uma rede intrincada que se estende pela raiz, através do caule, até alcançar inclusivamente as folhas, flores e frutos (*idem*). No epitélio destes canais algumas células iniciam a sua actividade secretora e os compostos biossintetizados, nos seus leucoplastos, são libertados para a cavidade do canal. As *Apiaceae* apresentam dois tipos de canais secretores esquizogénicos, os primários, triangulares e situados entre as células do periciclo, e os secundários, que se formam com o crescimento secundário, e que diferem dos primeiros no perfil de metabolitos secundários (Stahl-Biskup e Wichtmann 1991).

A cultura *in vitro* de raízes transformadas (Figura 1.1c, d), visando a obtenção de metabolitos secundários, tira partido destas características das *Apiaceae*, desde que os produtos secundários sejam produzidos na raiz, e não apenas aí acumulados, e que sejam produto unicamente do crescimento primário, uma vez que não se observa crescimento secundário em culturas de raízes transgénicas (Pasqua *et al.* 2005).



Figura 1.1 – *Anethum graveolens* L. a) fase vegetativa, b) fase floral, c) e d) raízes transformadas.

1.2 Metabolitos secundários

As plantas podem ser consideradas como fábricas bioquímicas em evolução há cerca de 440 milhões de anos. A imensa variedade de metabolitos nos sistemas vegetais pode ser dividido em dois grupos, os metabolitos primários, envolvidos nos processos metabólicos primários como a respiração ou a fotossíntese, e os metabolitos secundários, com vias metabólicas próprias mas, na sua maioria, derivadas e intimamente interligadas com as primárias (Seigler 1998). São, deste modo, biossinteticamente derivados dos metabolitos primários. São de distribuição limitada no reino vegetal, estando restritos a grupos taxonômicos particulares (espécie, género, família, ou grupos de famílias relacionados) (Balandrin *et al.* 1985).

Embora inicialmente considerados como desperdícios metabólicos, hoje sabemos que, os produtos do metabolismo secundário, têm inúmeras funções ao longo da vida da planta. Podem funcionar como: 1) mediadores na interação da planta com o meio biótico (planta-insecto, planta-microorganismo, planta-planta, etc.), actuando em mecanismos de defesa como a alelopatia ou a produção de substâncias de reconhecimento e repelentes de herbivoria; 2) mediadores nos mecanismos de defesa da planta a factores abióticos, como indutores de acção anti-transpirante ou como protectores em situações de altas temperaturas ou radiação, e 3) compostos de importância fulcral na reprodução vegetal, particularmente na atracção de polinizadores. Podem ainda determinar aspectos importantes na qualidade de alimentos (sabor, cor ou cheiro) (Figueiredo 1992, Verpoorte e Memelink 2002). Muitos metabolitos secundários têm uma estrutura química única e a sua produção é muitas vezes incrementada por condições de stress, biótico e abiótico (Oksman-Caldentey e Inzé 2004). A natureza complexa destes produtos, produzidos em vários tipos de estruturas secretoras, é influenciada e controlada por factores genéticos e ecológicos e significativamente pelo modo de extracção (Figueiredo *et al.* 2007).

1.2.1 Óleos essenciais

Um óleo essencial, também designado de essência, é uma mistura complexa de constituintes voláteis produzidos por organismos vivos. A sua produção e função na natureza é ainda muito discutida, no entanto, parecem ser de importância fulcral na defesa, sinalização ou como parte do metabolismo secundário. Consequentemente são uma importante fonte de produtos naturais. São comumente encontrados nas Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Hypericaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae, Santalaceae, Zingiberaceae e Zygophyllaceae (Hüsni *et al.* 2007).

Os óleos essenciais, fracções de óleos ou isolados são utilizados em sabores e fragrâncias na alimentação, perfumaria, cosmética, química fina, indústria farmacêutica, etc. A obtenção de óleos essenciais processa-se pela destilação por água, vapor ou a seco. Esta metodologia pode extrair os óleos essenciais associados, por exemplo, a resinas mas não os compostos voláteis glicolisados, que necessitam de ser hidrolisados antes da extracção (Figueiredo *et al.* 1996).

Os óleos essenciais são constituídos por hidrocarbonetos voláteis e derivados oxigenados e podem ser de natureza terpénica ou não-terpénica. Os seus componentes existem na forma

de álcoois, ácidos, ésteres, epóxidos, aldeídos, cetonas, aminas, sulfidos, etc. A componente terpénica pode ser constituída por monoterpenos, sesquiterpenos e alguns diterpenos. Da componente não terpénica podem fazer parte compostos do grupo dos hidrocarbonetos, poliacetilenos, fenilpropanóides, ácidos gordos e os seus ésteres, ou produtos da sua decomposição (Hüsnü *et al.* 2007).

1.2.1.1 Terpenos

Os terpenos, ou isoprenóides, formam o grupo mais diversificado de metabolitos secundários, estando identificados, hoje em dia, mais de 25000 compostos (Singer *et al.* 2003, Yazaki 2004). São formados por condensações repetitivas de unidades C5 ramificadas, com base na molécula de isopreno, um dos voláteis mais abundantes. Dependendo do número das unidades de isopreno, os terpenos podem ser denominados de hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e moléculas maiores como os politerpenos [(C5)_n, n>8] (ex. os polímeros guta-percha e a borracha) (Croteau *et al.* 2000, Yazaki 2004).

A biossíntese de isoprenóides pode seguir duas vias, a do mevalonato ou a via independente do mevalonato (Figura 1.2). A via do mevalonato envolve a condensação, em duas reacções, de três moléculas de acetil co-enzima A (acetil-CoA) e subsequente formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (Yazaki 2004). Este substrato é depois reduzido pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR), uma importante enzima que é fortemente regulada nos animais e constitui o passo limitante nos sistemas vegetais. Bloqueando a enzima HMGR coloca-se em causa esta via. A acção desta enzima origina o ácido mevalónico (Yazaki 2004), que é sujeito a reacções de fosforilação, descarboxilação e desidratação originando o isopentenil difosfato (IPP) (Croteau *et al.* 2000, Taiz e Zeiger 2002). A via do mevalonato é responsável pela formação de sesqui-, tri-, politerpenos e esteróis, no citosol e retículo endoplasmático.

A via independente do mevalonato pode, também, ser denominada de via DXP (1-deoxi-D-xilulose fosfato) ou de via MEP (metileritritol fosfato).

Introdução

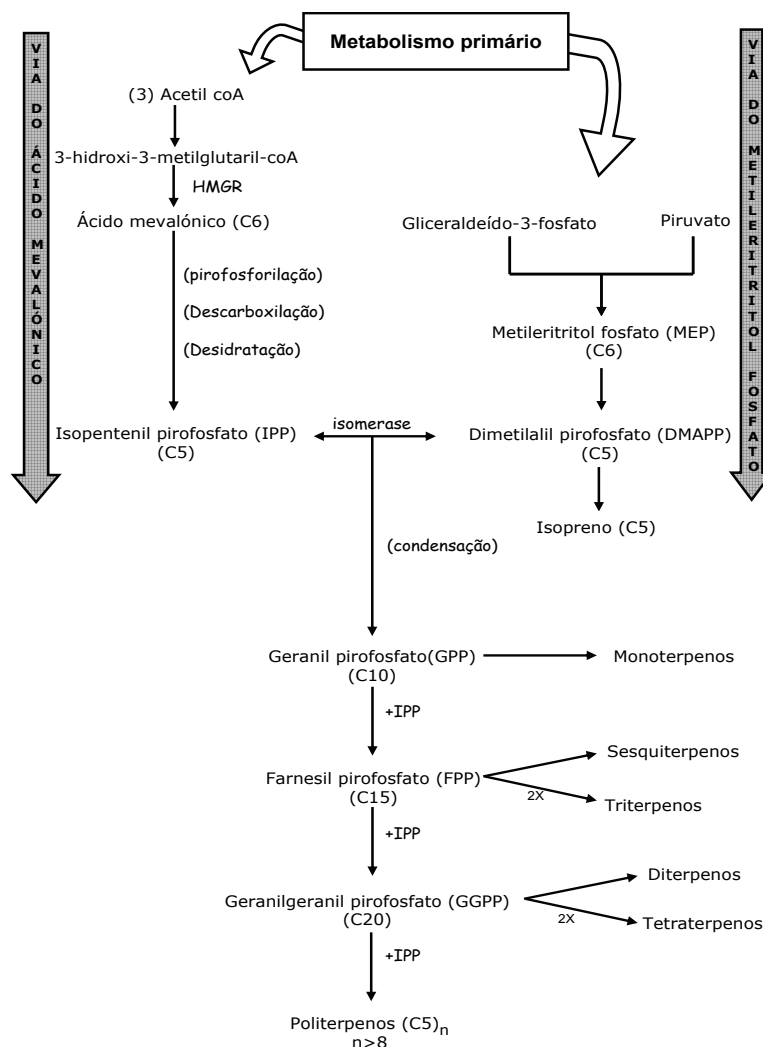


Figura 1.2 – Biossíntese de terpenos pela via do ácido mevalónico e pela via do metileritritol fosfato (adaptado de Seigler 1998 e Costa 2005).

A DXP resulta da primeira reacção de condensação, entre gliceraldeído-3-fosfato e piruvato, provenientes do metabolismo primário, e origina o MEP por rearranjo e redução. Posteriormente são formados os compostos interconvertíveis IPP e DMAPP (Figura 1.2). A via MEP, localizada na componente plastidal, é responsável pelos mono-, di- e tetraterpenos e pelos carotenóides, plastoquinona e fitol (Croteau *et al.* 2000, Yazaki 2004).

O isopreno e os isoprenóides são biossintetizados a partir do dimetilalil pirofosfato (DMAPP) ou do seu isómero isopentenil pirofosfato (IPP) (Yazaki 2004). O IPP é utilizado em várias reacções de aumento de cadeia na produção de uma série de homólogos prenil difosfato, que funcionam como precursores para as diferentes famílias de terpenóides (Figura 1.2). A condensação de duas moléculas de IPP leva à formação de geranyl pirofosfato (GPP), uma molécula em C10 precursora dos monoterpenos. A

condensação de GPP com uma molécula de IPP origina o farnesil pirofosfato (FPP), a molécula em C15 precursora dos sesquiterpenos que, condensada com outra molécula de IPP, origina geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) em C20, precursor dos diterpenos. Posteriores dimerizações originam os tri- tetra- e politerpenos (Costa 2005, Hüsni *et al.* 2007).

Estas reacções de condensação são catalisadas por enzimas preniltransferase, homodímeros de 70 a 80 kD que necessitam de Mg^{2+} ou Mn^{2+} numa estequiometria de dois iões por sítio catalítico (Bohlmann 1998). Posteriores ciclizações e isomerizações produzem as várias conformações dos diferentes compostos terpénicos.

Os terpenos, cuja produção na planta é muito dispendiosa, e em particular os mono- e sesquiterpenos, constituem muitas vezes a fragrância do óleo essencial de flores, ervas e especiarias e são utilizados em aromas e perfumes (Gershenzon 1994, Yazaki 2004).

1.2.1.2 Fenóis

Este grupo, de cerca de 8000 compostos, compreende uma importante família de metabolitos, tanto primários como secundários. Os fenóis são metabolitos aromáticos que possuem ou possuíram um ou mais grupos hidroxilo ligados ao anel aromático (Croteau *et al.* 2000). Ao serem expostos ao ar estes compostos oxidam facilmente gerando produtos que formam complexos com proteínas inibindo a actividade enzimática. Em culturas de células a libertação destes produtos oxidados leva à inibição do crescimento (*idem*). Dos fenóis fazem parte compostos tão importantes como as lenhinas, os flavonóides, as cumarinas, entre outros (Yazaki 2004).

A biossíntese de fenóis envolve uma de duas vias, a do malonato/acetato ou a do ácido xiquímico (ou xiquimato). A via do xiquimato pode ser dividida em três partes: 1) condensação de eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato e subsequente ciclização e produção de ácido xiquímico, 2) transformação de xiquimato-3-fosfato em ácido corísmico e 3) transformação do corismato em outros produtos (Figura 1.3a) (Seigler 1998). Entre estes estão os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina, os precursores dos fenilpropanóides (Taiz e Zeiger 2002). A partir da fenilalanina são formadas a maioria das classes de compostos fenólicos secundários nas plantas (Figura 1.3b). Este aminoácido origina o ácido cinâmico, precursor do ácido benzóico, pela eliminação de uma molécula de amónia através da acção da enzima fenilalanina amónia liase (PAL).

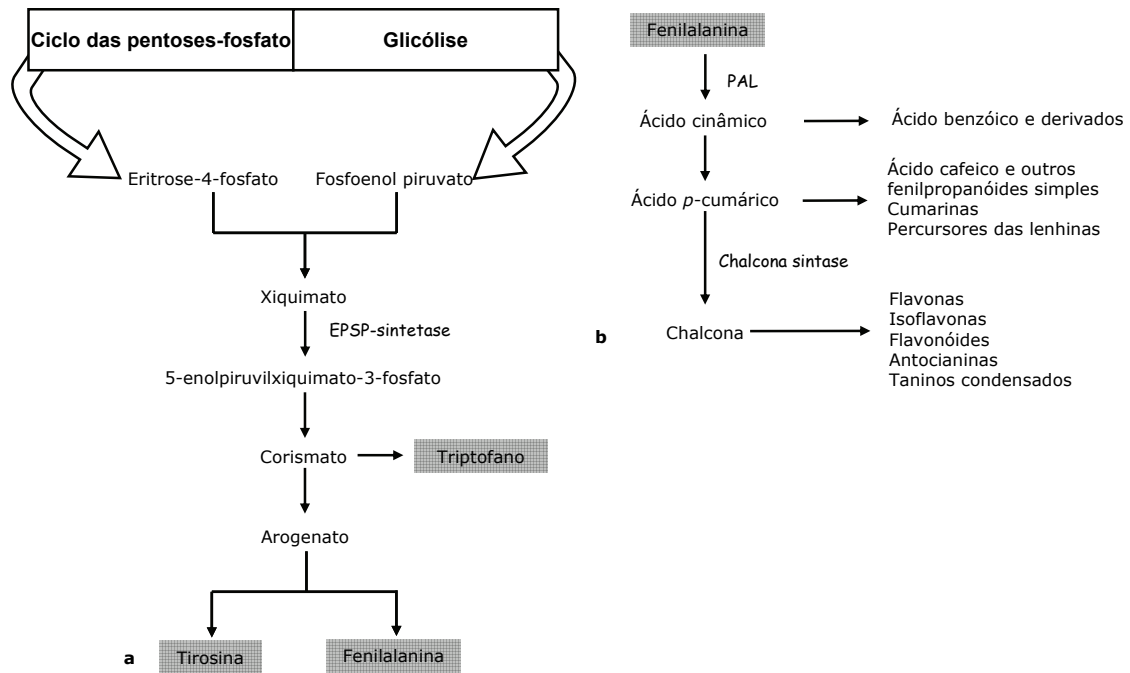


Figura 1.3 – Representação esquemática da a) via biossintética do ácido xiquímico e da b) via de formação de fenóis a partir da fenilalanina (adaptado de Costa 2005, Pereira 2006, Lobo e Lourenço 2007).

Esta enzima extremamente importante é vastamente estudada nos mecanismos metabólicos que aumentam a produção de fenilpropanóides (Kim *et al.* 2001, Winkel 2006). O ácido cinâmico dá lugar ao ácido cumárico, o precursor dos fenilpropanóides simples e das lenhinas (Pereira 2006, Winkel 2006). O ácido cumárico é o substrato da chalcona sintase, uma enzima chave no aumento da produção de flavonóides (Verpoorte e Memelink 2002), originando a chalcona, precursora de compostos tão importantes como as antocianinas (Winkel 2006).

Os fenóis são essenciais na sobrevivência das plantas vasculares. Os fenóis do metabolismo secundário, em particular, são responsáveis por várias funções de defesa na planta, pela cor das flores, pelas características que permitem diferenciar os vários tipos de madeira e contribuem substancialmente na formação de certos sabores e odores (Croteau *et al.* 2000).

