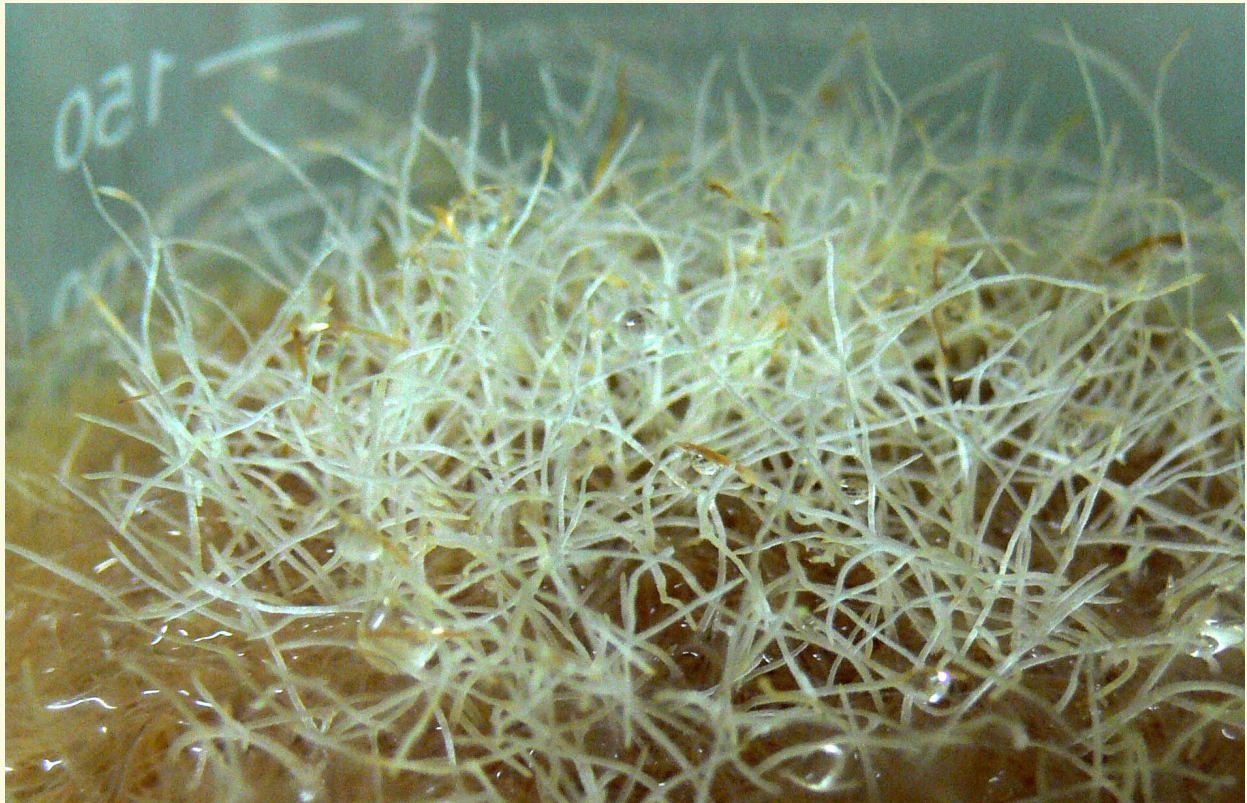


UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE LISBOA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Biotransformação e regeneração  
em culturas de raízes transgênicas de  
*Levisticum officinale*:  
efeito no crescimento e produção de voláteis**



**Inês Santos Nunes**

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE LISBOA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Biotransformação e regeneração  
em culturas de raízes transgênicas de  
*Levisticum officinale*:  
efeito no crescimento e produção de voláteis**

**Inês Santos Nunes**

Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia

Dissertação orientada por: Professora Doutora Ana Cristina Figueiredo

2007



"Uma viagem de mil quilómetros começa com um passo."  
Antigo provérbio taoísta

## *Agradecimentos*

Desejo em primeiro lugar agradecer à Professora Doutora Cristina Figueiredo pela orientação, ajuda e apoio dada no trabalho realizado e na revisão desta tese. Pelo seu interesse, amizade, grande disponibilidade e paciência, até nas viagens mais difíceis.

Aos professores Luís Pedro e Helena Trindade, pela amizade, preocupação e revisão desta tese.

À Monya Costa e ao Hélder Pereira pela ajuda prestada nas primeiras semanas no laboratório.

Ao meu amigo e companheiro de trabalho Jorge Faria, pelo seu bom humor, pelas peripécias no laboratório, pelo convívio, conversas divertidas e gargalhadas desde a lavagem de rolhas às horas passadas à frente do computador.

À amiga Marta Mendes, pelo seu companheirismo no trabalho, pela preocupação e apoio e pelos momentos de convívio muito divertidos.

À Sofia Borges, a companheira de laboratório mais recente, pelos momentos de convívio.

À Ana Fulgêncio, à Marta Bento, Marta Delgado e a todos os colegas e amigos que ajudaram a descontrair nos momentos de lazer.

Ao Ricardo, pela preocupação, carinho e incentivo. Por toda a sua paciência e disponibilidade.

Aos meus pais, pela amizade e carinho, por terem sempre acreditado em mim e incentivado a fazer aquilo que gosto.

À minha avó Rosa, pelo carinho e pela preocupação demonstrada em relação aos meus almoços.

À Joana, a minha irmã, pelo seu bom humor, pelas conversas prolongadas sobre a sua vida de artista que sempre me divertiram.

## Abreviaturas

°C - Graus Celsius

°C.min<sup>-1</sup> - Graus Celsius por minuto

Acetil-CoA - Acetil co-enzima A

AS - Ácido salicílico

BA - Benziladenina

BAP - Benzilaminopurina

CGL - Cromatografia gás-líquido

CGL/MS – Cromatografia gás-líquido acoplada espectrometria de massa

cm - Centímetro

cm.s<sup>-1</sup> - Centímetros por segundo

CoA - co-enzima A

DB1 - Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de metilsilicone

DB1 – Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de metilsilicone

DB-17HT - Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de fenilmetilsilicone

DB-17HT – Coluna capilar de cromatografia gás-líquido, com fase imobilizada de fenilmetilsilicone