1.2.1.3 Ácidos gordos

A maioria dos ácidos gordos ocorre naturalmente como ésteres de glicerol, ou triglicéridos, e são de extrema importância nas células vegetais tendo funções tão fulcrais como o armazenamento de energia ou a biogénese e regulação das membranas celulares (Seigler 1998). Muitos são metabolitos primários e estão envolvidos na respiração ou

armazenamento de energia, sendo ubíquos nas plantas. Como exemplo podem referir-se os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e também os ácidos mirístico e láurico (Seigler 1998). A biossíntese destes metabolitos, pela via do acetato, inicia-se nos plastos mas envolve também as mitocôndrias e o citosol. Juntamente com os poliacetilenos, estes compostos integram o grupo dos policétidos e partilham os primeiros passos da via biossintética (Dewick 1997).

As suas diversificadas estruturas são derivadas de cadeias de β -policetona, formadas por condensações de duas unidades em C2, como acetil-CoA. Neste caso podem ser consideradas como reacções de Claisen (Dewick 1997). No caso dos ácidos gordos verificou-se que esta série de reacções era mais complexa (idem). No estroma é formado malonil-CoA pela acção da acetil-CoA carboxilase (ACCase) sobre acetil-CoA, tendo como dador de CO₂ a co-enzima biotina (Seigler 1998). Esta reacção aumenta a acidez dos α -hidrogénios o que providencia um melhor nucleófilo para a condensação de Claisen. Deste modo, a síntese destes compostos dá-se por reacções sucessivas de condensação, em que a integração de malonil-CoA ocorre a par de uma descarboxilação e posterior redução a butiril-CoA (Dewick 1997, Bhat *et al.* 2005). Após a sua formação, a cadeia pode ser submetida à acção de enzimas desidrogenase e oxigenase, que induzem a insaturação e hidroxilação (Bhat *et al.* 2005).

1.2.1.4 Poliacetilenos

Os poliacetilenos são definidos pela IUPAC como compostos naturais que contenham grupos carbonilo e metileno alternados (β -policetonas) [1]¹ como resultado da repetição de reacções de condensação de Claisen (Seigler 1998).

Os poliacetilenos são derivados da via do acetato-malonato e estão, deste modo, relacionados com os ácidos gordos, nomeadamente nas reacções iniciais desta via biossintética (Seigler 1998). A via que conduz à síntese destas policetonas aromáticas separa-se da dos ácidos gordos muito cedo. Para os poliacetilenos as reacções de Claisen ocorrem até à formação de cadeias de β -policetona. Estas têm de ser estabilizadas, com o auxílio de grupos na superfície enzimática, até à formação e ciclização da cadeia. No caso

¹ Página da Internet – *vide* bibliografia

dos ácidos gordos os grupos carbonilo têm de ser reduzidos antes da ligação do próximo grupo malonato (Dewick 1997).

Os compostos deste grupo têm efeitos fisiológicos notáveis e muitos são usados como antibióticos. Destaca-se o falcarinol, que é um poliacetileno de baixa toxicidade para o homem mas com uma poderosa capacidade anti-fúngica (Seigler 1998) e potencialmente anti-cancerígena (Zheng *et al.* 1999). Ao contrário dos ácidos gordos os compostos acetilénicos estão restritos a um determinado número de *taxa* vegetais, não estritamente relacionados (ex. Apiaceae, Araliaceae, Asteraceae, Campanulaceae, Pittosporaceae) (Seigler 1998).

1.2.2 *Produção in vitro de metabolitos secundários*

A produção de metabolitos secundários pelas técnicas tradicionais de cultivo nem sempre é satisfatória, uma vez que, pode não só estar restrita a uma espécie ou género, como ser apenas activada durante um estágio de crescimento específico ou em condições ambientais características (Verpoorte *et al.* 2002). Além disto, algumas plantas são de cultivo difícil ou de crescimento muito lento, como algumas árvores do género *Chinchona*, cuja casca, rica em quinino, pode apenas ser colhida 10 anos após a plantação (idem). A abordagem biotecnológica tenta ultrapassar estas restrições numa sociedade crescente, que exerce cada vez mais pressão na disponibilidade de terrenos aráveis e na satisfação das necessidades urbanas (Rao e Ravishankar 2002). A biotecnologia permite tanto a utilização de células, tecidos, órgãos ou organismos integrais, pelo seu crescimento *in vitro*, como a manipulação genética, para a obtenção dos compostos desejados (idem).

Os metabolitos secundários são, por definição, produto da diferenciação, o que nem sempre ocorre em culturas de células. A princípio pensava-se que culturas de células não diferenciadas, como *calli* ou culturas de suspensões celulares, eram incapazes de produzir compostos do metabolismo secundário mas esta teoria revelou-se errada nos anos 90 com as experiências de Zenk (Zenk 1991, Bourgaud *et al.* 2001). Desde então foram estabelecidas culturas de células de inúmeras espécies de plantas aromáticas. No entanto, nas culturas de células não diferenciadas dificilmente existe uma produção considerável do metabolito desejado. Nestes sistemas o aumento da produção, muitas vezes, passa pelo uso de estratégias como a manipulação das condições de cultura, obtenção de regenerantes, produção em biorreactores e utilização de eliciadores como metiljasmonato, ácido

salicílico, quitosano ou metais pesados (Figueiredo 1992, Oksman-Caldentey e Inzé 2004, Costa 2005). Ainda assim, em algumas espécies a produção ocorre apenas em culturas de células diferenciadas, ou de órgãos, como culturas de raízes transgênicas ou teratomas meristemáticos (*shooty teratomas*). As primeiras favorecem a produção de alcalóides ao passo que os últimos produzem fundamentalmente monoterpenos (Verpoorte *et al.* 2002, Oksman-Caldentey e Inzé 2004). Nas raízes transformadas, o padrão de metabolitos secundários pode ser semelhante ao da planta original (Verpoorte *et al.* 2002).

1.3 Raízes transgênicas (*hairy roots*)

As raízes são o local de produção e/ou acumulação de muitos metabolitos de interesse económico. A colheita de raízes é destrutiva para a planta pelo que tem havido um interesse crescente na criação de raízes transgênicas de espécies aromáticas e medicinais (Guillon *et al.* 2006). As vantagens do uso de raízes transgênicas na produção de óleos essenciais são a) produção de elevada biomassa em pouco tempo, em relação às células em suspensão; b) crescimento contínuo sem fornecimento de hormonas; c) maior estabilidade de produção determinada por uma longevidade e integridade celulares; d) produção elevada de alguns metabolitos de baixa produção nas raízes da planta mãe; e) em algumas ocasiões, produção de novos compostos e f) o perfil em voláteis mantém-se na planta regenerada (Hamill e Lidgett 1997, Figueiredo *et al.* 2006).

A cultura de raízes transformadas *in vitro* é uma metodologia biotecnológica relativamente recente. Desde o princípio dos anos 80 que se relatava um rápido crescimento *in vitro* de raízes de algumas espécies quando transformadas pela bactéria *Agrobacterium rhizogenes*. Além disto, não era necessário suplementar hormonas de crescimento ao meio de cultura. Entretanto descobriu-se que a sua estabilidade e capacidade de produção de grandes quantidades de opina se deviam à integração de parte do DNA bacteriano no genoma da célula vegetal (Hamill e Lidgett 1997).

1.3.1 Infecção com *Agrobacterium rhizogenes* e estabelecimento de *hairy roots*

A. rhizogenes é uma bactéria do solo, Gram negativa, comum, com a capacidade de penetrar a planta através de uma ferida e provocar um crescimento anormal de raízes

secundárias, com inúmeros pelos radiculares, no local de infecção (Gelvin 1990, Ercan e Taskin 1999). O mecanismo subjacente à formação de raízes transgênicas baseia-se na transferência de vários genes da bactéria para a planta infectada. As alterações morfológicas observadas são atribuídas a parte de um plasmídeo que é transferido para a planta (plasmídeo Ri – *root inducing*).

Este plasmídeo, à semelhança do Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, é de grandes dimensões, (por vezes mais de 800 kpb), e contém duas regiões necessárias à formação do síndrome *hairy root*, a região T(transferido)-DNA, que vai ser transferida para a célula vegetal, e a região *vir* (virulência) (Gelvin 1990).

A maioria dos plasmídeos Ri contém duas regiões T-DNA que podem ser transferidas independentemente para a planta e integrar o seu genoma, onde os seus genes são transcritos pela RNA-polimerase II. Entre estes genes estão os responsáveis pela produção de enzimas envolvidas na biossíntese de fitohormonas, como auxina e citocinina, responsáveis pelo crescimento de raízes secundárias e pelo fenótipo *hairy root* (Komari *et al.* 2004). No entanto, os sintomas da planta infectada sugerem não um efeito de aumento da produção intracelular de auxinas mas uma maior sensibilidade a estes morfogénios (Ercan e Taskin 1999). Estudos moleculares e genéticos revelaram a existência, no T-DNA, de quatro loci relacionados com o efeito tumoral, *rol*(*root locus*)A, B, C e D que parecem modular a resposta das plantas às auxinas (Lourenço 1997). A expressão interactiva de todos os genes *rol*, sob o controlo dos seus próprios promotores, é necessária para eliciar o fenótipo *hairy root* (Gelvin 1990). Na região T-DNA estão também codificados os genes responsáveis pela produção e secreção de moléculas de baixo peso molecular denominadas de opinas, que funcionam na estirpe de *Agrobacterium* como fonte de carbono e em algumas ocasiões como fonte de azoto. Adicionalmente podem induzir a transferência dos plasmídeos entre bactérias por conjugação (Gelvin 1990). A classificação dos plasmídeos tem sido baseada nos tipos de opina produzida (manopina, agropina, cucumopina, nopalina e octopina). As estirpes mais investigadas de *A. rhizogenes* contêm os plasmídeos do tipo agropina, pRiA4 ou pRi1855, ou do tipo manopina, pRi8196 (Gelvin, 1990).

A região *vir* contém genes envolvidos no processamento e transferência do T-DNA para a célula vegetal (Gelvin 2003).

Em laboratório, após o ferimento, o material vegetal e a estirpe bacteriana são mantidos em co-cultura para que se dê a infecção e transferência genética (Hamill e Lidgett 1997, Hu e

Du 2006). As plantas infectadas libertam compostos fenólicos como a acetoseringona que activam os genes *vir* (Figura 1.4a) (Komari *et al.* 2004). A ligação da bactéria aos receptores da superfície da célula vegetal é essencial para a transferência (*idem*). O T-DNA e as proteínas Vir formam o complexo T que é transportado através do citoplasma e introduzido no núcleo, um processo mediado por NLS (*nuclear localisation signals*). Uma vez dentro do núcleo, o T-DNA começa a ser transcrito e inicia-se a integração no DNA vegetal (Komari *et al.* 2004).

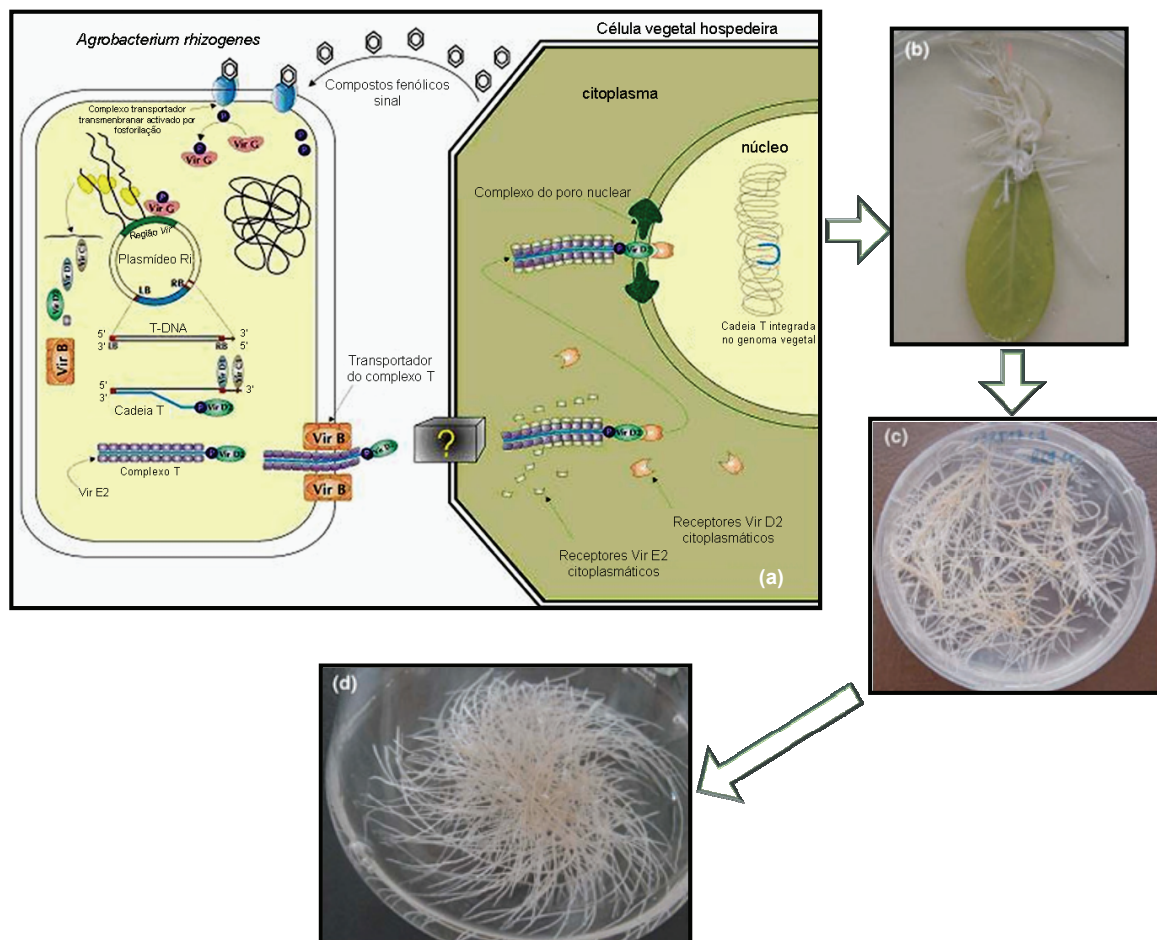


Figura 1.4 – Esquema representativo da obtenção de raízes transformadas. Após a infecção com *A. rhizogenes* (a) as células transformadas passam a produzir raízes (b). Com a eliminação da bactéria em meio com antibiótico (c) as raízes podem ser excisadas e mantidas em meio líquido (d) (adaptado de Gelvin 2003, Guillon *et al.* 2006 e de [2]).

Num espaço de 2 a 3 dias o explante pode ser transferido para um meio sólido suplementado com antibiótico, como cefotaxima, ampicilina, entre outros, para eliminar a cultura bacteriana (Hu e Du 2006). Num curto período de tempo, que pode ir de uma semana a um mês, dependendo da espécie em questão, surgirão as raízes transformadas

(Figura 1.4b), que podem então ser excisadas e mantidas em cultura sem adição de reguladores de crescimento. Numa primeira fase é necessário a suplementação de antibiótico mas no espaço de um mês, as raízes transgênicas, podem ser transferidas para meio de cultura sem antibiótico e mantidas com subculturas periódicas (Figura 1.4c e d) (Costa 2005, Hu e Du 2006).

O sucesso no estabelecimento de culturas de raízes transgênicas de determinadas espécies depende de vários factores como: a) a estirpe de *A. rhizogenes*, a do tipo agropina é normalmente usada visto ter uma capacidade indutora forte; b) explante apropriado, normalmente explantes de material juvenil; c) tipo de antibiótico, para eliminar a bactéria após a co-cultura e d) a composição do meio de cultura (Hu e Du 2006).

1.3.2 Crescimento e metabolismo secundário

O padrão de crescimento de raízes transgênicas em cultura difere significativamente do verificado em outras culturas de células. Nas raízes transgênicas a formação de novas células dá-se em tecidos específicos, os meristemas, ao passo que as outras células estão na fase da diferenciação, na formação de tecidos como o floema e xilema (Kim *et al.* 1995).