DIC - Detector de ionização de chama

DMAPP - Dimetilalil pirofosfato

DXP - 1-Deoxi-D-xilulose fosfato

eV - Electrão-volt

FID – Detector de ionização de chama

FPP - Farnesil pirofosfato

g - Grama

g.l<sup>-1</sup> - Grama por litro

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

m –metro

MEP - Metileritritol fosfato

mg - Miligrama

mg.l<sup>-1</sup> - Miligrama por litro

min - Minuto

min – Minuto  
ml - Mililitro  
ml – Mililitros  
ml.min<sup>-1</sup> - Mililitro por minuto  
mm - Milímetro  
mM - Milimolar  
mm –milímetro  
MS/2 - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962) diluído para metade  
p.f.- Peso fresco  
p.s. – Peso seco  
PAL - Fenilalanina amónia liase  
r.p.m - Rotações por minuto  
Ri - *Root inducing*  
*rol* - *Root locus*  
s – Segundo  
SAR - solução aquosa remanescente  
SH - Meio de cultura de Schenk e Hildebrandt (1972)  
u - Unidades de massa atómica  
UV-C - Radiação ultravioleta C  
v - Vestigial  
v/v - Volume por volume  
µl - Microlitro  
µm - Micrómetro

## Resumo

*Levisticum officinale* W. D. J. Koch, vulgarmente conhecido por levístico, é uma planta herbácea, perene, pertencente à família Apiaceae e nativa do Sudoeste da Ásia. O levístico é conhecido pelas suas propriedades medicinais e aromáticas que se devem sobretudo ao seu óleo essencial. As culturas de raízes transgénicas permitem a obtenção de uma produção homogénea e continuada de compostos de origem vegetal e a transformação de substratos exógenos. No presente trabalho, utilizaram-se raízes transgénicas de *L. officinale* mantidas em meio SH, em escuridão permanente, a 24°C, sob agitação a 80r.p.m. Foram efectuados ensaios para testar a aptidão de regeneração espontânea, e induzida, de plantas a partir destas raízes transgénicas. Não se observou regeneração espontânea, nem em JIFFY “pellets”, nem em meio de cultura MS/2, e a Higromicina B (2mg.l<sup>-1</sup>, 5 mg.l<sup>-1</sup> e 7 mg.l<sup>-1</sup>), o ácido salicílico (41 mg.l<sup>-1</sup>, 83 mg.l<sup>-1</sup>, 138 mg.l<sup>-1</sup>) e a radiação UV (por períodos de 30min ao longo de 3 dias) também não tiveram um papel indutor de regeneração. Foi ainda avaliada a capacidade de biotransformação das raízes transgénicas de *L. officinale*, estudando o efeito da adição, em separado, de mentol e do geraniol, (25 mg.l<sup>-1</sup>), ao fim de 15 dias em cultura, na morfologia, no crescimento e na produção de voláteis. O crescimento foi avaliado por medição do peso fresco e seco e pelo método de desassimilação durante 7 semanas. Os voláteis foram isolados por destilação-extracção, num aparelho do tipo Likens-Nickerson, e analisados através de CG e CG-EM, ao longo do crescimento. Comparativamente com as culturas controlo, as culturas às quais se adicionou mentol e geraniol não demonstraram nem alterações morfológicas nem no seu crescimento, quando avaliado por determinação do peso fresco e seco e pelo método de desassimilação. A adição de mentol não induziu a produção de novos voláteis, sendo o óleo isolado destas raízes transgénicas dominado por z-falcarinol, n-octanal e z-ligustilido, tal como o das culturas controlo. A adição de geraniol induziu a produção de seis novos voláteis, o linalol, α-terpeniol, nerol, citronelol, neral e acetato de geraniol. As concentrações relativas de mentol, de geraniol e alguns dos seus produtos de biotransformação diminuíram ao longo do tempo de ensaio. A análise dos voláteis extraídos após a adição de β-glicosidase à água de destilação, mostrou que pelo menos parte do mentol, geraniol, nerol, neral e citronelol foram armazenados sobre a forma glicosilada nos vacúolos das células das raízes transgénicas de levístico.

**Palavras chave:** raízes transgénicas, regeneração, biotransformação, glicósidos, voláteis, mentol, geraniol.

## Abstract

*Levisticum officinale* W. D. J. Koch, commonly known as lovage, is an herbaceous and perennial Apiaceae plant native to south western of Asia. Lovage is known for its medicinal and aromatic properties mainly due to its essential oil. The hairy roots cultures allow the attainment of a homogeneous and continuous production of plant metabolites as well as the transformation of exogenous substrates. In the present work, *L. officinale* hairy roots maintained in SH medium, under darkness, at 24°C, at 80r.p.m. were used. The ability for spontaneous and induced regeneration of plants from lovage hairy roots was studied. There was no spontaneous regeneration, neither in JIFFY pellets, nor in MS/2 culture medium, and Higromycin B (2mg.l<sup>-1</sup>, 5 mg.l<sup>-1</sup> e 7 mg.l<sup>-1</sup>), salicylic acid (41 mg.l<sup>-1</sup>, 83 mg.l<sup>-1</sup>, 138 mg.l<sup>-1</sup>) and UV radiation (for periods of 30min during 3 days) also did not show a regeneration inducing role. In this work, the biotransformation capacity of *L. officinale* hairy roots cultures was also studied by evaluating the effect of the separate addition of menthol and geraniol, (25 mg.l<sup>-1</sup>), after 15 days in culture, in the morphology, growth and volatiles production. Growth was evaluated by measurement of the fresh and dry weight and by the dissimilation method during 7 weeks. The volatiles were isolated by distillation-extraction using a Likens-Nickerson-type apparatus, and analyzed by GC and GC-MS, during the hairy root growth. When compared with the control cultures, the menthol and geraniol added cultures showed no morphological differences, and also no changes in their growth were detected when evaluated by the fresh and dry weight and by the dissimilation method. The addition of menthol did not induce the production of new volatiles, the volatiles of these hairy roots being dominated by *z*-falcarinol, *n*-octanal and *z*-ligustilide, like the control cultures. The addition of geraniol induced the production of 6 new volatiles, linalool,  $\alpha$ -terpeniol, nerol, citronellol, neral and geranyl acetate. The relative amounts of menthol, geraniol and some of its biotransformation products decreased during the course of the experiment. The analysis of the extracted volatiles, after the addition of  $\beta$ -glycosidase to the remaining distillation water, showed that part of the menthol, geraniol, nerol, citronellol and neral, were stored, in the glycosidic form, in the vacuoles of lovage hairy roots.

**Keywords:** hairy roots, regeneration, biotransformation, glycosides, volatiles, menthol, geraniol.

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. <i>Levisticum officinale</i> .....	1
1.2. Metabolitos secundários .....	3
1.2.1. Alcalóides .....	4
1.2.2. Terpenos .....	4
1.2.3. Fenóis.....	7
1.2.4. Poliacetilenos.....	8
1.2.5. Ácidos gordos .....	9
1.3. Produção de metabolitos secundários.....	9
1.4. Óleo essencial .....	12
1.4.1. Isolamento e análise de compostos voláteis.....	12
1.5. Raízes transgénicas .....	14
1.5.1. Transformação genética.....	15
1.5.2. Crescimento das raízes transgénicas e produção de metabolitos secundários .....	16
1.5.3. Regeneração em raízes transgénicas .....	18
1.5.4. Biotransformação em raízes transgénicas.....	20
1.6. Objectivos.....	22
2. Material e Métodos .....	23
2.1. Material Vegetal.....	23
2.2. Regeneração .....	23
2.2.1. Regeneração espontânea de raízes transgénicas .....	23
2.2.1.1. Em JIFFY “pellets” .....	23
2.2.1.2. Em meio de cultura.....	23
2.2.2. Regeneração induzida .....	24
2.2.2.1. Higromicina B .....	24
2.2.2.2. Ácido salicílico .....	24
2.2.2.3. Radiação UV.....	24
2.3. Biotransformação.....	25
2.3.1. Análise Morfológica.....	25
2.3.2. Caracterização do crescimento das raízes transgénicas.....	25
2.3.2.1. Determinação do peso fresco.....	26
2.3.2.2. Determinação do peso seco.....	26
2.3.2.3. Método da desassimilação .....	26
2.3.3. Extração da componente volátil.....	27
2.3.4. Análise da componente volátil.....	27
2.3.4.1. Cromatografia Gás-Líquido.....	27
2.3.4.2. Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa.....	28
2.3.5. Determinação dos voláteis glicosilados .....	28
3. Resultados e Discussão .....	29
3.1. Regeneração .....	29
3.1.1. Regeneração espontânea de raízes transgénicas .....	29
3.1.2. Regeneração induzida .....	31
3.1.2.1. Higromicina B.....	31
3.1.2.2. Ácido salicílico.....	33
3.1.2.3. Radiação UV .....	34

3.2. Biotransformação.....	35
3.2.1. Análise Morfológica.....	35
3.2.2. Caracterização do crescimento das raízes transgênicas.....	36
3.2.2.1. Peso fresco e peso seco .....	36
3.2.2.1.1. Mentol .....	36
3.2.2.1.2. Geraniol .....	37
3.2.2.2. Curvas de desassimilação .....	39
3.2.2.2.1. Mentol .....	39
3.2.2.2.2. Geraniol .....	40
3.2.3. Análise da componente volátil.....	40
3.2.3.1. Composição constitutiva.....	40
3.2.3.2. Composição volátil das raízes transgênicas sujeitas ao ensaio de biotransformação .....	44
3.2.3.2.1. Mentol .....	44
3.2.3.2.2. Geraniol .....	49
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	57
5. Bibliografia.....	59
6. ANEXO.....	71

# 1. Introdução

## 1.1. *Levisticum officinale*

*Levisticum officinale* W. D. J. Koch (Apiaceae), vulgarmente designado levístico, é uma planta glabra, perene e herbácea, cultivada em vários países europeus (Bylaité *et al.* 1998) e nativa do Sudoeste da Ásia (Irão) e Sul da Europa (Tutin 1968 em Szebeni-Galambosi *et al.* 1992). O levístico é uma das 4250 espécies dos 460 géneros das Apiaceae (Umbelliferae). Esta família é característica pelos seus canais secretores contendo resinas e óleos essenciais ricos em monoterpenos, sesquiterpenos e poliacetilenos. As Apiaceae abrangem muitas plantas comestíveis, algumas consideradas especiarias, outras plantas venenosas, medicinais e ornamentais (Judd *et al.* 2002). Embora seja mais conhecida pelo nome levístico, esta planta possui uma variedade de nomes comuns, sendo conhecida como erva da pequena idade (“smallage”), levístico italiano, salsa do amor, planta Maggi e semente da bexiga (Mabey *et al.* 1988 em Hogg *et al.* 2001). O nome científico é uma distorção do seu nome passado, *Ligusticum apium*, derivado da “Liguria” em Itália, onde crescia em abundância, e de “apium” referente ao aipo, visto que partilham um aroma semelhante. *Legusticum scoticum*, é outro nome científico pelo qual é conhecido e que se refere ao levístico escocês, conhecido como levístico do mar. É nativo das áreas costeiras da Escócia e da Irlanda do Norte, e das costas oeste da Noruega, Suécia e Dinamarca (Hogg *et al.* 2001).

O levístico pode atingir uma altura de 2-2,5 m, as folhas são pinadas (divididas em 2 ou 3 segmentos), largas e de cor verde brilhante. As umbelas são compostas, com flores amarelas, e os frutos possuem 5-7 mm com uma forma longa e ovada (Heeger 1956 em Szebeni-Galambosi *et al.* 1992), Fig. 1.1. Em aparência e na composição do seu óleo essencial, esta planta, lembra outros membros das Apiaceae como a angélica Chinesa (*Angelica sinensis*), e é conhecido pelos chineses como *Danggui* europeu (Zschocke *et al.* 1998).

O levístico possui propriedades aromáticas, sendo utilizado na perfumaria, indústria do tabaco e alimentar (Cu *et al.* 1990), onde é utilizada na produção de condimentos como, por exemplo, os cubos Maggi (Blank & Schieberle 1993). Possui também propriedades medicinais, atribuindo-se-lhe actividades estomacais, emenagogas, expectorantes (Lawless 1995) e especialmente às suas raízes, acções diuréticas e carminativas (Segebrecht & Schilcher 1988). Foi por isso cultivado ao longo dos séculos pelas suas diversas propriedades e a sua utilização remonta à Roma antiga. Durante a idade Média, o levístico foi utilizado como um remédio universal. Os monges Beneditinos utilizavam a sua semente para problemas digestivos e de flatulência (Stuart 1989 em Hogg *et al.* 2001), duas propriedades ainda promovidas hoje.

As raízes de *Levisticum officinale* (levístico) são, usualmente, um dos ingredientes de uma mistura de ervas de chá, pertencendo às doze plantas mais utilizadas no tratamento de problemas de vesícula e renais (Hagenström e Elze 1986 em Segebrecht e Schilcher 1988). Visto que todas

as partes da planta são extremamente aromáticas, exibindo um forte aroma a aipo, o levístico é cultivado pelas suas raízes, folhas, sementes e óleos essenciais. Existem várias publicações relativamente ao estudo dos óleos essenciais de *L. officinale*, sendo que alguns atribuem um particular interesse às suas raízes (Gijbels *et al.* 1982, Toulemonde & Noleau 1988, Cu *et al.* 1990, Szebeni-Galambosi *et al.* 1992, Blank & Schieberle 1993, Bylaité *et al.* 2000, Santos *et al.* 2005). A raiz do levístico possui uma longa história na medicina e ainda é actualmente indicada nas ervanárias para indigestões com cólicas, flatulência, infecções dos brônquios e problemas menstruais (Polunin e Robbins 1993).