O crescimento das raízes transgênicas é efectuado pela formação de muitas ramificações laterais juvenis em ramificações parentais. As ramificações ocorrem em zonas que atingiram um determinado estado de desenvolvimento e o crescimento pode ser descrito matematicamente (*idem*). Deste modo diferem morfológicamente das raízes não-transformadas, sendo muito mais ramificadas e consecutivamente, com uma maior taxa de crescimento (Rhodes *et al.* 1997).

Podem ser identificadas 5 fases no crescimento de culturas de raízes transgênicas: (1) a fase de latência, que corresponde à adaptação da biomassa às novas condições do meio; (2) a fase exponencial, na qual o crescimento é máximo, assim como a taxa de divisão celular; (3) a fase linear, caracterizada pela diminuição da taxa de divisão e aumento da expansão celular; (4) fase de desaceleração, onde ocorre a diminuição da divisão e alongamento celulares, e finalmente (5) a fase estacionária, em que o a divisão continua mas sem aumento de biomassa (Costa 2005).

Nas raízes transgênicas a produção de metabolitos secundários dá-se, normalmente, na fase que sucede o crescimento exponencial (Costa 2005). Uma característica de elevada importância económica nestes sistemas resulta da produção de metabolitos secundários ser

concomitante com o crescimento. Assim pode obter-se uma fonte de metabolitos secundários, desde que haja crescimento contínuo (Bourgaud *et al.* 2001).

Muitas vezes o padrão de metabolitos produzido pelas raízes transgênicas é semelhante ao das raízes da planta original (Bourgaud *et al.* 2001), mas nem sempre é assim. Em algumas espécies a construção genética introduzida no DNA da planta pode alterar tanto quantitativamente como qualitativamente os metabolitos produzidos (Shanks e Morgan 1999). Santos *et al.* (2002) descreveram a constituição em voláteis de várias partes da planta de *Anethum graveolens* e das raízes transformadas, revelando diferenças significativas entre frutos, parte aérea, raízes e raízes transgênicas. Enquanto que nos frutos os componentes majoritários foram a carvona e o limoneno, na parte aérea dominava o α -felandreno. Nas raízes normais dominaram a carvona, o limoneno e o α -felandreno e nas transformadas estes componentes não foram detectados acima dos 0,05%, sendo dominantes o poliacetileno falcarinol e o fenilpropanóide apiole.

O crescimento secundário é de elevada relevância nos estudos de metabolitos secundários de raízes. Stahl-Biskup e Wichtmann (1991) estudaram os óleos essenciais de quatro espécies de Apiaceae e concluíram que as raízes na fase de crescimento primário diferiam, em termos de conteúdo em óleo essencial, das raízes com crescimento secundário. As primeiras eram ricas em hidrocarbonetos sesquiterpênicos. O aparecimento de raízes com crescimento secundário não só aumentava o seu conteúdo em óleo essencial como havia uma alteração rápida e dramática na sua composição.

1.3.3 Regeneração

A regeneração de plantas viáveis a partir de raízes transgênicas foi já demonstrada em variadas espécies de interesse agrícola, como a batata-doce, *Ipomoea batatas*, (Otani *et al.* 1993) ou *Crotalaria juncea* (Ohara *et al.* 2000), ornamentais e aromáticas ou medicinais, como *A Armoracia rusticana* (Saitou *et al.* 1992), *Hypericum perforatum* (di Guardo *et al.* 2003), *Catharanthus roseus* (Choi *et al.* 2004) ou *Aralia elata* (Kang *et al.* 2006).

Em alguns casos as raízes transgênicas têm a capacidade de regenerar espontaneamente. Por vezes a simples transferência para fotoperíodo é suficiente para a formação de regenerantes. Akashi *et al.* (1998) desenvolveram uma cultura de raízes transgênicas de *Lotus corniculatus* única, que combina um rápido crescimento com uma imediata regeneração, por embriogênese somática, após a transferência para fotoperíodo. Usando

culturas de raízes de uma planta medicinal, *Centaurium erythraea*, submetidas a um fotoperíodo de 16h luz, Subotić *et al.* (2003) conseguiram, no espaço de um mês, obter uma maior taxa de regenerantes em raízes transformadas do que em não transformadas. Frequências de regeneração superiores a 80% foram obtidas por Watase *et al.* (2004) em raízes transgênicas de *Ophiorrhiza pumila*, pela simples exposição a um fotoperíodo de 16h luz.

Noutros casos, a regeneração é apenas possível através da transferência das raízes transformadas para meio de cultura suplementado com reguladores de crescimento ou outros compostos. São frequentemente usadas as auxinas sintéticas, ácido naftalenacético (ANA) (Uozumi *et al.* 1992, Choi *et al.* 2004), ácido indolbutírico (AIB) (Uozumi *et al.* 1992), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Moghaieb *et al.* 2004, Kang *et al.* 2006) e/ou a citocinina benziladenina (BA) (Uozumi *et al.* 1996, Ohara *et al.* 2000, Choi *et al.* 2004, Zdravković-Korać *et al.* 2004, Kang *et al.* 2006).

Muitas vezes a regeneração não é conseguida, uma vez que esta resposta depende, em grande parte, da espécie, das condições da cultura, do genótipo e idade do explante (Hu e Du 2006).

A manutenção de culturas de raízes transgênicas como culturas de órgãos permite uma cultura a longo prazo e subsequente regeneração sem os problemas de deformações citológicas, associados a culturas de longo prazo. Além disto, a transformação com *A. rhizogenes* previne a regeneração de quimeras (Christey 1997). Mesmo assim, as plantas regeneradas diferem fenotipicamente da planta normal, apresentando alterações morfológicas visíveis, como nanismo, decréscimo da dominância apical, alterações na pigmentação, na morfologia foliar, no geotropismo radicular, no comprimento dos entrenós, na morfologia floral, e no tempo de geração da planta (Gelvin 1990), que podem resultar da actividade dos genes *rol* (Cui *et al.* 2001).

A produção dos metabolitos desejados é, por vezes, superior nas folhas de plantas regeneradas do que nas raízes transformadas o que torna a regeneração uma estratégia mais vantajosa, para a obtenção destes compostos (Uozumi e Kobayashi, 1997).

1.4 Biotransformação

A biotransformação permite não só a produção de compostos de uma maneira mais eficiente como, por vezes, a obtenção de novos compostos (Giri *et al.* 2001) através de

reações de oxidação, redução, hidroxilação, esterificação, metilação, isomerização e glicosilação, muito comuns nas células vegetais (Li *et al.* 2003). Estas reações químicas podem ser realizadas por órgãos, células, ou enzimas purificadas. Neste sentido, a biotransformação explora as propriedades únicas dos biocatalisadores (Giri *et al.* 2001).

Os biocatalisadores têm a capacidade de realizar conversões específicas de substratos complexos, o que difere da biossíntese, na qual substratos simples são alvo da acção de células, órgãos ou organismos (*idem*). Os biocatalisadores, geralmente enzimas, são mais vantajosos em relação à catálise química na medida em que são (a) mais eficientes, (b) selectivos, (c) capazes de realizar reações a pH e temperaturas não extremos, (d) menos dispendiosos e (e) menos prejudiciais ao ambiente (Franssen e Walton 1999, Giri *et al.* 2001).

No que diz respeito à selectividade, os catalisadores biológicos são quimio, regio e estereoselectivos. A quimioselectividade é a capacidade de reagir com um único grupo funcional quando no substrato estão presentes grupos funcionais de reactividade comparável. Um biocatalisador é regioselectivo quando, num substrato, consegue distinguir grupos funcionais idênticos em posições diferentes, criando ou quebrando ligações numa determinada direcção. A capacidade de reagir especificamente com um isómero numa mistura de estereoisómeros designa-se estereoselectividade (Franssen e Walton 1999).

A biotransformação em células ou culturas de células oferece a vantagem de os biocatalisadores estarem protegidos, pela membrana e parede celular, das condições adversas do meio, ao mesmo tempo que os co-factores são regenerados dentro das células o que permite cascatas de reações como a que conduz à produção de esteróides (de Carvalho e da Fonseca 2006). No entanto, a reprodutibilidade, nestes sistemas, torna-se difícil uma vez que podem ocorrer reações secundárias ou laterais (*idem*).

A aplicação da biotransformação em culturas de células tem sido muito importante na produção de metabolitos secundários, uma vez que, as células em cultura, muitas vezes não produzem metabolitos secundários ou produzem em baixas concentrações, apesar da presença de todos os intervenientes da via biossintética (Rao e Ravishankar 2002). No entanto, as concentrações dos produtos requeridos nem sempre são elevadas devido à multiplicidade dos metabolitos originados pela biotransformação.

1.4.1 Biotransformação em raízes transgênicas

As raízes transgênicas oferecem a vantagem de serem células diferenciadas o que aumenta a estabilidade genética evitando-se comportamentos bioquímicos instáveis (Giri *et al.* 2001).

São poucos os estudos de biotransformação usando raízes transgênicas e envolvem maioritariamente alcalóides. As raízes transgênicas de *Coleus forskohlii* produzem o diterpeno forskolina. Num estudo de Li *et al.* (2003) estas culturas foram sujeitas à aplicação de etanol e metanol e foi demonstrado que estes substratos eram biotransformados nos seus β -D-glucopiranosídeos e β -D-ribo-hex-3-ulopiranosídeos. A aplicação de 2-propanol resultou na formação de β -D-glucopiranosídeo. Os mesmos autores descrevem a biotransformação da cumarina umbeliferona por culturas de raízes transgênicas de *Panax ginseng* (Li *et al.* 2002). Costa *et al.* (2005) relatam a produção de ácidos gordos em culturas de raízes transgênicas de *Levisticum officinale* onde foi aplicado ácido linoleico, mas com efeitos negativos no crescimento e morfologia.

1.4.2 Biotransformação de terpenos

A biotransformação de terpenos permite a produção de sabores e fragrâncias enantiomericamente puras, podendo ser considerados de produtos naturais (de Carvalho e da Fonseca 2006).

Cerca de 65% das publicações realizadas na produção e/ou biotransformação de terpenos nos últimos 11 anos utilizaram como biocatalisadores células fúngicas ou bacterianas, apenas cerca de 11% foram de origem vegetal (*idem*). A capacidade selectiva dos biocatalisadores vegetais foi testada por Suga *et al.* (1983) em culturas de células em suspensão de *Nicotiana tabacum*. Os pares enantioméricos dos alcoóis bicíclicos borneol, *iso*-borneol e *iso*-pinocanfeol foram incubados com as culturas de células e apenas um composto, de cada par, foi preferencialmente biotransformado no seu carbonilo correspondente. Ning *et al.* (2003) estudaram a biotransformação do diterpeno triptonido por culturas de células em suspensão de *Platycodon grandiflorum*. Foram identificados cinco produtos, dois dos quais não existiam na planta. Usando culturas de células em suspensão de *Glycyrrhiza glabra*, Shams-Ardakani *et al.* (2005) detectaram a biotransformação de um conjunto de aldeídos monoterpénicos e compostos relacionados.

As culturas de células desta espécie revelaram a capacidade de reduzir a maioria dos aldeídos monoterpênicos aromáticos, saturados e insaturados, e aldeídos relacionados, nos seus álcoois primários. Destaca-se a hidrólise de acetato de bornilo em dois isómeros, *iso-* e *endo-borneol*.

1.5 Objectivos

A química orgânica de síntese é ainda a principal via de obtenção de importantes fitoquímicos, utilizados em medicamentos e compostos farmacêuticos, produtos e aditivos alimentares. No entanto, nos últimos anos, ressurgiu o interesse pelo consumo de produtos naturais, o que motivou a indústria a tentar vias alternativas de produção, nomeadamente a via biotecnológica. Neste contexto as culturas de raízes transgênicas oferecem um sistema flexível, facilmente manipulável, e uma tecnologia promissora para produção, em larga-escala, de metabolitos secundários importantes. A produção nestes sistemas é muitas vezes mais baixa do que na planta. Assim, e no sentido de alterar e/ou aumentar a composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial, pode recorrer-se à regeneração ou à biotransformação, uma metodologia que permite a conversão de substratos complexos, abundantes e de baixo custo em novos compostos mais valiosos.

Associando o atrás exposto à importância que os compostos terpênicos têm na sociedade actual, essencialmente na obtenção de aromas e fragrâncias, este estudo teve como objectivos:

- a) Obtenção de plantas regeneradas a partir de raízes transgênicas de *Anethum graveolens* e o estudo da sua componente volátil.
- b) Avaliação da capacidade de biotransformação de raízes transgênicas de *Anethum graveolens*, através do estudo da influência da suplementação dos monoterpenos mentol e geraniol no crescimento e composição da componente volátil.

2 Material e Métodos

2.1 *Material vegetal*

As raízes transgênicas (r.t.) de *Anethum graveolens* L. utilizadas nos diversos ensaios foram estabelecidas de acordo com o descrito por Santos *et al.* (2002) e mantidas em meio de cultura SH (Schenk e Hildebrandt 1972) suplementado com 30 g.l⁻¹ de sacarose. Foram mantidas em condições de obscuridade, a 24°C, sob agitação a 80 r.p.m, numa agitadora orbital Pilot-Shake RC-6U (Adolf Kühner AG, Suíça), e sujeitas a subculturas periódicas, com intervalos de 3 semanas.

2.2 *Regeneração*

A capacidade de regeneração foi testada em 2 tipos de ensaio, regeneração espontânea e induzida, nos quais foram utilizadas extremidades de r.t., com cerca de 4 cm, mantidas como descrito em 2.1. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

2.2.1 *Regeneração espontânea*

Nestes ensaios não foram utilizados indutores de regeneração.

2.2.1.1 *Peat pellets (JIFFY pellets)*

Os 6 *JIFFY pellets* (turfa prensada, JIFFY – 7, AS – jiffy products Norway) foram humedecidos em água por cerca de 15 min, até cessar a absorção. De seguida as r.t. foram colocadas na turfa cerca de 3 cm abaixo da superfície. Os *JIFFY pellets* foram mantidos a 24°C sob fotoperíodo de 24h, com lâmpadas Philips TLD 36W/84, e humedecidos regularmente durante cerca de 45 dias.

2.2.1.2 *Meio de cultura MS/2*

Para este ensaio foi adaptada a metodologia utilizada por Hoshino e Mii (1998), com alterações no tamanho do inóculo, fotoperíodo, sem adição de reguladores de crescimento ou indutores de regeneração e sem sub-cultura.

Foram utilizadas 4 caixas de Petri com 20 ml de meio MS/2 [meio MS (Murashige e Skoog 1962) diluído para metade] suplementado com 30 g.l⁻¹ de sacarose. Foram adicionadas, em assepsia, 2 extremidades de r.t. a cada caixa, tendo sido, seguidamente, seladas com película aderente e mantidas a 24°C, sob iluminação com lâmpadas Philips TLD 36W/84, num fotoperíodo de 16h luz, durante 90 dias.

2.2.2 *Regeneração induzida*

Nestes ensaios foram utilizados 3 indutores de regeneração, higromicina B, ácido salicílico e radiação ultravioleta.

2.2.2.1 *Higromicina B*

Foram estabelecidas 6 caixas de Petri como em 2.2.1.2, de acordo com uma adaptação da metodologia utilizada por Hoshino e Mii (1998), com alterações no tamanho do inóculo, fotoperíodo, sem adição de reguladores de crescimento e sem subcultura. De seguida, a partir de uma solução de higromicina B a 0,5 g.l⁻¹, foram filtrados, em assepsia, os volumes de 80 µl (2 caixas de Petri), 200 µl (2 caixas de Petri) e 280 µl (2 caixas de Petri) de modo a perfazer, no meio, as concentrações de 2 mg.l⁻¹, 5 mg.l⁻¹ e 7 mg.l⁻¹ respectivamente. As filtrações foram realizadas em filtros NALGENE, 0,2 µm. As concentrações utilizadas foram adaptadas de Hoshino e Mii (1998) mas o antibiótico *bialaphos*, utilizado por estes autores, foi substituído por higromicina B, que é considerado uma alternativa ao primeiro em meios de cultura para regeneração (Shrawat *et al.* 2007). Deste modo, as concentrações utilizadas, foram corrigidas numa relação de 1/10 (*bialaphos*/higromicina), como descrito em Shrawat *et al.* (2007). Os volumes anteriores foram adicionados ao centro da caixa, onde posteriormente foram colocadas as extremidades de r.t. As caixas foram seladas com película aderente e mantidas nas condições descritas em 2.2.1.2.