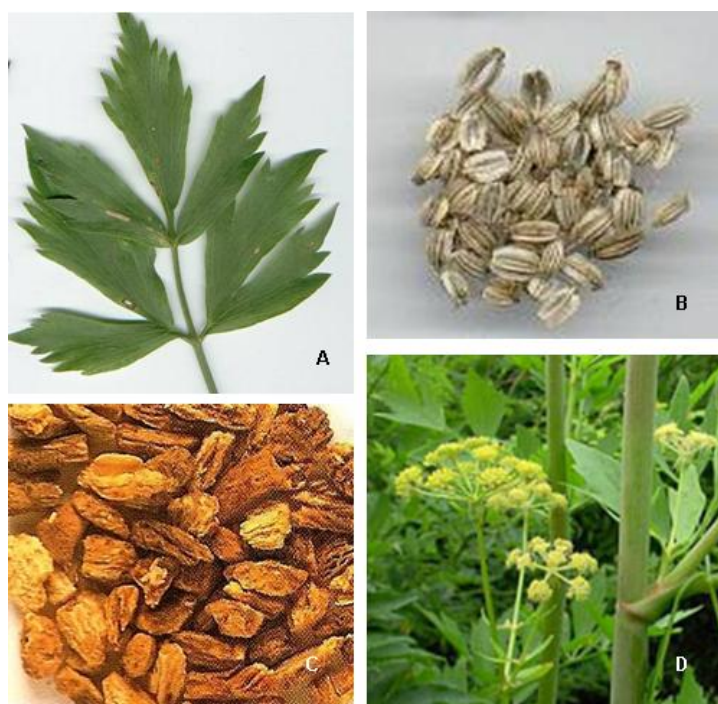


Figura 1.1. *Levisticum officinale* W.D.J. Koch: (A) folha [1]<sup>1</sup>, (B) frutos [1], (C) raízes (Polunin e Robbins 1993), (D) planta com umbelas de flores amarelas [1].

No estudo dos compostos voláteis constituintes de *L. officinale*, registou-se a presença de mais de 190 compostos nos óleos essenciais das raízes, sementes e folhas. Verificou-se que a composição química do óleo essencial destilado das diferentes partes botânicas da planta é diferente (Dauksas *et al.* 1999). Por exemplo, a proporção de  $\beta$ -felandreno nos óleos das raízes é pequena, cerca de 4%, comparado com o óleo da semente, onde é o componente maioritário (63%) (Szebeni-Galambosi *et al.* 1992). Uns dos constituintes mais representativos e importantes do óleo essencial de levístico são ftálicos, que constituem mais de 70% do total dos compostos voláteis constituintes do óleo essencial extraído das raízes, e cerca de 6% do extraído das sementes (Toulemonde e Noleau 1986 em Dauksas *et al.* 1999). A variação do conteúdo da planta em ftálicos depende do clima, do ambiente ecológico onde a planta cresce e da maturidade das raízes colhidas para a produção do óleo (Ruimian *et al.* 1982 em Cu *et al.* 1990). São também

<sup>1</sup> Página de Internet – vide Bibliografia

constituintes destes óleos essenciais, derivados de sesquiterpenos e monoterpenos. O óleo essencial pode variar de 0,8% a 1,1% nas sementes, 0,6% a 1,0% nas raízes e 0,05% a 0,15% nas folhas (Maghami *et al.* 1979 em Toulemonde e Noleau 1988).

A Alemanha, Hungria, Holanda, Polónia e Bélgica são os principais produtores de *L. officinale* (Szebeni-Galambosi *et al.* 1992).

## 1.2. Metabolitos secundários

O conceito de metabolito secundário pode ser atribuído a Albrecht Kossel, um fisiologista vegetal, que foi o primeiro a definir estes metabolitos em oposição aos metabolitos primários (Bourgaud *et al.* 2001, Hadacek 2002). Os compostos químicos das plantas podem ser classificados como sendo primários ou secundários, dependendo se têm, ou não, um papel essencial no metabolismo da planta e se estão universalmente presentes em todas as plantas. Enquanto que os constituintes primários incluem os açúcares vulgares, os aminoácidos, as purinas e as pirimidinas dos ácidos nucleicos, etc., os constituintes secundários compõem todos os outros constituintes químicos das plantas, desde os alcalóides aos terpenóides e das acetogeninas aos fenólicos e representam substâncias que não parecem ter um papel essencial no metabolismo, que variam na sua distribuição de planta para planta (Harborne 1999), estando diferencialmente distribuídas por grupos limitados do reino vegetal (Croteau *et al.* 2000).

O metabolismo secundário parece desempenhar um papel importante na sobrevivência da planta no seu ambiente, contribuindo largamente para a adaptação destas nos ecossistemas (Bourgaud *et al.* 2001). A atracção de animais polinizadores e dispersores de sementes, a acção bactericida, fungicida e antiviral de protecção contra a herbivoria e patógenos (ex: fitoalexinas), a toxicidade e poder anti-germinativo contra outras plantas (alelopatia), são algumas funções desempenhadas por metabolitos secundários (Wink 1988, Verpoorte *et al.* 2002). Para além disto, estes compostos determinam aspectos de qualidade dos alimentos, como o gosto, o sabor e cheiro, e a cor de muitas plantas e flores ornamentais tendo neste último aspecto importância na biodiversidade (Verpoorte e Memelink 2002).

Originalmente, pensava-se que os metabolitos secundários ocorriam apenas nas plantas superiores, mas estudos revelaram que são também sintetizados por bactérias, plantas inferiores e fungos. Actualmente é sabido que ocorrem em todos os grupos de organismos vivos (Hadacek 2002).

Devido às suas extensas actividades biológicas, os metabolitos secundários foram usados durante séculos na medicina tradicional. Nos nossos dias, fazem parte da composição de fármacos, cosméticos, químicos finos e mais recentemente nutracêuticos (Bourgaud *et al.* 2001) e de outros produtos industriais, como tinturas, aromas, fragrâncias, fibras, fixadores, venenos, agentes de curtimento, etc. (Yazaki 2004).

### 1.2.1. Alcalóides

Os alcalóides constituem o grupo de metabolitos secundários que contem o maior número de compostos com actividade biológica. Até à data mais de 12000 alcalóides foram isolados e as suas estruturas identificadas (Croteau *et al.* 2000, Yazaki 2004). Os alcalóides encontram-se em 15% das plantas vasculares pertencentes a mais de 150 famílias. Estão distribuídos particularmente nas famílias de dicotiledóneas: Apocynaceae, Berberidaceae, Rubiaceae, Asteraceae, Papaveraceae, Papilionaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Fabaceae, Menispermaceae, Lauraceae e Solanaceae. No entanto, estes compostos também ocorrem nas plantas inferiores, animais e microorganismos (Bhat *et al.* 2005).

São considerados metabolitos azotados (Edwards e Gatehouse 1999) devido ao facto da sua estrutura aromática se encontrar ligada a um átomo de azoto. Este átomo é maioritariamente derivado do resíduo de um aminoácido, ou seja, a maior parte dos alcalóides das plantas são biossintetizados a partir de um aminoácido. De acordo com os aminoácidos dos quais derivam os alcalóides são classificados em vários grupos: isoquinolínicos, pirrolizidinos, quiolizidinos, tropanos, purinos e outros subtipos menores (Yazaki 2004).

Os alcalóides são muitas vezes substâncias venenosas com funções de protecção das plantas contra insectos e herbivoria, produtos finais de reacções de desintoxicação de compostos que de outro modo poderiam ser perigosos para a planta, substâncias de reserva capazes de fornecer azoto ou outros elementos necessários ao desenvolvimento da planta, reguladores de crescimento semelhantes a hormonas ou subprodutos do metabolismo da planta (Bhat *et al.* 2005).

### 1.2.2. Terpenos

O nome desta classe de compostos deriva do nome da resina terebintina, de onde foram isolados pela primeira vez (Croteau *et al.* 2000). Os terpenos, também denominados terpenóides, constituem um largo grupo de metabolitos naturais, sendo conhecidos actualmente mais de 36000 terpenóides individuais (Hill 2002 em Lückner 2002).

A grande diversidade de terpenos deve-se à grande variabilidade das suas estruturas e de grupos funcionais. Todos derivam de uma única molécula constituída por cinco carbonos (C5), o isopentenil difosfato (IPP) (Lückner 2002), a partir da qual se originam vários compostos através da fusão de “cauda-cabeça” de duas ou mais unidades em C5. Moléculas formadas a partir de uma unidade em C5 são denominadas hemiterpenos (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) e moléculas formadas por duas unidades em C5 são denominadas por monoterpenos (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>). Os sesquiterpenos compostos por três unidades em C5 têm a formula C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>. Os compostos em C<sub>20</sub>H<sub>32</sub> são formados por quatro unidades em C5 e são denominados diterpenos. O isopreno é considerado o único hemiterpeno, mas os derivados deste, contendo oxigénio, como o prenol ou o ácido isovalérico são hemiterpenóides (Başer e Demirci 2007).

A biossíntese de todos os terpenos pode ser dividida em 4 passos: 1) síntese do precursor fundamental, IPP, 2) adições repetitivas do IPP para formar uma série de homólogos prenil difosfato, que servem como precursores imediatos de diferentes classes de terpenóides, 3) ação de sintases específicas na produção dos esqueletos terpénicos, 4) modificações enzimáticas secundárias dos esqueletos para originar funcionalidade e uma grande diversidade de compostos (Croteau *et al.* 2000). Demonstrou-se que as plantas superiores possuem duas vias biossintéticas distintas para a biossíntese de IPP, a via do acetato/mevalonato, e a via independente do mevalonato (Rohmer 1999).

A via clássica do ácido mevalónico envolve dois passos de condensação de três moléculas de acetil-CoA pelas enzimas acetil-CoA aciltransferases e hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintase para produzir HMG-CoA. O composto em C6 é reduzido pela HMG-CoA reductase para ácido (3R)-mevalónico (mevalonato). O mevalonato é depois convertido a IPP, através de duas fosforilações e uma descarboxilação. A IPP isomerase catalisa a conversão de parte do IPP para dimetilalildifosfato (DMAPP) (Figura 1.2) (Lücker 2002). A via independente do mevalonato, foi encontrada em bactérias, algas verdes e nos plastos das plantas superiores. Esta via, descoberta recentemente, tem como precursor do IPP, o composto em C5, 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP), formado a partir do gliceraldeído 3-fosfato (GAP) e do piruvato (Rohmer 1999). Esta via foi denominada por via MEP, devido ao 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), formado pela DOXP-reductoisomerase (DXR) a partir do DOXP. Em seguida, o MEP é convertido, através de vários passos, no seu último intermediário, que é convertido em IPP e DMAPP (Hecht *et al.* 2001, Rohdich *et al.* 2002), Fig. 1.2.

A via do mevalonato é responsável pela biossíntese de esteróides no citosol. Os isoprenóides, como os carotenóides, plastoquinona e o fitol são biossintetizados pela via independente nos plastos (Yazaki 2004) Fig. 1.3. Os sesquiterpenos (C15), triterpenos (C30) e politerpenos são produzidos no citoplasma e no retículo endoplasmático. Enquanto que o isopreno, os monoterpenos (C10), diterpenos (C20) e tetraterpenos (C40) nos plastos (Croteau *et al.* 2000). O IPP e o DMAPP dão origem ao geranyl pirofosfato (GPP), que é o precursor imediato dos monoterpenos. A formação de neril pirofosfato (NPP) a partir de GPP origina um grande número de esqueletos acíclicos, cíclicos, bicíclicos e tricíclicos. Reacções como oxidação, redução e hidratação através de várias terpeno ciclases resulta na formação de numerosos derivados de terpenos. A condensação de GPP e IPP leva à formação de farnesil pirofosfato (FPP), o precursor dos sesquiterpenos (Başer e Demirci 2007).