2.2.2.2 *Ácido salicílico*

Foi utilizada a metodologia descrita em 2.2.1.2 com a adição de ácido salicílico numa gama de concentrações adaptada de Hao *et al.* (2006).

Foram estabelecidas 6 caixas de Petri como em 2.2.1.2. A partir de uma solução aquosa estéril de ácido salicílico (AS) de concentração 8 g.l⁻¹, foram adicionados os volumes de 100 µl (2 caixas de Petri), 208 µl (2 caixas de Petri) e 345 µl (2 caixas de Petri) de modo a perfazer, no meio, as molaridades de 0,3; 0,5 e 0,8 mM, respectivamente. Os volumes foram adicionados ao centro da caixa, onde posteriormente foram colocadas as extremidades de r.t. As caixas foram seladas com película aderente e mantidas nas condições descritas em 2.2.1.2.

2.2.2.3 *Radiação Ultravioleta*

Utilizaram-se 8 caixas de Petri como descrito em 2.2.1.2. De seguida, foram sujeitas a 30min (tempo 0) de radiação UV-C, lâmpada Philips TUV 15W/G15 T8, e, discriminadamente, a 15 min nos 3 dias seguintes (Tabela 2.1). Sendo mantidas nas condições descritas em 2.2.1.2, entre os períodos de exposição e no tempo subsequente, durante 90 dias.

Tabela 2.1 – Padrão de tratamentos com radiação UV-C.

		Tempo (dias)			
		0	1	2	3
Códigos	2x caixa de Petri				
	30 ₀	30 min			
	30 ₁	30 min	15 min		
	30 ₂	30 min	15 min	15 min	
	30 ₃	30 min	15 min	15 min	15 min

2.3 *Biotransformação*

A capacidade de biotransformação de raízes transgênicas de *A. graveolens* foi testada com 2 substratos, o álcool monoterpénico secundário monocíclico mentol e o álcool monoterpénico primário acíclico geraniol.

Cada ensaio consistiu na manutenção de cerca de 48 frascos com culturas de r.t. e 4 com meio de cultura durante o período experimental de 49 dias, nas condições descritas em 2.1, sem sub-cultura. Por volta dos 15 dias, foi adicionado substrato, em assepsia, a 22 dos frascos com culturas de r.t. e a 2 dos frascos com meio de cultura (Tabela 2.2). O substrato foi adicionado a partir de uma mistura preparada previamente, em assepsia, de substrato-metanol (2% v/v) para perfazer uma concentração de 25 mg.l^{-1} em cultura. Para cada substrato foram realizados 2 ensaios (2 réplicas).

2.3.1 *Estudo do crescimento*

A avaliação do impacto de ambos os substratos no crescimento das raízes transgénicas de *A. graveolens* foi efectuada por três metodologias: o método da desassimilação (Schripsema *et al.* 1990), a medição do peso fresco e a determinação do peso seco. O crescimento foi avaliado num período de 49 dias.

2.3.1.1 *Método da desassimilação*

O método da desassimilação permite a avaliação indirecta da evolução, em termos de crescimento, de uma cultura de raízes transgénicas.

As r.t. foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 100 ml de volume de meio SH autoclavados há pelo menos 15 dias. Este tempo é necessário para a estabilização da evaporação após a esterilização das rolhas de poro reduzido e controlado utilizadas (rolhas de silicone T-32 Shin-Etsu Polymer-Silicosen, Freudenberg Simrit, Holanda). Em ambiente estéril, estes frascos foram tarados numa balança Sartorius L 420-*RC, gama 0-420 g, precisão 1 mg, e depois inoculados com 1 g de p.f. de raízes transgénicas previamente filtradas sob vácuo, perfazendo assim uma concentração de material de 10 g.l^{-1} .

No seu crescimento heterotrófico as raízes transgénicas utilizam a fonte de carbono presente no meio. Parte deste carbono vai integrar a biomassa da raiz e outra parte vai ser degradada nos processos metabólicos da respiração. Neste processo é formada uma mole de dióxido de carbono por cada mole de oxigénio consumido. A troca gasosa (O_2 , CO_2 e H_2O), a ocorrer através da rolha do frasco, vai provocar um decréscimo no peso geral do frasco. Para a obtenção do peso efectivamente perdido através da desassimilação, ou seja, a quantidade de carbono que sai do sistema que constitui o frasco, é necessário introduzir um

factor de correcção (para a perda de água por evaporação) e torna-se assim necessário a utilização de rolhas de poro reduzido e controlado e balança de precisão, utilizada em 2.3.1. Assim a utilização de frascos apenas com meio e com meio suplementado com substrato permitiu não só a subtracção do peso de água evaporada ao peso total perdido pela cultura ao longo do tempo experimental como também a anulação de qualquer efeito que a adição do substrato pudesse ter nesta evaporação.

Os Erlenmeyers utilizados neste ensaio foram pesados diariamente durante as 7 semanas. Ao fim das 7 semanas foram utilizadas na medição do peso, fresco e seco, e depois guardadas a -20°C para o estudo da componente volátil.

Tabela 2.2 – Padrão de frascos utilizado nos 4 ensaios

	2xErlenmeyer		
	Controlo	Experimental	Observações
Método da desassimilação	B1 R1	BS1 RS1	B= branco BS= branco+substrato R= controlo (10 g.l ⁻¹ de r.t.) RS= experimental (10 g.L-1 de r.t. + substrato)
Medição do peso fresco e seco e Resposta a longo prazo ao substrato	C1 C2 C3 C4 C5 C6	CS3 CS4 CS5 CS6	Cn= controlo (10 g.l ⁻¹ de r.t.) CSn= experimental (10 g.l ⁻¹ de r.t. + substrato) n=número de semanas
Resposta imediata ao substrato	E1 E4 E8 E24 E32 E48	ES1 ES4 ES8 ES24 ES32 ES48	En= controlo (10 g.l ⁻¹ de r.t.) ESn= experimental (10 g.l ⁻¹ de r.t. + substrato) n=número de horas

2.3.1.2 *Medição do peso fresco*

A amostragem foi feita semanalmente. Em cada momento da amostragem foram retirados 2 frascos de cultura controlo e 2 frascos de cultura experimental. As raízes transgénicas foram colocadas sobre papel absorvente durante 5-10 min para a remoção do excesso de meio de cultura e seguidamente pesadas numa balança de elevada precisão (Sartorius BP-210S, gama 0-210 g, precisão de 0,1 mg). Foram depois guardadas a -20°C para o estudo da componente volátil.

2.3.1.3 *Determinação do peso seco*

Para a determinação do peso seco foram utilizadas amostras das raízes utilizadas na medição do peso fresco. Em cada momento da amostragem foi retirada uma porção da cultura de r.t. que foi, seguidamente, pesada antes e depois da liofilização num liofilizador Christ Alpha I-5, a uma pressão de 10^{-1} mbar, a -42°C durante 3 dias. As pesagens foram realizadas na balança referida em 2.3.1.2. O peso seco da cultura foi depois inferido matematicamente pela comparação com a medição do peso fresco da cultura, da amostra fresca e da amostra liofilizada.

2.3.2 *Estudo da componente volátil*

Este estudo consistiu na realização de dois tipos de ensaio. O primeiro permitiu o acompanhamento do efeito do substrato a curto prazo (48h) na produção de voláteis. Neste foram retirados frascos suplementados com substrato e frascos controlo ao fim de 1h, 4h, 8h, 24h, 32h e 48h, e as r.t. foram armazenadas a -20°C até se proceder ao isolamento da componente volátil. O segundo focou-se no efeito do substrato a longo prazo (7 semanas) e consistiu no estudo da componente volátil isolada das r.t. utilizadas em 2.3.1.2.

2.3.2.1 *Isolamento da componente volátil*

A obtenção da componente volátil foi realizada por destilação-extracção num aparelho do tipo Likens-Nickerson (Likens-Nickerson 1964) utilizando o *n*-pentano destilado como extractante. A componente volátil foi isolada com uma velocidade de destilação de $3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e concentrada, à temperatura ambiente, num evaporador rotativo (Rotary Evaporator RE-51, Water Bath BM-51, Yamato) sendo, posteriormente, concentrada a um volume mínimo em *vial*, sob fluxo de azoto.

2.3.2.2 *Análise da componente volátil*

A componente volátil foi submetida a dois tipos de análise. A análise por cromatografia gás-líquido associada a espectrometria de massa (CGL/EM), visando a identificação dos compostos presentes na mistura volátil/pentano, e a análise por cromatografia gasosa (CGL) que permitiu a quantificação relativa dos compostos de todas as amostras. Em cada uma das análises realizaram-se duas injeções por amostra.

2.3.2.2.1 *Cromatografia Gás-Líquido de alta resolução*

As análises de CGL foram efectuadas num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois Detectores de Ionização de Chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injector, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 μm ; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 μm ; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C.min⁻¹, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min. Temperatura do injector e dos detectores, 290°C e 280°C, respectivamente. Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm.s⁻¹. Relação de repartição de fluxo, 1:50. A composição percentual da componente volátil foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção.

2.3.2.2.2 *Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa*

Nas análises de CGL/EM utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 μm ; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada como descrito em 2.3.2.2.1; temperatura da linha de transferência, 280°C; temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm.s⁻¹; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60 μA ; gama de massas, 40-300 u; tempo de varrimento, 1 s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos n-alcanos C₈-C₂₄ e dos seus espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório.

3 Resultados e Discussão

3.1 Regeneração

A regeneração pode influenciar a capacidade de produção de metabolitos secundários em culturas de raízes transgênicas (r.t.). Jacob e Malpathak (2005) estudaram a produção de *solasodine* em culturas de r.t. e culturas de r.t. regeneradas (com *shoots*) de *Solanum khasianum* e verificaram, nestas últimas, níveis superiores de produção de *solasodine*. Também Pereira (1999) verificou substanciais alterações na composição de voláteis extraídos de raízes transgênicas e de plântulas regeneradas de r.t. de *Pimpinella anisum*.

As raízes transgênicas (r.t.) de *Anethum graveolens* L., submetidas aos ensaios de regeneração espontânea e induzida, não produziram *shoots* nem plantas regeneradas.

As r.t. inoculadas nos *peat pellets* não apresentaram crescimento, nem capacidade regenerativa, nem reverdecimento e ao fim de 45 dias estavam completamente oxidadas. Com este ensaio tentou-se determinar se as r.t. desta espécie seriam capazes de demonstrar algum indício de regeneração em substrato sólido, após cerca de 10 anos de manutenção em meio de cultura líquido. As r.t., nas condições ensaiadas, não demonstraram qualquer capacidade de readquirir o fenótipo normal nem o fenótipo regenerante.

Os *peat pellets* são usualmente utilizados no estabelecimento de regenerantes após a formação de *shoots*. Por exemplo, Puddephat *et al.* (2001) usaram este substrato apenas na última fase da regeneração, para o enraizamento e crescimento de plantas regeneradas. As r.t. de *A. graveolens* parecem ser sensíveis a às condições do ensaio e ao substrato.

As r.t. mantidas em meio semi-sólido MS/2 não revelaram qualquer indício de formação espontânea de *shoots*. No entanto, a sua manutenção sob fotoperíodo de 16h de luz, em meio suplementado com 30 g.l⁻¹ de sacarose, induziu algumas respostas não observadas no ensaio em *peat pellets*. Foi observado, em todas as caixas de Petri, crescimento e ramificação radicular de r.t., mas apenas em alguns casos este crescimento foi acompanhado, a partir da 2^a semana, de um reverdecimento não muito acentuado e, a partir da 3^a semana, de formação de tecido caloso (Figura 3.1). No geral, a formação de tecido caloso acompanhava o reverdecimento.



Figura 3.1 – Reverdecimento e formação de tecido caloso em r.t. de *A. graveolens*. Barra = 0,45 cm.

A formação espontânea de *shoots*, em meio de cultura semi-sólido e sob fotoperíodo, a partir de r.t. foi já descrita para muitas espécies, como, por exemplo, *Astragalus sinicus* (Cho *et al.* 1998), *Antirrhinum majus*, em meio MS/2 (Cui *et al.* 2001), *Centaurea erythraea*, em meio MS (Subotić *et al.* 2003), *Hypericum perforatum* (Vinterhalter *et al.* 2006) e *Tylophora indica*, em meio MS (Chaudhuri *et al.* 2006). A obtenção da resposta de regeneração nem sempre ocorre e é muito variada entre famílias, espécies ou até estirpes de r.t.

Saitou *et al.* (1992) encontraram uma relação entre a formação de *shoots* em fotoperíodo e a duração da manutenção da cultura no escuro. Ao estudarem a regeneração espontânea de r.t. de *Armoracia rusticana*, sujeitas a diferentes intensidades e comprimentos de onda de luz, estes autores relataram que a frequência de formação de *shoots* e o número de *shoots* por explante tendiam a aumentar com o prolongamento em escuridão, do período anterior de cultura.

Cho e Widholm (2002) estudaram a regeneração em culturas r.t. de *Astragalus sinicus* com diferentes idades, uma mais jovem, com 8 meses, e outra com 3 anos, e concluíram que, independentemente do tempo de cultura, as r.t. conseguem manter a capacidade de regeneração de *shoots*. Neste estudo, quando sujeitas a fotoperíodo de 16 horas de luz, ambas as culturas não apresentaram qualquer formação *shoots*, no entanto, com a adição de BAP, numa gama de concentrações de 1-10 mg.l⁻¹, o crescimento foi inibido e deu-se a

formação de *calli* verde-escuros, num espaço de tempo de 3 a 4 semanas, que precederam a formação de *shoots*.

Tendo em conta os resultados obtidos por estes autores seria pertinente ensaiar a resposta do tecido caloso obtido a um tratamento com reguladores de crescimento, na tentativa de obter *shoots*.

O ensaio em meio de cultura MS/2 serviu de controlo aos seguintes ensaios, nos quais foram usados indutores de regeneração.

A adição de indutores de regeneração foi inconclusiva. Com a aplicação de diferentes concentrações de ácido salicílico (AS) ou higromicina B não foi observado crescimento nem reverdecimento, nem formação de tecido caloso e perto da 7^a semana o inóculo estava já completamente oxidado. Deste modo as concentrações utilizadas parecem ter sido tóxicas ao inóculo. Há que ter em consideração a metodologia utilizada, que não assegura uma distribuição uniforme da concentração na caixa de Petri, assim, uma baixa difusão da solução de higromicina B ou AS no meio de cultura poderá ter substancialmente aumentado a concentração do indutor na zona onde foi aplicado.

O AS é uma importante molécula sinalizadora envolvida nas respostas de defesa da planta, a patogéneos e stress abiótico, e também no crescimento e desenvolvimento. Hao *et al.* (2006) estudaram o efeito de AS na formação de embriões somáticos em explantes de folha de *Avena nuda* e verificaram que concentrações de cerca de 0,5 mM duplicavam o número de *calli* embriogénicos que formavam plântulas.

Hoshino e Mii (1998) estudaram o efeito da adição de *bialaphos* na regeneração de r.t. de *Antirrhinum majus* e verificaram que uma concentração de 0,5 mg.l⁻¹, embora tóxica, aumentava, em cerca de 60%, a regeneração de *shoots*. No presente trabalho, a substituição de *bialaphos* por higromicina B parece não ser vantajosa. Deverá ser feito um estudo que submeta as r.t. de *A. graveolens* a ambos, no sentido de verificar se, neste sistema, a sua acção pode realmente ser comparada.