## Introdução

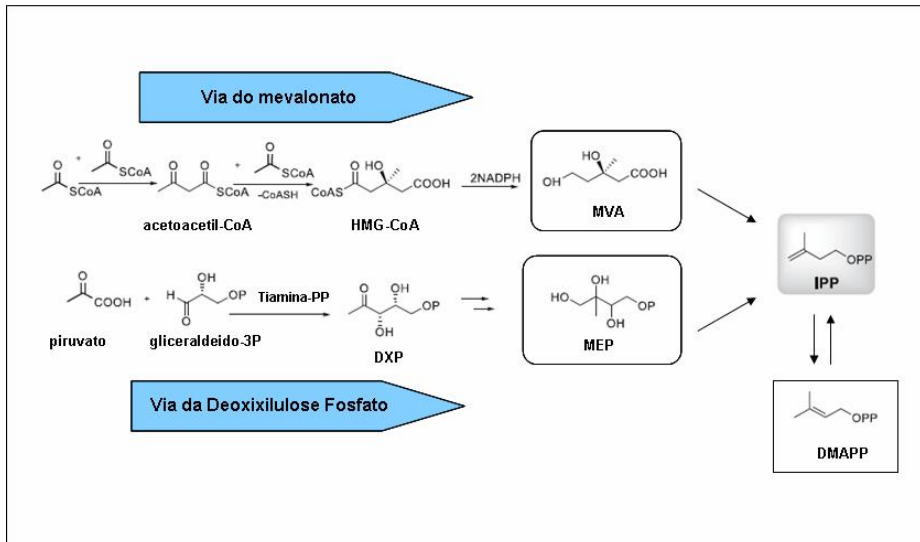


Figura 1.2. Biossíntese do precursor IPP: duas vias independentes (adaptado de Başer e Demirci 2007).

A produção de grandes quantidades de terpenóides, assim como o seu armazenamento, emissão e secreção, está relacionado com a existência de estruturas anatómicas altamente especializadas. Os tricomas glandulares, as cavidades secretoras das folhas e as epidermes glandulares das pétalas das flores originam e armazenam óleos essenciais terpênicos que são importantes para a polinização através de insectos (Croteau *et al.* 2000). O desenvolvimento destas estruturas especializadas pode estar relacionado com a fitotoxicidade de alguns terpenos, que em elevadas concentrações podem ter uma acção lesiva para as estruturas biológicas (Weidenhamer *et al.* 1993 em Lückner 2002).

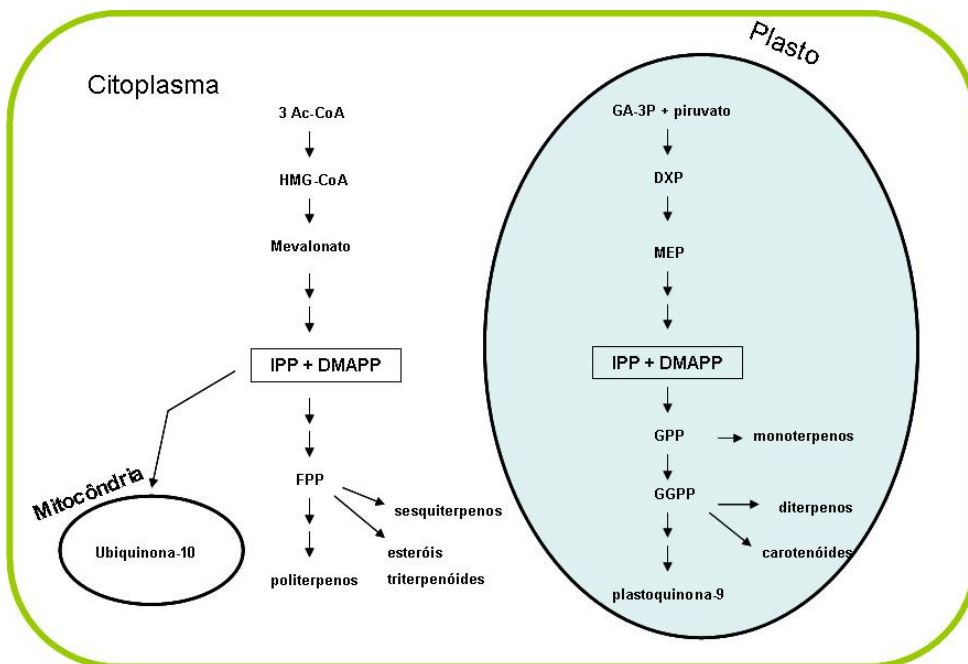


Figura 1.3. Localização celular da via do mevalonato e via independente nas plantas (adaptado de Yazaki 2004)

Os terpenos estão envolvidos em importantes processos como a fotossíntese, na constituição dos sistemas clorofilinos, no transporte de electrões, na arquitectura da membrana celular e regulação do desenvolvimento celular (Gershenzon e Croteau 1993 em Lücker 2002). Podem ter funções mais especializadas na defesa (algumas fitoalexinas, alimentação de insectos, fitotoxinas competitivas) e reprodução (na atracção de polinizadores e de animais dispersores de sementes). Estas funções estão normalmente associadas a compostos em C10, C15 e C20 da família dos terpenos (Harborne 1991 em Lücker 2002). Para além da sua importância ecológica, estes compostos, são de grande importância comercial, visto que cada vez mais se compreende o seu papel na prevenção e terapia de várias doenças, incluindo o cancro, e a sua actividade como insecticidas naturais e agentes microbianos, propriedades que podem ser aplicadas na produção agrícola e como bases para a síntese de muitos compostos de interesse (Carvalho e Fonseca 2006).

### 1.2.3. Fenóis

Os compostos fenólicos são estruturas aromáticas com um ou mais grupos hidroxilo, que podem ser substituídos por grupos metil ou glicosil (Harborne 1999). São um grupo ubíquo de metabolitos secundários de plantas que compreende os ácidos hidroxibenzóicos, os fenilpropanóides e compostos derivados destes precursores. A maior parte dos fenóis derivam da via do ácido xiquímico, Fig. 1.4, através dos fenilpropanóides com um pequeno número de fenóis derivados do ácido 3-dehidroxiquímico (Edwards e Gatehouse 1999). Na via do ácido xiquímico, o primeiro passo na formação de compostos benzénicos e fenilpropanóides é catalisado pela L-fenilalanina amónio liase (PAL), que actua na desaminação da fenilalanina para dar origem ao ácido *trans*-cinâmico. A partir deste podem formar-se compostos benzénicos voláteis e flavonóides. Na formação de substâncias voláteis benzénicas, o ácido *trans*-cinâmico sofre uma descarboxilação (perda de dois carbonos) formando-se compostos como o ácido benzóico e salicílico (2-hidroxil benzóico). Estes são precursores, através da acção de metiltransferases, de aromas florais como o metil benzoato e o metil salicilato (Yazaki 2004). Os flavonóides são um grupo diversificado de compostos fenólicos derivados das chalconas formadas dos precursores xiquimato e acetato. As chalconas originam-se a partir da condensação do ácido *p*-hidroxicinâmico com a malonil coenzima A. A isomerização das chalconas dá origem a flavanonas (Edwards e Gatehouse 1999). Existe uma via regularmente faseada da chalcona para a flavanona, flavona e flavonol. Os flavolanos ou taninos condensados são os produtos finais desta via (Harborne 1999).