A aplicação de radiação UV-C em diferentes tempos e com diferentes durações não foi conclusiva. Foi observado crescimento acompanhado de reverdecimento e formação de tecido caloso mas apenas em algumas caixas de Petri pontuais, independentemente do tratamento aplicado. Na figura 3.1 pode ser observada uma caixa de Petri com 2 r.t. separadas submetidas às mesmas condições de tratamento e apenas numa se observa crescimento, reverdecimento e formação de tecido caloso. A resposta de regeneração não é, assim, uniforme numa cultura de r.t. podendo ser dependente não só dos tratamentos

aplicados mas também do estado de crescimento ou do fundo genético da r.t., uma vez que uma única cultura pode conter r.t. com diferentes fundos genéticos. O fenótipo obtido neste ensaio não diferiu do obtido nas r.t. ensaiadas em meio MS/2 sem indutores de regeneração pelo que a aplicação de radiações UV-C, tanto na inoculação como nos 4 dias subsequentes, não parece ter qualquer efeito a longo prazo nas r.t. Os resultados obtidos não puderam ser comparados uma vez que na pesquisa bibliográfica não foram encontradas publicações que abordassem o uso de radiação ultravioleta na regeneração.

Há, finalmente, a ter em conta, nos ensaios de regeneração, que o material utilizado se encontra em cultura há cerca de 10 anos, o que pode estimular a ocorrência de alterações genómicas, como a redução do número de cromossomas. Zi e Jing (1996) estudaram o número de cromossomas e a capacidade de regeneração em r.t. de *Onobrychis viciaefolia* e verificaram que ao fim de 1 ano as células diplóides eram quase inexistentes. A par da redução cromossómica verificaram uma diminuição na capacidade de regeneração.

3.2 Biotransformação

3.2.1 Estudo do crescimento das raízes transgênicas

As r.t. mantidas durante 49 dias em meio SH, em condições de obscuridade permanente, com e sem a adição de substrato na 2ª semana, foram estudadas em termos de crescimento usando a metodologia da desassimilação, a determinação do peso fresco e do peso seco.

O estudo do crescimento pelo método da desassimilação permitiu a construção de um gráfico (Figura 3.2a) que correlaciona a acumulação da diminuição do peso, em g.l^{-1} , com o tempo.

Nas curvas são discerníveis uma fase latente que dura aproximadamente até ao 7º dia, seguida de uma fase exponencial, não muito acentuada, e depois uma fase linear até aproximadamente ao 30º dia, a partir do qual as culturas entram na fase estacionária.

A curva que representa a desassimilação das culturas controlo alcança um máximo de 9 g.l^{-1} . Os valores correspondem à média de 4 ensaios.

A adição de substrato, realizada na segunda semana experimental, não revelou grandes alterações de crescimento em termos de desassimilação. A curva que representa a desassimilação de culturas submetidas à adição de mentol, aproximadamente no 15º dia, não difere da curva da desassimilação das culturas controlo, havendo um aumento de desassimilação que se revela desde a inoculação.

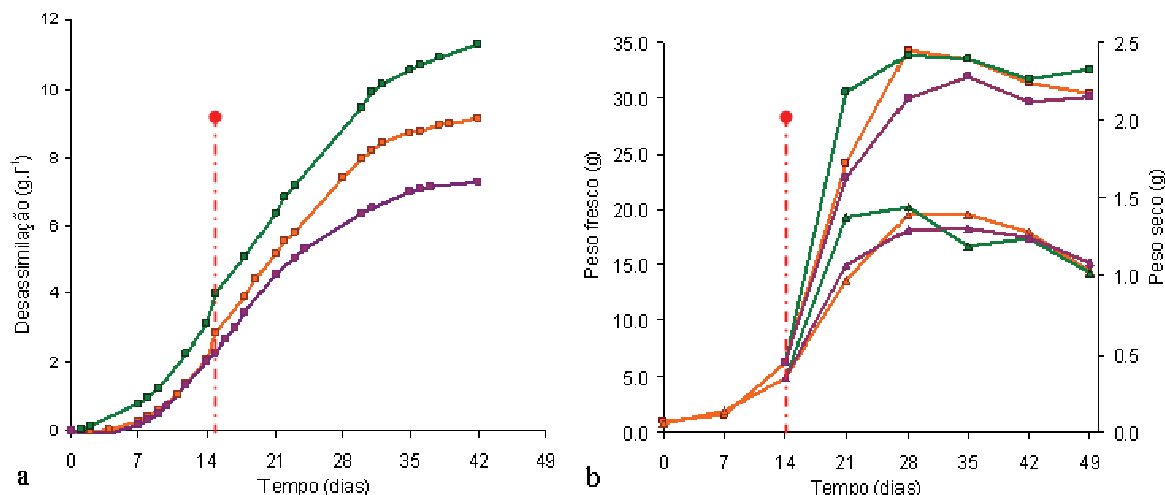


Figura 3.2 – Curvas de crescimento obtidas pelo método da desassimilação (a): controlo (■), com mentol (■) e com geraniol (■); pela medição do peso fresco (b): controlo (■), com mentol (■) e com geraniol (■); e pela medição do peso seco (b): controlo (▲), com mentol (▲) e com geraniol (▲). Momento de adição de mentol na 2ª semana (●).

A partir do 30º dia é atingida uma fase estacionária pouco acentuada na qual a desassimilação varia cerca de 2 g.l^{-1} . Os valores apresentados correspondem à media dos valores de 2 ensaios.

Tal como com o mentol, o geraniol não provocou, na desassimilação, diferenças substanciais em relação às culturas controlo. A fase estacionária começa a ser discernível pelo 30º dia atingindo um patamar após o 35º dia. Do 30º dia até ao fim do tempo experimental a desassimilação aumentou apenas $0,7 \text{ g.l}^{-1}$.

O crescimento avaliado pela medição do peso fresco (p.f.) e pela determinação do peso seco (p.s.) está representado na figura 3.2b. Tal como no gráfico que representa a desassimilação, é possível distinguir as várias fases de crescimento das culturas. Após uma fase de latência que tem uma duração aproximada de 7 dias segue-se uma fase exponencial e uma fase linear, que culminou num máximo de peso no 28º dia. A partir deste ocorre um ligeiro decréscimo de peso até ao final do tempo da experiência, resultante de uma diminuição da taxa de divisão acompanhada de maior morte celular.

A adição de substrato não alterou este padrão uma vez que tanto a curva que representa o crescimento das culturas sujeitas à adição de mentol como aquela das sujeitas à adição de geraniol não se afastam muito da curva das culturas controlo. Todas as culturas atingiram um máximo de peso fresco entre os 30 e 35 g e de peso seco entre os 1 a 1,5 g. Além disto,

as curvas de p.f. e p.s. seguem um mesmo padrão o que indica que o crescimento ocorreu como resultado de divisão celular e não apenas por um processo de turgescência celular.

Santos *et al.* (2002) estudaram o crescimento em r.t. de *A. graveolens*. Usando o dobro da concentração de r.t. em meio MS/2 líquido obteve resultados semelhantes para o padrão de crescimento medido pela desassimilação, pelo peso fresco e peso seco. Quanto à desassimilação, a fase estacionária foi alcançada por volta do 30º dia mas foi obtido um valor final de 12 mg.l⁻¹. As curvas de crescimento pelo peso fresco e seco demonstraram uma fase estacionária por volta dos 15 dias e um máximo de cerca de 13 g p.f. e 0.7 g p.s. Assim, tanto a concentração do inóculo como o meio de cultura e, conseqüentemente, os nutrientes disponibilizados, parecem ter influência no crescimento medido por peso fresco e peso seco mas não, substancialmente, em termos de desassimilação.

Um estudo por Figueiredo *et al.* (1996), sobre o efeito da biotransformação no crescimento de culturas de células em suspensão de *Achillea millefolium* relata, tal como o estudo presente, que o crescimento não é substancialmente afectado pela adição de mentol ou geraniol, não só na concentração ensaiada como em concentrações maiores (50 ou 100 mg.l⁻¹).

O crescimento de r.t. de *Levisticum officinale*, submetidas às mesmas condições do presente trabalho mas com uma concentração de inóculo de 20 g.l⁻¹, foi estudado por Nunes (2007). Neste trabalho, o crescimento, analisado através da desassimilação, peso fresco e peso seco, não foi substancialmente alterado pela adição de mentol ou geraniol.

É possível, deste modo, deduzir que a adição de álcoois monoterpénicos, nas concentrações analisadas, não parece influenciar, tanto positivamente como negativamente, o crescimento de culturas de r.t.

3.2.2 *Estudo da componente volátil das raízes transgénicas*

A componente volátil foi estudada num período de 7 semanas em intervalos de 7 dias e mais pormenorizadamente num espaço de 48h após a adição do substrato na 2ª semana, em r.t. mantidas em meio SH em condições de obscuridade.

3.2.2.1 *Componente volátil constitutiva das raízes transgénicas*

A componente volátil constitutiva das r.t. de *Anethum graveolens* está descrita na tabela 3.1, tal como as suas percentagens ao logo das 7 semanas, pela ordem de eluição na coluna

DB1. A componente volátil é constituída por, aproximadamente, 42 compostos que representaram, ao longo das 7 semanas, entre 73 e 93% da componente volátil. O grupo de compostos dominantes, cuja percentagem é superior a 5% pelo menos uma vez no período experimental de cultura, é constituído por falcarinol, apiole, ácido palmítico, ácido linoleico, miristicina e *n*-octanal.

O grupo de compostos dominante na componente volátil das r.t. de *A. graveolens* é o grupo dos poliacetilenos, representado pelo falcarinol (ou *panaxynol*), um potencial anti-cancerígeno (Zheng *et al.* 1999), cuja percentagem relativa varia entre os 9 e 52%. A fracção restante é dominada pelos ácidos gordos (12-25%) como o ácido palmítico (7-16%) e o ácido linoleico (3-9%), e o grupo dos fenilpropanóides cuja percentagem relativa varia entre 11% e 31% durante as 7 semanas, sendo essencialmente dominado pelo éter aromático apiole (9-24%). A componente terpénica apresenta uma baixa proporção relativa que varia de 4 a 10%, onde predominam, a partir da 3ª semana, os monoterpenos oxigenados (2-8%).

Estes resultados são parcialmente secundados pelos obtidos por Santos *et al.* (2002) para culturas de raízes transgénicas de *A. graveolens* havendo algumas diferenças significativas quanto aos componentes dominantes. O mais flagrante é a ausência de ácidos gordos no estudo anterior, o que se deve, muito provavelmente, ao uso de um meio de cultura com uma constituição diferente, como recentemente analisado por Costa (2005).

Ao longo das 7 semanas é perceptível um conjunto de tendências nos grupos de compostos. Assim, o grupo dos poliacetilenos, o falcarinol, não é dominante nas primeiras semanas mas rapidamente ascende a um máximo de 52%, mais de metade da componente volátil, na 4ª semana, voltando a diminuir, a sua proporção relativa, até ao fim do período experimental (Figura 3.3). Ao contrário do falcarinol, todos os outros grupos diminuem até aos 28 dias aumentando, depois, até à 7ª semana. Caso se procurasse estabelecer um protocolo para a produção de falcarinol a partir de r.t. de *A. graveolens* seria favorável a extracção da fracção volátil na 4ª semana, se esta se desse na 7ª semana, plenamente na fase estacionária, o grupo dos poliacetilenos estaria representado abaixo dos 10%, em proporção relativa.

É ainda visível, na última semana, uma clara prevalência de compostos do grupo Outros que, a par com uma diminuição na percentagem de identificação, revelam uma mudança na componente volátil com a manutenção da cultura na fase estacionária.

Tabela 3.1 - Composição percentual relativa da componente volátil de raízes transgênicas de *Anethum graveolens* mantidas em meio SH durante 7 semanas em condições de obscuridade.

Componentes	IR	Dias						
		7	14	21	28	35	42	49
Benzaldeído	927	0.1	0.3	0.9	0.3	0.3	0.6	0.8
α -Pino	930	0.5	v	0.8	0.1	v	0.3	0.4
<i>n</i> -Heptanol	952	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.2	0.6
Sabineno	958	v	v	v	v	v	v	v
1-Octen-3-ol	961	v	v	v	v	v	v	v
β -Pino	963	0.4	0.9	1.4	0.8	0.8	0.7	0.9
2-Octanona	967	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.4
2-Pentilfurano	973	v	0.1	0.2	0.7	0.1	v	0.7
<i>n</i>-Octanal	973	2.6	3.8	3.2	1.9	3.5	4.5	7.9
Benzeno acetaldeído	1002	0.3	0.2	0.7	0.2	0.3	0.3	0.6
<i>p</i> -Cimeno	1003	0.3	0.2	0.8	v	v	v	v
Limoneno	1009	0.3	0.8	1.1	0.4	0.3	1.1	0.8
<i>n</i> -Octanol	1045	0.1	v	0.5	v	0.1	v	0.2
2-Nonanona	1058	0.3	0.8	0.6	0.3	0.4	0.5	0.8
Terpinoleno	1064	0.3	0.1	0.2	v	v	v	0.4
2-Hexilfurano	1064	v	v	v	v	v	v	v
Feniletalcol	1064	v	v	v	v	v	v	v
Nonanal	1073	0.4	1.3	1.0	0.5	0.9	0.9	1.7
Vertocitral C*	1077	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3	0.6
<i>trans</i> -Tagetona	1116	0.3	0.5	1.1	0.8	0.9	1.5	2.6
<i>cis</i> -Tagetona	1123	v	v	0.2	v	v	0.4	v
2- <i>t</i> -Nonen-1-al	1114	0.9	0.9	1.2	1.1	1.2	2.1	3.5
Decanal	1180	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2	0.4	0.6
<i>cis</i> -Ocimenona	1200	0.7	0.1	0.6	0.3	0.3	0.5	1.1
<i>trans</i> -Ocimenona	1207	v	v	0.1	v	v	0.1	0.3
2- <i>trans</i> -Decenal	1224	0.5	1.0	0.7	0.5	0.5	0.8	2.1
2 <i>trans</i> -4 <i>cis</i> -Decadienal	1242	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	1.0
2-Undecanona	1271	0.4	0.1	0.1	0.3	0.3	0.5	0.5
Carvacrol	1286	0.7	1.1	1.0	2.2	2.5	2.3	3.3
2 <i>trans</i> -4 <i>trans</i> -Decadienal	1286	0.5	0.2	v	v	0.2	0.5	1.0
<i>trans</i> -2-Undecenal	1323	v	0.8	0.2	0.6	0.2	0.4	1.3
<i>trans</i> -4-Undecenal*	1402	0.6	0.6	0.3	0.5	1.1	1.1	2.0
Miristicina	1493	4.2	7.5	7.9	3.5	4.8	3.7	2.0
γ -Undecalactona*	1535	v	0.6	v	v	v	v	0.1
2,4-Dimetoxiacetofenona	1544	v	0.1	v	v	0.2	v	0.3
Dill apiole	1587	2.6	1.8	1.3	1.2	1.7	1.7	0.3
Apiole	1640	23.7	20.5	15.2	11.2	13.0	17.6	8.9
Ácido Mirístico	1723	0.5	0.2	v	0.2	0.5	0.1	v
Ácido Pentadecanóico*	1778	v	1.0	0.6	0.6	0.8	1.4	3.6
Ácido Palmítico	1908	16.4	14.6	14.7	6.7	8.1	12.3	9.3
Falcarinol	2002	17.2	23.8	27.4	51.6	42.6	25.1	8.8
Ácido Linoleico	2125	5.8	8.8	5.8	5.0	4.3	4.2	3.4
% de Identificação		81.7	93.5	90.8	92.5	90.9	86.7	72.3
Componentes agrupados								
Hidrocarbonetos monoterpênicos		1.8	2.0	4.3	1.3	1.2	2.3	2.5
Monoterpenos oxigenados		2.0	1.8	3.2	3.6	4.0	5.1	7.7
Poliacetilenos		17.2	23.8	27.4	51.6	42.6	25.1	8.8
Fenilpropanóides		30.5	29.7	24.4	15.9	19.5	23.0	11.2
Ácidos gordos		22.7	24.6	21.1	12.4	13.7	17.9	16.3
Outros		7.5	11.5	10.5	7.7	9.9	13.3	25.8

v = vestigial (<0,1%). IR = índice de retenção relativa a uma série de C₉-C₂₄ *n*-alcanos na coluna DB-1.

* = identificação baseada apenas no espectro de massa.