Os fenilpropanóides são frequentemente encontrados em óleos essenciais de plantas e são importantes como aromas e ingredientes de perfumes. São especialmente comuns em plantas pertencentes à família Apiaceae e à ordem Magnoliales. O termo fenilpropanóide é usado num modo mais restrito para indicar um número relativo de compostos voláteis em que a função carbonil foi removida, reduzida ou modificada (Seigler 1998). Os fenilpropanóides são constituídos por um ou mais fragmentos C6-C3, sendo a unidade em C6 o anel benzénico (Başer e Demirci

2007). Ao sofrerem ciclizações dão origem às cumarinas (Edwards e Gatehouse 1999).

Muitos destes metabolitos secundários estão envolvidos na interacção planta-patógeno, na protecção contra o stress abiótico e a formação de componentes estruturais. No contexto da defesa da planta, os fenilpropanóides têm sido estudados extensivamente por muitos investigadores (Chapple *et al.* 1992, Batz *et al.* 1998, Weissnar e Jenkins 1998, Hu *et al.* 1998). Um dos compostos fenólicos mais abundantes no reino vegetal, derivado da via geral de fenilpropanóides, é a lenhina. É um componente básico biossintetizado e acumulado nas paredes celulares das células dos vasos condutores xilémicos e presente, igualmente, nas paredes celulares das células do esclerênquima (tecido de suporte interno). É responsável pelo aspecto lenhoso de algumas plantas (Yazaki 2004).

Devido à sua toxicidade, os compostos fenólicos são raramente encontrados como agliconas na sua forma livre, estando maioritariamente armazenados como conjugados glicosídicos (formas solúveis em água) localizados no vacúolo ou conjugados com os componentes das paredes celulares (Edwards e Gatehouse 1999). Muitas classes de fenóis ocorrem como glicósidos e muitas formas diferentes foram descritas (Harborne 1999).

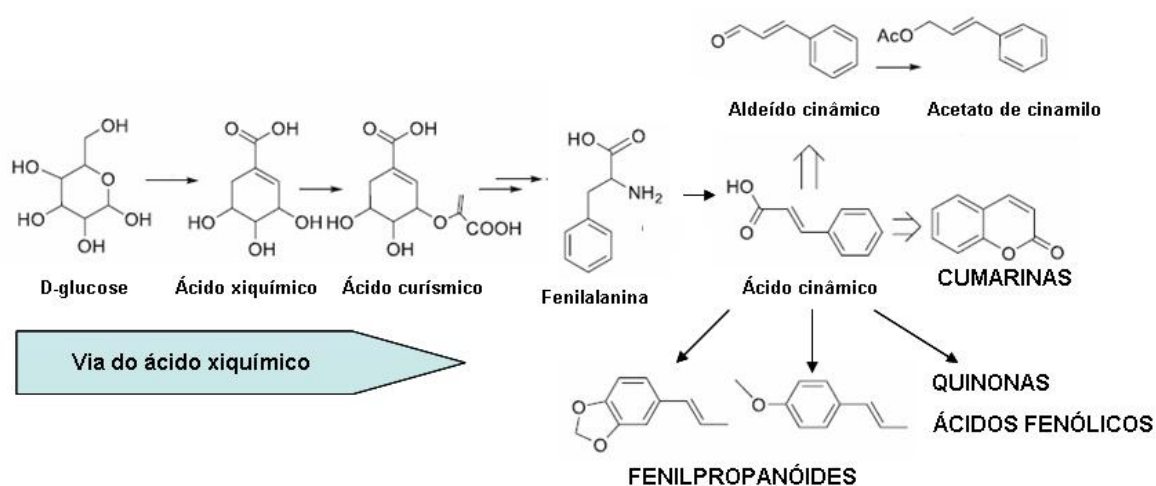


Figura 1.4. Via do ácido xiquímico na formação de compostos fenólicos (adaptado de Başer e Demirci 2007).

#### 1.2.4. Poliacetilenos

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). Os poliacetilenos são importantes na quimiosistemática como compostos marcantes de algumas famílias de plantas superiores como as Apiaceae e as Asteraceae. A sua presença em alimentos é de interesse considerável, visto que os poliacetilenos possuem um grande número de efeitos benéficos para o consumo humano. Os poliacetilenos são antifúngicos potentes, compostos antibacterianos e nematicidas, que podem ser utilizados na agricultura biológica. As experiências *in vitro* indicam que alguns poliacetilenos podem ser anti-alérgicos e

ter actividades anti-inflamatórias. Em adição, os poliacetilenos demonstraram ser citotóxicos contra linhas de células cancerígenas e potenciar a citotoxicidade de outras drogas anti-cancerígenas (Zidorn *et al.* 2005). Deste grupo de compostos, destaca-se o falcarinol que é um poliacetileno de baixa toxicidade para o homem, com uma poderosa capacidade anti-fúngica e potencial anti-cancerígena (Seigler 1998).

#### 1.2.5. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são componentes insolúveis em água que podem ser extraídos com solventes não polares. A sua actividade biológica é diversa. Muitos são metabolitos primários e estão envolvidos na respiração ou armazenamento de energia e nas membranas celulares, sendo ubíquos nas plantas, como os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e também os ácidos mirístico e láurico (Seigler 1998). Outras moléculas em pequenas quantidades desempenham um papel crucial como coenzimas, transportadores de electrões, pigmentos de absorção de luz, hormonas, etc. (Bhat *et al.* 2005).

Os derivados de ácidos gordos insaturados fazem parte de importantes aromas de frutos durante o seu amadurecimento. A formação do sabor é iniciada quando os ácidos gordos livres são libertados dos lípidos por lipases e ligações duplas específicas são peroxidadas por lipoxigenases para produzir hidroperóxidos. A clivagem  $\beta$ -oxidativa e as descarboxilações dos ácidos gordos formam compostos como as lactonas e ésteres voláteis (Marasco e Dannert 2007).

### 1.3. Produção de metabolitos secundários

Durante séculos, o Homem foi totalmente dependente das plantas, como fonte da sua alimentação, vestuário e de compostos químicos utilizados na medicina, na farmácia e em diversas indústrias (Rao e Ravishankar 2002). Actualmente, 75% da população mundial utiliza as plantas na medicina tradicional. As plantas continuam a fornecer novos produtos e modelos químicos para a formação de novos fármacos, visto que a constituição química de um grande número de espécies ainda não se encontra caracterizada. Quase um quarto de todos os fármacos prescritos contêm compostos que são directa ou indirectamente (semi-síntese) derivados de plantas (Marasco e Dannert 2007). A análise química e a caracterização das estruturas moleculares têm contribuído para a identificação destas plantas e da sua bioactividade através de ensaios controlados (Rao e Ravishankar 2002). Por outro lado, devido às complexas estruturas de alguns compostos a síntese orgânica não é rentável, e a extracção a partir das plantas adultas é o método mais utilizado economicamente para obter importantes metabolitos secundários (Balandrin *et al.* 1985, Dicosmo e Misawa 1995 em Srivastava e Srivastava 2007).