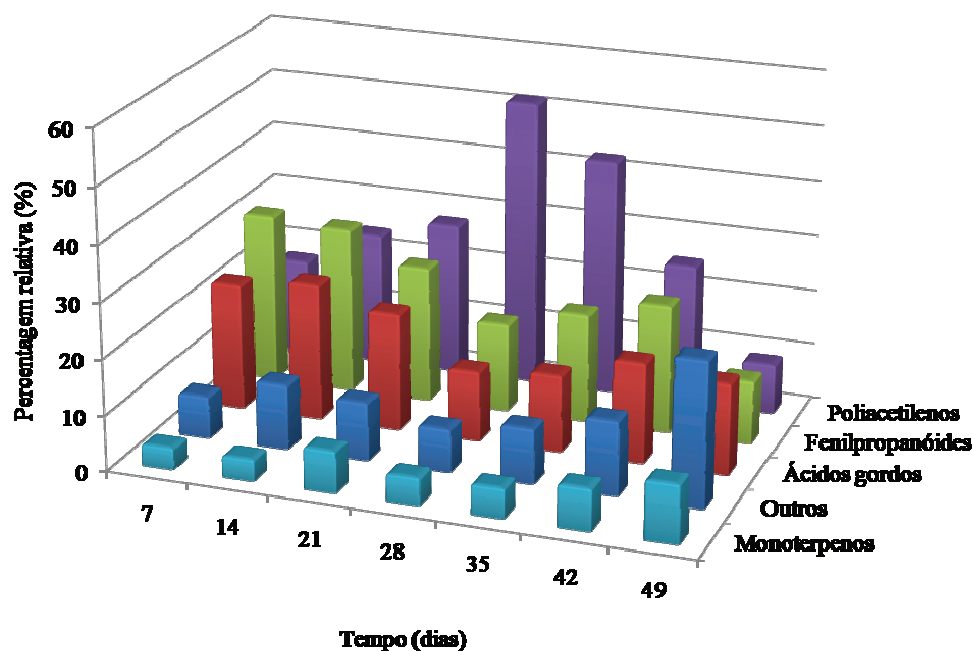


Figura 3.3 – Evolução dos poliacetilenos (■), dos fenilpropanóides (■), dos ácidos gordos (■), dos monoterpênicos (■) e dos outros constituintes (■), durante 49 dias.

3.2.2.2 Componente volátil das raízes transgênicas após a adição de mentol

O mentol (Figura 3.4a) é um álcool monoterpênico secundário, monocíclico saturado formado a partir de GPP.

A capacidade de biotransformação foi testada pela adição de mentol, na segunda semana de cultura. Na figura 3.5 estão representadas as curvas de evolução do substrato adicionado (mentol) e do produto obtido [acetato de mentilo (Figura 3.4b)], ausente da composição volátil constitutiva das raízes transgênicas de *A. graveolens*.

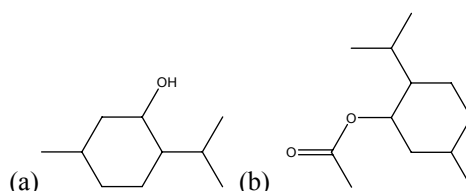


Figura 3.4 – Estrutura química de (a) mentol e (b) acetato de mentilo.

Nas primeiras 48 horas após a adição, o mentol é rapidamente transformado em acetato de mentilo. A porcentagem de mentol na componente volátil é de 52%, uma hora após a adição, diminuindo até 11% decorridas 48h. Concomitantemente é produzido acetato de mentilo, ascendendo de 4%, na primeira hora após a adição, até 55% passadas 48 horas. Decorridos 2 dias após a adição, o mentol não é completamente biotransformado, variando

a sua proporção entre 3% e 10%, no final do período experimental de cultura. O acetato de mentilo é lentamente assimilado ao longo do tempo, chegando, inclusivamente, a percentagens relativas menores do que o mentol na 7^a semana de cultura. A soma da proporção relativa de ambos os compostos varia entre 50 e 65% ao longo das primeiras 48 horas, mas diminui até valores de 11% no final do tempo experimental (Figura 3.5).

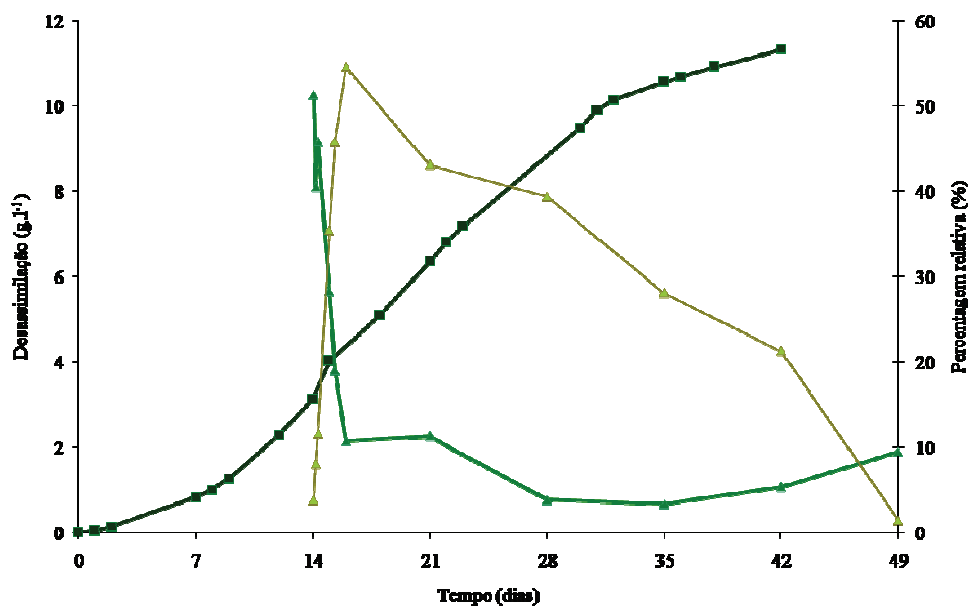


Figura 3.5 – Evolução das percentagens relativas de mentol (▲) e acetato de mentilo (△) desde o momento da adição do substrato até ao final do tempo de cultura ao longo do ciclo de crescimento, obtido pelo método da desassimilação em culturas com adição de mentol (■).

A transformação de mentol em acetato de mentilo foi estudada por Martinkus e Croteau (1981). Neste estudo, discos destacados de folhas de *Mentha x piperita* foram incubados com 0,26 μmol de *l*-mentol e após 12 horas foi detectada a formação de acetato de mentilo e glicósido de mentol. Os autores estudaram então as enzimas envolvidas nestas reacções. Em *Mentha piperita* a conversão de *l*-mentol em acetato de mentilo dá-se pela acção de uma acetil-CoA:monoterpenol acetiltransferase. Lange *et al.* (2000), estudando a mesma espécie, referem a enzima mentol acetiltransferase como responsável pela acetilação de mentol.

A biotransformação de mentol foi também estudada por Figueiredo *et al.* (1996), em culturas de células em suspensão de *Achillea millefolium*, uma composta. Neste estudo foram formados 2 produtos de biotransformação directa, mentona e acetato de mentilo. As medições de concentração foram realizadas 1h, 6h, 24h, 46h, 98h e 216h após a adição de

mentol e foi observado, num espaço de 24h uma rápida assimilação de mentol, de cerca de $15 \mu\text{g.l}^{-1}$ na primeira hora para $0,8 \mu\text{g.l}^{-1}$ passadas 46h. Os produtos da biotransformação não foram detectados acima dos $0,05 \mu\text{g.l}^{-1}$. É, no entanto, necessário ter em mente que neste estudo foram determinadas concentrações, enquanto que no presente estudo foram determinadas percentagens relativas, dos componentes na fracção volátil. Seria necessário uma quantificação efectiva para se poder fazer alguma comparação em termos de produção ao longo do tempo.

3.2.2.3 Componente volátil das raízes transgênicas após a adição de geraniol

O geraniol (Figura 3.6) é um álcool monoterpénico primário, acíclico formado pela hidrólise de GPP.

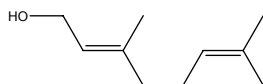


Figura 3.6 – Estrutura química do geraniol.

A componente volátil das culturas de r.t. suplementadas com geraniol foi estudada durante 7 semanas. Com a adição de geraniol foi observada a produção de 10 novos compostos resultantes da capacidade de biotransformação das r.t. Estes foram os álcoois linalol, α -terpineol e citronelol, os aldeídos neral e geranial, os ésteres acetato de citronelilo, de nerilo e de geranilo e os óxidos de nerol e de linalol, em proporções relativas vestigiais. Ao longo das primeiras 48 horas, os elementos não constitutivos, geraniol e compostos produzidos por biotransformação, totalizam aproximadamente metade da componente volátil, em cada tempo de amostragem. Nas semanas seguintes, até ao fim do tempo experimental, a proporção relativa destes compostos diminui até 7% (Figura 3.7 e 3.13). Esta tendência é também detectada na proporção relativa de mentol e acetato de mentilo (Figura 3.5) e pode estar associada à integração de qualquer um destes compostos na componente não volátil da planta, por processos como a glicosilação (Figueiredo *et al.* 1996, Nunes 2007) ou à volatilidade dos compostos monoterpénicos em cultura (King e Dickinson 2000).

Na hora a seguir à adição, o geraniol apresenta já uma percentagem relativa de 20%, superior, ainda, a qualquer um dos novos produtos. Neste tempo de amostragem é possível identificar a presença de todos os compostos novos identificados ao longo da experiência,

numa proporção superior a 0,1%. A percentagem relativa de geraniol, após a adição, diminui abruptamente em detrimento dos novos compostos produzidos. Ao longo das primeiras 48 horas a proporção relativa de geraniol diminui drasticamente atingindo valores inferiores a 3%, no tempo subsequente este valor diminui ligeiramente até 0,7%, na 5ª semana (Figura 3.7).

Everitt e Lockwood (1995) estudaram a capacidade de biotransformação de culturas de células de *Anethum graveolens*. O geraniol, aplicado nas concentrações de 10, 20, 30, 50, 100 mg.l⁻¹, foi activamente convertido em nerol, mas apenas quando adicionado nas concentrações de 20 e 30 mg.l⁻¹. Os autores não detectaram a produção de qualquer outro terpeno volátil e ambos, o geraniol e o nerol, tinham diminuído para valores vestigiais após 48 horas. Estes resultados indicam que, dentro da mesma espécie, a biotransformação depende grandemente do sistema utilizado.

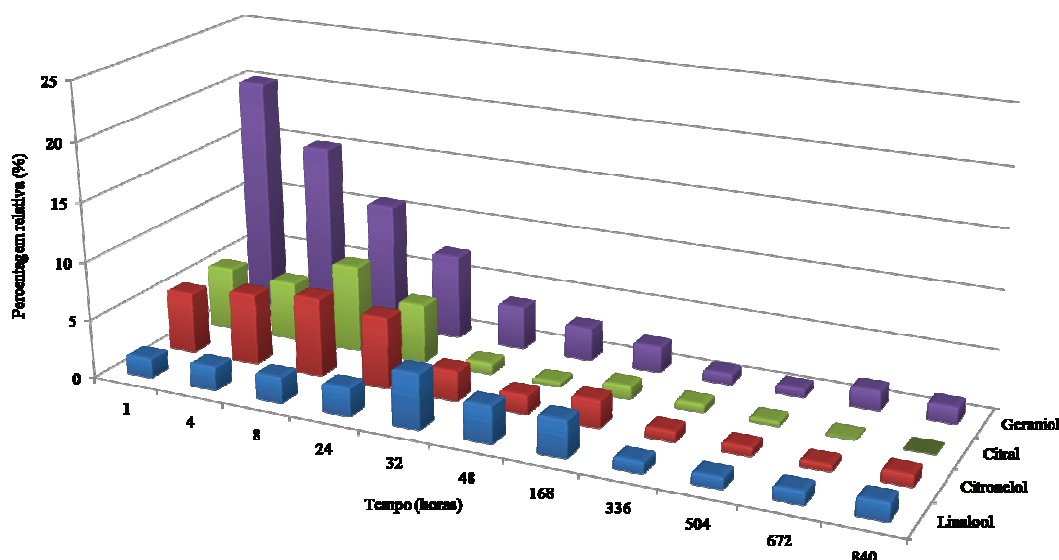


Figura 3.7 – Evolução de geraniol (■), citral (■), citronelol (■) e de linalol (■), desde o momento de adição do substrato até ao final do tempo de cultura.

3.2.2.3.1 Álcoois monoterpénicos (linalol, citronelol, α -terpineol)

O linalol (Figura 3.8) é um álcool terciário monoterpénico acíclico e é um isómero estrutural de posição do geraniol. A sua síntese é realizada pelo rearranjo de GPP em linalil pirofosfato (LPP) e posterior hidrólise.

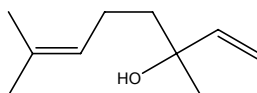


Figura 3.8 – Estrutura química do linalol.

A proporção relativa de linalol na primeira hora após a adição é de 2%, aumentando lentamente até um máximo de cerca de 5% após 32 horas. A partir da 3ª semana até ao fim do período experimental, a proporção relativa deste monoterpene mantém-se entre 1 e 1,5% da componente volátil (Figura 3.7). Estas proporções podem, no entanto, não corresponder unicamente ao linalol uma vez que este tem um índice de retenção muito próximo do nonanal e no cromatograma estão sobrepostos, o que dificulta uma leitura exacta da percentagem relativa.

O α -terpineol (Figura 3.9) é um álcool monoterpénico cíclico e é formado pela hidrogenação e ciclização do geraniol. Em meio ácido, esta reacção ocorre naturalmente e Bhat *et al.* (2005) relatam que, pela acção de ácido sulfúrico, a ciclização é 9 vezes superior em nerol do que em geraniol.

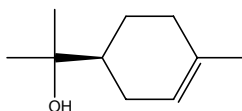


Figura 3.9 – Estrutura química de α -terpineol.

Este composto aumenta em proporção relativa até um máximo de 3% na 3ª semana diminuindo abaixo de 1%, no final da experiência.

O citronelol (Figura 3.10) é um álcool monoterpénico acíclico, também designado dihidrogeraniol e resulta da redução de geraniol.

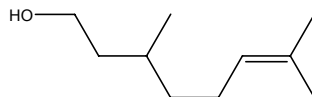


Figura 3.10 – Estrutura química de citronelol.

Na componente volátil isolada durante as primeiras 48 horas, este composto tem uma proporção relativa inicial de 5% que aumenta até um pico de cerca de 7% na 8ª hora e decresce rapidamente abaixo de 2% nas 48 horas, mantendo-se abaixo deste valor nas semanas seguintes (Figura 3.7).

Estes álcoois foram também obtidos num estudo de biotransformação realizado com r.t. de *Levisticum officinale* submetidas às mesmas condições do presente estudo. Foi também

detectado, neste estudo, a formação de nerol, ao contrário do presente estudo, o que pode indicar que algumas enzimas desta via são específicas da família enquanto que outras são características da espécie, ou até do sistema utilizado.

A biotransformação de álcoois terpénicos tem sido extensamente estudada em culturas de células microbianas. King e Dickinson (2000) estudaram a biotransformação de álcoois monoterpénicos em *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* e *Kluyveromyces lactis*. Em *S. cerevisiae*, a aplicação de geraniol resultou na produção de citronelol, linalol e α -terpineol, já o linalol adicionado foi convertido em α -terpineol, o que indica que o α -terpineol, detectado na adição de geraniol, pode ter resultado de uma biotransformação do linalol formado. Estes produtos foram também obtidos em *K. lactis* e *T. delbrueckii*, que não produziu citronelol.

A biotransformação de acetato de linalilo por culturas de células em suspensão de *Peganum harmala* foi estudada por Zhu e Lockwood (2000). Este éster de acetato, aplicado numa concentração de 25 mg.l^{-1} , foi rapidamente convertido em linalol e α -terpineol.

Estes estudos demonstram que qualquer produto obtido pode derivar não só de reacções independentes a partir de geraniol mas também de reacções de um intermediário detectado entre os produtos.

3.2.2.3.2 Aldeídos monoterpénicos (citral/geranial e neral)

O citral (Figura 3.11) corresponde a uma mistura de dois isómeros de dupla ligação, o *E*-isómero é conhecido por geranial ou citral A, e o *Z*-isómero por neral ou citral B. Estes produtos são formados pela oxidação do geraniol.

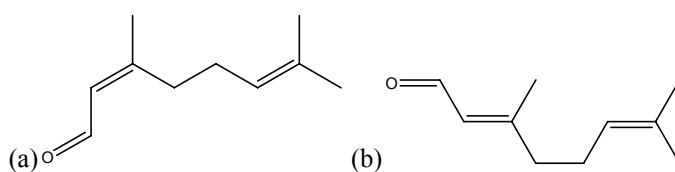


Figura 3.11 – Estrutura química de (a) neral e (b) geranial.

Ao longo do tempo experimental, a proporção relativa destes dois isómeros mantém-se aproximadamente numa relação 1:1. Nas primeiras 24 horas a proporção desta mistura mantém-se, aproximadamente, nos 5%, havendo apenas um pico máximo de cerca de 8%

na 8ª hora. Nos tempos seguintes esta proporção relativa mantém-se em cerca de 1% (Figura 3.7).

Figueiredo *et al.* (1996) obtiveram resultados semelhantes em culturas de células em suspensão de *Achillea millefolium*. A biotransformação de geraniol formou nerol, geranial e neral em concentrações substanciais apenas nas primeiras 24 horas, tornando-se, depois, vestigiais, inferior $0,05 \mu\text{g.l}^{-1}$. Estes autores detectaram também, em concentrações vestigiais, mais 10 produtos da biotransformação de geraniol, entre eles limoneno, e os óxidos de linalol e nerol. No presente trabalho não foi detectado nerol. O limoneno faz parte da composição constitutiva da componente volátil das r.t. de *A. graveolens*, pelo que a metodologia utilizada não possibilitou isolar eventuais alterações na sua produção.

Já Nunes (2007), ao contrário do presente estudo, relata a formação de nerol e neral, mas não de geranial, a partir de geraniol adicionado a culturas de r.t. da umbelífera *Levisticum officinale* submetidas às mesmas condições do presente estudo.

Hoje em dia não está estabelecido se o citral é formado a partir do geraniol pela acção de uma álcool desidrogenase ou por uma oxidase, nem mesmo se o geraniol é o único substrato na formação de citral, uma vez que o nerol pode também servir de precursor (Iijima *et al.* 2004).

3.2.2.3.3 Ésteres de acetato (acetato de citronelilo, nerilo e geranilo)

Os ésteres de acetato nos sistemas vegetais são normalmente resultado da acção de uma enzima álcool acetiltransferase (AAT) que transfere o resíduo acetil da molécula acetil-coA para um substrato alcoólico.

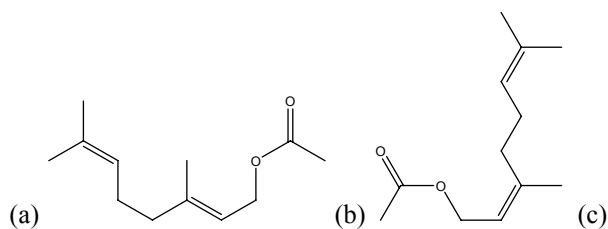


Figura 3.12 – Estrutura química de acetato de (a) geranilo, (b) nerilo e (c) citronelilo.

A evolução dos ésteres de acetato formados (Figura 3.13) é manifestamente inversa à evolução do geraniol ao longo das 7 semanas. Nas primeiras 48 horas após a adição, o aumento da proporção relativa dos ésteres de geranilo (Figura 3.12a) e nerilo (Figura

3.12b) é concomitante com o decréscimo na proporção relativa de geraniol. Ambos estes produtos são imediatamente detectados em proporções relativas de 8 e 3%, respectivamente, na primeira hora. Ao fim de 48 horas atingem uma proporção relativa máxima de 24 e 19%, respectivamente, e, nas semanas seguintes, diminuem abaixo de 1% (Figura 3.13).

O acetato de citronelilo (Figura 3.12c) aumenta lentamente nas primeiras horas e atinge um pico máximo de cerca de 6% na 3ª semana. Ao longo das semanas seguintes diminui lentamente, mantendo uma proporção relativa de cerca de 2% na 7ª semana (Figura 3.13). Este atraso na obtenção do máximo de proporção relativa em relação aos outros ésteres de acetato pode indicar uma proveniência directa do álcool citronelol, por acetilação, uma vez que é visível um aumento deste ester após o citronelol atingir o seu máximo. No entanto, a formação de acetato de citronelilo pode dever-se também a reacções de redução sobre o acetato de geraniol (Figura 3.14).

A biotransformação de mentol e de geraniol foi estudada em *Achillea millefolium* (Figueiredo *et al.* 1996). As culturas de células em suspensão desta composta demonstraram a capacidade de biotransformar o substrato mentol em acetato de mentilo mas não conseguiram formar os ésteres de acetato do álcool geraniol nem do seu produto nerol.

Nunes (2007) estudou a biotransformação de mentol e de geraniol em r.t. de *Levisticum officinale*, uma umbelífera, nas mesmas condições do presente estudo. As culturas de r.t. desta espécie não biotransformaram mentol no seu éster de acetato mas produziram acetato de geraniol a partir de geraniol.

Deste modo, o processo de formação de ésteres de acetato parece ser específico para cada substrato e para cada espécie, uma vez que espécies da mesma família e de famílias diferentes demonstraram capacidades de acetilação de mentol e geraniol diferenciadas.

Castro *et al.* (1997) estudaram o processo de esterificação de álcoois terpénicos, empregando preparações comerciais de lipase imobilizada (*Lipozyme*) e chegaram a algumas conclusões no que concerne os efeitos do tamanho da cadeia do ácido e da estrutura do álcool. Segundo estes autores o ácido acético (C2) é a excepção entre os ácidos estudados uma vez que, enquanto estes obtiveram taxas superiores a 90% o ácido acético não ultrapassou os 14%.

A estrutura do álcool influenciou também o processo de esterificação. Estes autores obtiveram graus de esterificação de 95% para álcoois primários como citronelol, geraniol e

nerol mas não observaram esterificação em álcoois secundários e terciários como o mentol e linalol. Estabeleceram deste modo, para a preparação enzimática utilizada, uma relação hierárquica em que a esterificação de álcoois primários é favorecida em relação a ácidos secundários, e destes em relação aos terciários.

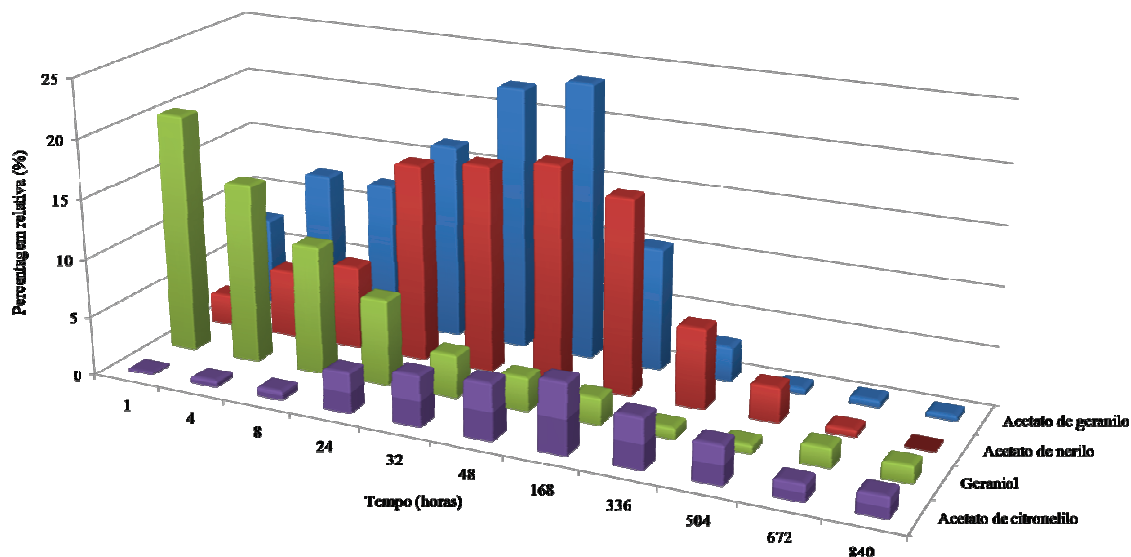


Figura 3.13 – Evolução dos acetatos de geraniol (■), nerilo (■) e citromelilo (■) e de geraniol (■), desde o momento de adição do substrato até ao final do tempo de cultura.

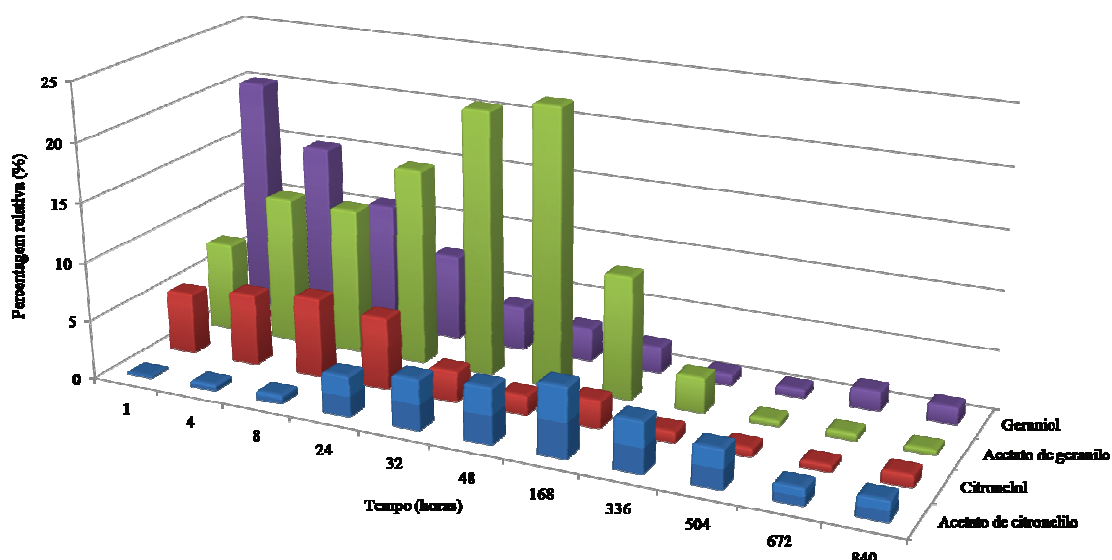


Figura 3.14 – Evolução de geraniol (■) e de acetato de geraniol (■) e de citromelilo (■) e de acetato de citromelilo (■), desde o momento de adição do substrato até ao final do tempo de cultura.

A otimização da produção de ésteres de acetato em raízes transgênicas através da biotransformação torna-se, assim, uma metodologia mais eficiente do que o uso de determinados preparados de enzimas purificadas.

4 Conclusão

O trabalho realizado permite avaliar a regeneração e compreender como a capacidade de biotransformação de álcoois monoterpénicos afecta o crescimento e a produção de voláteis de culturas de raízes transgénicas de *Anethum graveolens* L. As culturas estabelecidas foram mantidas em meio SH, em condições de escuridão permanente, a 24°C sob agitação orbital de 80 r.p.m. e na 2ª semana após a inoculação foi-lhes adicionado substrato, mentol ou geraniol, numa concentração de 25 mg.l⁻¹.

Durante 7 semanas as culturas foram pesadas e foram recolhidas amostras semanalmente e 1, 4, 8, 24, 32 e 48 horas após a adição de substrato.

O crescimento, analisado pela medição da desassimilação, peso fresco e peso seco, permitiu a distinção de 4 fases. Uma fase latente, até ao 7º dia, seguida de uma fase exponencial, não muito acentuada, e depois uma fase linear até ao 30º dia, a partir do qual as culturas entraram na fase estacionária. A análise do crescimento pelo peso fresco e peso seco revelou resultados semelhantes. A adição dos substratos monoterpénicos, às culturas, não demonstrou ter tido grande influência no crescimento, quando medido nestes parâmetros, o que beneficia qualquer estudo posterior que vise a obtenção de um produto da biotransformação de mentol ou geraniol em culturas de raízes transgénicas de *A. graveolens*.

A análise da componente volátil extraída das culturas controlo durante as 7 semanas revelou que as r.t. de *A. graveolens* são ricas em falcarinol, apiole, ácido palmítico, ácido linoleico, miristicina e *n*-octanal, que constituem uma percentagem relativa média de 70% da componente volátil constitutiva. O poliacetileno falcarinol foi o componente dominante e ao longo dos 49 dias atingiu um pico de percentagem relativa na 4ª semana decrescendo depois até ao final da 7ª semana. Todos os outros grupos de compostos variaram de maneira inversa, revelando a grande influência do falcarinol na componente volátil das r.t. de *A. graveolens*. Estudos anteriores revelaram poucas diferenças na componente volátil constitutiva o que nos indica a estabilidade genética do sistema de r.t. de *A. graveolens*.

Na segunda semana de cultura foi adicionado substrato a parte das culturas de r.t. O mentol adicionado foi rapidamente biotransformado no seu éster de acetato, acetato de mentilo, que diminuiu lentamente até ao fim do tempo experimental. O geraniol foi biotransformado em, pelo menos, 10 produtos: os álcoois linalol, citronelol e α -terpineol; os aldeídos neral e geranial, os acetatos de geranilo, nerilo e citronelilo e os óxidos de

linalol e de nerol, em proporções relativas vestigiais. No geral, estes compostos aumentaram rapidamente, nas primeiras 48 horas mas diminuíram desse ponto até ao final do tempo experimental. As raízes transgénicas de *A. graveolens* parecem, deste modo, conter um grupo de enzimas que actua sobre compostos monoterpénóides. Estão certamente presentes, entre outras, isomerases, que formaram os álcoois a partir do geraniol, desidrogenases, que produziram os aldeídos a partir do geraniol, e acetil transferases, responsáveis pelo aparecimento dos ésteres de acetato a partir do geraniol ou do mentol. Além destas, podem ter actuado outras isomerases, desidrogenases, redutases e oxidases no substrato e/ou nos produtos das primeiras. Apesar de não fazer parte da composição constitutiva das r.t. de *A. graveolens*, os álcoois geraniol e nerol foram sugeridos como fazendo parte dos componentes intermediários que originam carvona e limoneno, predominantes no óleo essencial das sementes desta espécie (Everitt e Lockwood 1995). Uma vez que não foram detectadas alterações na proporção de limoneno nem foi detectada carvona, pode inferir-se que as enzimas que actuam nesta via não se encontram presentes nas r.t. de *A. graveolens*.

A regeneração não foi bem sucedida. Os ensaios de regeneração espontânea e induzida não resultaram na formação de *shoots*. Este facto pode dever-se à estruturação da metodologia utilizada mas também à idade das culturas de r.t. de *A. graveolens*, em cultura há aproximadamente 10 anos. A obtenção de tecido caloso é, no entanto, promissora, uma vez que precede, muitas vezes, a formação de *shoots*.

5 Perspectivas futuras

O presente trabalho é apenas uma abordagem aos processos de regeneração e biotransformação de monoterpenos em raízes transgênicas de *A. graveolens*. Futuramente seria pertinente não só quantificar os produtos da biotransformação através do uso de padrões internos na componente volátil, de maneira a perceber em que sentido ocorre a diminuição ou aumento de proporções relativas, como utilizar como substrato alguns produtos obtidos, no sentido de estabelecer alguma relação biossintética entre estes. Uma vez estabelecidas estas relações poder-se-ia perspectivar a aplicação da biotransformação em sistemas piloto num *scale-up* da produção, para avaliar a reacção das r.t. de *A. graveolens* nestas condições. Como exemplo realça-se a importância de alguns produtos obtidos pela biotransformação de geraniol na indústria vinícola e alimentar. O geraniol e o linalol são considerados os mais importantes álcoois monoterpênicos no vinho, apresentando-se em maior concentração e tendo notas mais baixas. O geraniol, o nerol, o linalol, o α -terpineol e compostos relacionados são também de extrema importância noutras bebidas alcoólicas, em refrigerantes e são vastamente utilizados na perfumaria e indústria de aditivos alimentares (Pedersen *et al.* 2003).

Os estudos de regeneração deveriam passar pela aplicação de reguladores hormonais ao tecido caloso na tentativa de promover a formação de shoots e avaliar a sua componente volátil. Caso fosse possível estabelecer plantas regeneradas que mantivessem a proporção em componentes voláteis e fossem estáveis, esta seria uma boa abordagem na obtenção de falcarinol em grandes quantidades, cujas promissoras características estão ainda a ser analisadas.

6 Bibliografia

- Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *TRENDS in Plant Science* **10**(12): 594-602
- Akashi R, Hoffmann-Tsay S-S, Hoffmann F. (1998). Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theoretical and Applied Genetics*. **96**: 758–764.
- Balandrin MF, Klocke JA, Wurtele ES, Bollinger HW. (1985). Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. **228**: 1154-1160
- Bhat SV, Nagasampagi BA, Sivakumar M. (2005). *Chemistry of natural products*. Narosa Publishing House. Springer. India.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **95**: 4126–4133
- Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. **161**: 839–851
- Castro HF, Oliveira PC, Soares CMF. (1997). Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **17**(3)
- Chaudhuri KN, Ghosh B, Jha DTS. (2006). Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*. **25**: 1059–1066
- Cho H, Widholm JM. (2002). Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **69**: 259–269
- Cho H, Widholm JM, Tanaka N, Nakanishi Y, Murooka Y. (1998). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch). *Plant Science*. **138**: 53–65
- Choi PS, Kim YD, Choi KM, Chung HJ, Choi DW, Liu JR. (2000) Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant cell reports*. 19:563-568

- Christey MC. (1997). Transgenic crop plants using *Agrobacterium Rhizogenes*-Mediated transformation In: *Hairy roots: culture and applications*. Doran PM. (ed.). Harwood academic publishers. Amsterdam, The Netherlands. Pp. 99-111.
- Costa MM. (2005). Raízes transgênicas de *Levisticum officinale* como sistema modelo para o estudo da produção de voláteis. *Tese de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Coutinho AXP. (1939). *Flora de Portugal (plantas vasculares)*. Bertrand Ltd. 2ª edição. Lisboa. Pp: 539-540
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry & molecular biology of plants*. Grissem W, Jones R, (eds). American society of plant physiologists. Pp. 1250-1318
- Cui M, Takayanagi K, Kamada H, Nishimura S, Handa T. (2001). Efficient shoot regeneration from hairy roots of *Antirrhinum majus* L. transformed by the *rol* type MAT vector system. *Genetic Transformation and Hybridization*. **20**:55–59
- Cutter EG. (1978). Chapter 11: Secretory cells and tissues. In: *Plant anatomy, Part I: Cells and Tissues*. 2ª edição. Edward Arnold & Sons. Manchester, London. Pp. 214-241
- de Carvalho CCCR, da Fonseca MMR. (2006). Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*. **24**: 134– 142
- Dewick PM. (1997). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & sons Ltd. West Sussex, Inglaterra.
- di Guardo A, Cellarova E, Koperdakova J, Pistelli L, Ruffoni B, Allavena A, Giovannini A. (2003). Hairy root induction and plant regeneration in *Hypericum perforatum* L. *Breeding*. **57**(3): 269-278
- Ercan AG, Taskin KM. (1999). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. populations grown in Turkey. *Turkish Journal of Botany* **23**: 373-377
- Everitt ZM, Lockwood GB. (1995). *Anethum graveolens* L. (Dill). In vitro culture and metabolism of volatile constituents. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 33, Medicinal and Aromatic Plants III*. Bajaj YPS (ed.). Berlin: Springer-Verlag. pp. 21–34.
- Figueiredo AC, Almendra MJ, Barroso JG, Scheffer JC. (1996). Biotransformation of monoterpenes and sesquiterpenes by cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Biotechnology letters*. **18**(8): 863-868

- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JC. (2006). Potencial of hairy roots for *in vitro* essential oil production. In *Floriculture, ornamental and plant biotechnology volume II*. Teixeira da Silva JA (Ed.). Global Science Books.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. (2007). Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. In *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais*. Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (Eds). *Curso teórico-prático*, 3ª Edição. Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Portugal. Pp. 1-18
- Figueiredo AC. 1992. *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*: produção de metabolitos secundários *in vivo* e *in vitro*. *Tese de Doutoramento*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Franssen MCR, Walton NJ. (1999). Biotransformations. In *Chemicals from Plants, perspectives on plant secondary products*. Walton NJ, Brown DE. (eds). Imperial College Press e World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. London, England. Pp. 227-326.
- Gelvin SB. (1990). Crown Gall Disease and Hairy Root Disease. *Plant Physiology*. **92**: 281-285
- Gelvin SB. (2003). *Agrobacterium*-Mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**(1): 16-37
- Gershenzon J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology*. **20**(6): 1281-1328
- Giri A, Dhingra V, Giri CC, Singh A, Ward OP, Narasu MP. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*. **19**: 175–199
- Guillon S, Trémouillaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P. (2006). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *TRENDS in Biotechnology*. **24**(9): 403-409
- Hamill JD, Lidgett AJ. (1997). Hairy root cultures – Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. In *Hairy roots: culture and applications*. Doran PM. (ed.). Harwood academic publishers. Amsterdam, The Netherlands. Pp. 1-30.
- Hao L, Zhou L, Xu X, Cao J, Xi T. (2006). The role of salicylic acid and carrot embryogenic callus extracts in somatic embryogenesis of naked oat (*Avena nuda*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **85**: 109–113

-
- Harborne JB. (2000). Arsenal for Survival: Secondary Plant Products. *Taxon*. **49**(3): 435-449
- Hoshino Y, Mii M. (1998). *Bialaphos* stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*. **17**: 256–261
- Hu Z, Du M. (2006). Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. **48**(2): 121–127
- Hüsni K, Başer C, Demirci F. (2007). 4 Chemistry of Essential Oils. In *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berger RG. (ed.). Springer Berlin Heidelberg. Pp. 43-86
- Iijima Y, Gang DR, Fridman E, Lewinsohn E, Pichersky E. (2004). Characterization of Geraniol Synthase from the Peltate Glands of Sweet Basil. *Plant Physiology*. **134**: 370–379
- Jacob A, Malpathak N. (2005). Plantlet regeneration enhances solasodine productivity in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *In Vitro Cellular and Development Biology – Plant*. **41**(3): 291-295(5)
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. (2002). *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates Inc. 2ª edição. Massachusetts, EUA. Pp. 470-473
- Kang HJ, Anbazhagan VR, You XL, Moon HK, Yi JS, Choi YE. (2006). Production of transgenic *Aralia elata* regenerated from *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformed roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **85**: 187–196
- Kim S, Hopper E, Yjortso M. (1995). Hairy Root Growth Models: Effect of Different Branching Patterns. *Biotechnology Progress*. **11**: 178-186
- Kim SH, Kronstad JW, Ellis BE. (2001). Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry*. **58**: 849–857
- King A, Dickinson JR. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. **16**: 499-506.
- Komari T, Ishida Y, Hiei Y. (2004). Plant transformation technology: *Agrobacterium*-mediated transformation. In: *Handbook of plant biotechnology*. Christou P, Klee H. (eds.). Wiley & Sons Ltd. Pp. 233-261

- Lange BM, Wildung MR, Stauber EJ, Sanchez C, Pouchnik D, Croteau R. (2000). Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**(6): 2934–2939
- Li W, Koike K, Asada Y, Yoshikawa T, Nikaido T. (2002). Biotransformation of umbelliferone by *Panax ginseng* root cultures. *Tetrahedron Letters*. **43**: 5633–5635
- Li W, Koike K, Asada Y, Yoshikawa T, Nikaido T. (2003). Biotransformation of low-molecular-weight alcohols by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. *Carbohydrate Research*. **338**: 729–731
- Likens ST, Nickerson GB (1964). Detection of certain Hop oil constituents in brewing products. *American Society of Brewing Chemists Proceedings*. **5**:13-19
- Lobo AM, Lourenço AM. (2007). Metabolitos derivados do ácido xiquímico. In *Biossíntese de produtos naturais*. Lobo AM e Lourenço AM. (eds). IST Press. Lisboa, Portugal. Pp. 151-192.
- Lourenço PML. (1997). Raízes transgênicas de *Achillea millefolium*: estabelecimento, produção de voláteis e actividade anti-microbiana. *Tese de Mestrado em Biotecnologia Vegetal*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Martinkus C, Croteau R. (1981). Metabolism of Monoterpenes. *Plant Physiology*. **68**: 99-106
- Moghaieb REA, Saneoka H, Fujita K. (2004). Shoot regeneration from GUS-transformed tomato (*Lycopersicon esculentum*) hairy root. *Molecular Biology Letters*. **9**(3): 439-449
- Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**: 473-497
- Ning L, Guo H, Jiang X, Bi K, Guo D. (2003). Biotransformation of triptonide by cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorum*. *Pure and Applied Chemistry*. **75**(2-3): 389–392
- Nunes IS. (2007). Biotransformação e regeneração em culturas de raízes transgênicas de *Levisticum officinale*: efeito no crescimento e produção de voláteis. *Tese de mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Ohara A, Akasaka Y, Daimon H, Mii M. (2000) Plant regeneration from hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Crotalaria juncea* L. *Plant Cell Reports*. **19**: 563–568.

- Oksman-Caldentey K, Inzé D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *TRENDS in Plant Science*. **9**: 433-440
- Otani M, Mu M, Handa T, Kamada H, Shimada T. (1993). Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.)Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant science*. **94**:151-159.
- Pasqua G, Monacelli B, Valletta A, Santamaria AR, Fiorillo F. (2005). Synthesis and/or accumulation of bioactive molecules in the *in vivo* and *in vitro* root. *Plant Biosystems*. **139**(2): 180 - 188
- Pedersen DS, Capone DL, Skouroumounis GK, Pollnitz AP, Sefton MA. (2003). Quantitative analysis of geraniol, nerol, linalool, and α -terpineol in wine. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. **375**: 517–522
- Pereira HO. (2006). Cultura de raízes transgênicas de *Levisticum officinale*: influência dos estímulos de luz azul, luz vermelha e da adição de ácido cinâmico no crescimento e na produção de voláteis. *Relatório de estágio da licenciatura em Engenharia biotecnológica*. Escola Superior Agrária de Bragança.
- Pereira SID. (1999). Raízes transgênicas de *Pimpinella anisum*: otimização da produção de voláteis. *Relatório de estágio da licenciatura em Biologia Vegetal Aplicada*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Porter N. (2001). Essential oils and their production. *Crop & Food Research*. **39**
- Puddephat IJ, Robinson HT, Fenning TM, Barbara DJ, Morton A, Pink DAC. (2001). Recovery of phenotypically normal transgenic plants of *Brassica oleracea* upon *Agrobacterium rhizogenes*-mediated co-transformation and selection of transformed hairy roots by GUS assay. *Molecular Breeding*. **7**: 229–242
- Rao SR, Ravishankar GA. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. **20**: 101-153
- Rhodes MJC, Parr AJ, Walton NJ. (1997). Studies of secondary metabolic pathways in transformed roots. In *Hairy roots: culture and applications*. Doran PM. (ed.). Harwood academic publishers. Amsterdam, The Netherlands. Pp. 31-50
- Saitou T, Kamada H, Harada H. (1992). Light Requirement for Shoot Regeneration in Horseradish Hairy Roots. *Plant Physiology*. **99**: 1336-1341

-
- Santos PAG, Figueiredo AC, Lourenço PML, Barroso JG, Pedro LG, Oliveira MMO, Schripsema J, Deans SG, Scheffer JJC. (2002). Hairy root cultures of *Anethum graveolens* (dill): establishment, growth, time-course study of their essential oil and its comparison with parent plant oils. *Biotechnology letters*. **24**(12): 1031-1036
- Schenk RU, Hildebrandt AC. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*. **50**: 199-204.
- Schripsema J, Meijer AH, van Iren F, Hoopen HJG, Verpoorte R. (1990). Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **22**: 55-64
- Seigler DS. (1998). *Plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers. Massachussets, EUA.
- Shams-Ardakani M, Ghannadi A, Badr P, Mohagheghzadeh A. (2005). Biotransformation of terpenes and related compounds by suspension culture of *Glycyrrhiza glabra* L. (Papilionaceae). *Flavour and Fragrance Journal*. **20**: 141–144
- Shanks JV, Morgan J. (1999). Plant “hairy root” culture. *Current Opinion in Biotechnology*. **10**: 151-155
- Shrawat AK, Becker D, Lörz H. (2007). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*. **172**: 281–290
- Singer AC, Crowley DE, Thompson IP. (2003). Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *TRENDS in Biotechnology*. **21**(3): 123-130
- Stahl-Biskup E, Wichtmann EM. (1991). Composition of essential oils from roots of some Apiaceae in relation to the development of their oil duct systems. *Flavour and Fragrance Journal*. **6**: 249-255
- Subotić A, Budimir S, Grubišić D, Momčilović I. (2003). Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaureum erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biologia Plantarum*. **47**(4): 617-619.
- Suga T, Hirata T, Hamada H, Futatsugi M. (1983). Enantioselectivity in the biotransformation of bicyclic monoterpene alcohols with the cultured suspension cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Reports*. **2**:186-188
- Taiz L, Zeiger E. (2002). Chapter 13: secondary metabolites and plant defense. In *Plant physiology*. Sinauer associates. Sunderland, Massachusets. Pp. 283-308
-

-
- Uozumi N, Kobayashi T. (1997). Artificial seed production through hairy root regeneration. In *Hairy roots: culture and applications*. Doran PM. (ed.). Harwood academic publishers. Amsterdam, The Netherlands. Pp. 113-121.
- Uozumi N, Nakashimada Y, Kato Y, Kobayashi T. (1992). Production of artificial seed from horseradish hairy root. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **74**(1): 21-26.
- Uozumi N, Ohtake Y, Nakashimada Y, Morikawa Y, Tanaka N, Kobayashi T. (1996). Efficient Regeneration from GUS-Transformed *Ajuga* Hairy Root. *Journal of fermentation and bioengineering*. **81**(5): 374-378
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*. **1**: 13–25
- Verpoorte R, Memelink J. (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. **131**: 181–187
- Vinterhalter B, Ninković S, Cingel A, Vinterhalter D. (2006). Shoot and root culture of *Hypericum perforatum* L. transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS. *Biologia Plantarum*. **50**(4): 767-770
- Watase I, Sudo H, Yamazaki M, Saito M. (2004). Regeneration of transformed *Ophiorrhiza pumila* plants producing camptothecin. *Plant Biotechnology*. **21**(5): 337–342
- Winkel BSJ. (2006). The biosynthesis of flavonoids. In *The Science of Flavonoids*. Grotewold E. (Ed). Springer. Ohio USA. Pp. 71-96.
- Yazaki K. (2004). Natural products and metabolites. In: *Handbook of plant biotechnology*. Christou P, Klee H. (eds.). Wiley & Sons Ltd. Pp- 811-857
- Zdravković-Korać S, Muhovski Y, Druart P, Čalić D, Radojević V. (2004). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer to *Aesculus hippocastanum* L. and the regeneration of transformed plants. *Plant cell reports*. **22**:698–704
- Zenk MH. (1991). Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry*. **30**(12): 3861-3863
- Zheng G, Lu W, Aisa HA, Cai J. (1999). Absolute configuration of falcarinol, a potent antitumor agent commonly occurring in plants. *Tetrahedron Letters*. **40**: 2181-2182.
- Zhu W, Lockwood GB. (2000). Enhanced biotransformation of terpenes in plant cell suspensions using controlled release polymer. *Biotechnology Letters*. **22**: 659–662
-

Zi QX, Jing FJ. The reduction of chromosome number and the loss of regeneration ability during subculture of hairy root cultures of *Onobrychis viciaefolia* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A₄. *Plant Science*. **120**(1): 107-112(6)

[1]www.iupac.org – última modificação a 25 de setembro de 2007

[2]<http://research.cip.cgiar.org/confluence/display/potatogene/Agrobacterium+tumefaciens+mediated+gene+transfert> - última modificação feita por *Reinhard Simon* a 20 de julho de 2007