Uma maior preocupação por parte do consumidor pelo impacto dos compostos sintéticos na sua saúde e no ambiente leva a uma maior procura de produtos naturais e a um aumento do seu

mercado (Vanderhaegen *et al.* 2003). A procura de substâncias naturais, biologicamente activas, tem encorajado a utilização de óleos essenciais como agentes antimicrobianos e antioxidantes em alimentos. Para tal contribuiu o facto de os óleos essenciais aliarem o seu papel aromatizante a serem produtos naturais e biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade para os mamíferos e poderem desempenhar, simultaneamente as funções de mais do que um dos seus equivalentes sintéticos (Figueiredo *et al.* 2007).

Para além dos cultivares destinados à alimentação das populações, a agricultura mundial inclui também o cultivo de plantas produtoras de metabolitos secundários com grande valor pelas suas características aromáticas e atributos terapêuticos, utilizados na indústria química e da perfumaria (Sangwan *et al.* 2001). No entanto, a produção por parte das plantas não é sempre satisfatória. Pode estar restrita à espécie ou ao género, pode ser estimulada durante uma fase particular do crescimento ou desenvolvimento da planta, apresentar sazonalidade e depender da área geográfica, variar sob condições de stress ou disponibilidade de nutrientes. Para além destes factores, algumas plantas são difíceis de cultivar e crescem lentamente, sendo necessário colhê-las no seu habitat correndo-se o risco de extinção (Verpoorte *et al.* 2002). O progresso recente relativamente a técnicas de cultura de tecidos vegetais e células possibilitou a produção de compostos naturais de interesse *in vitro*, controlando os vários factores que influenciam a produção, mas também a protecção de espécies (Zhong 2001, Yazaki 2004). As células de plantas em cultura são biossinteticamente totipotentes, o que significa que cada célula possui a informação genética completa, tendo a capacidade de produzir os compostos químicos constituintes da planta mãe e oferecendo um sistema de produção definido, uniforme e de qualidade. Para além disso, é possível produzir novos compostos que não são normalmente encontrados na planta mãe e a biotransformação de novos produtos a partir de substratos baratos (Rao e Ravishankar 2002). Para algumas espécies, foi possível passar de uma escala laboratorial para processos industriais, na produção de compostos puros como a cinchonina, o taxol/placlitaxel e berberina (Verpoorte *et al.* 2002). A produção em grande escala através de bioreactores foi extensivamente estudada. Para além do interesse industrial, as culturas de células de plantas são um sistema modelo para o estudo da biossíntese dos metabolitos secundários (Verpoorte *et al.* 2000). No entanto, apesar dos estudos extensos na optimização dos meios de crescimento e produção e selecção de linhas celulares, a produção de alguns compostos com valor terapêutico é muito baixa ou quase nula. Isto deve-se ao facto das culturas indiferenciadas se tornarem geneticamente instáveis perdendo a sua capacidade biossintética (Srivastava e Srivastava 2007). Além disso, os metabolitos secundários são por definição um produto da diferenciação. Outras abordagens como o crescimento de células diferenciadas (culturas de raízes e caules) e a indução de vias com vários eliciadores (Verpoorte *et al.* 2002) podem ser uma solução para o aumento da produção de certos compostos *in vitro*. Em muitos casos a produção de metabolitos secundários pode ser potenciada pelo tratamento das células indiferenciadas com eliciadores como o metiljasmonato, ácido salicílico, quitosana e metais pesados (Poulev *et al.* 2003).

Por outro lado, o aumento do conhecimento das enzimas biossintéticas e dos genes correspondentes e a compreensão da regulação das vias metabólicas das plantas, pode levar à sobreprodução dos compostos de interesse através de engenharia genética de plantas e de células microbianas (Marasco e Dannert 2007). As sequenciação genómica de alguns organismos modelo como a *Arabidopsis thaliana*, *Medicago trunculata* e *Clarkia bre cucuri* revelou famílias de enzimas, como as citocromo P450, glicosiltransferases e metiltransferases, conhecidas como estando envolvidas na biossíntese de produtos naturais (Kicbenstein *et al.* 2001, Pichersky *et al.* 2006, D'auria e Gershenson 2005 em Marasco e Dannert 2007). Só algumas plantas foram estudadas em detalhe relativamente às vias de metabolitos secundários. São exemplos, o tabaco (antocianinas/flavonóides, terpenóides, alcalóides), *Catharanthus roseus* (alcalóides, esteróides, brassinólidos, flavonóides) e *Chinchona* (antraquinonas e alcalóides) (Verpoorte *et al.* 2000). Uma estratégia com impacto futuro na produção de aromas naturais está relacionada com a síntese total de terpenóides pela engenharia genética construindo a via do mevalonato a partir de oito genes de *Saccharomyces cerevisiae* em *Escherichia coli* (Martin *et al.* 2003). A meta é a construção de uma fábrica celular provida dos precursores universais dos terpenos, isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato, pela *síntese de novo*. Isto pode levar à biossíntese de uma variedade de terpenos visto que genes codificantes das sintetases terpénicas podem ser expressos no mesmo hospedeiro (Martin *et al.* 2003, Schrader *et al.* 2004). A expressão funcional de enzimas geradoras de aromas em bactérias ou leveduras constituem um ponto inicial para um bioprocesso optimizado, mas só o estabelecimento de níveis elevados de expressão podem transferir esta biocatálise para a célula (Schrader *et al.* 2004). O desenho de microorganismos recombinantes para aumentar a produção de moléculas de compostos naturais aromáticos tem sido intensamente investigado tanto na área académica como na industrial, com vista a possibilitar os mesmo benefícios económicos que outras aplicações industriais baseadas em processos da biotecnologia moderna. Alguns microorganismos candidatos já foram sequenciados: *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium linens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* e *Aspergillus niger* (Schrader 2007)

Na natureza, os fungos podem produzir uma grande variedade de metabolitos. Os fungos patogénicos são uma grande fonte de metabolitos e a maior parte ainda é desconhecida, diferindo na estrutura química, actividade biológica, mecanismos de acção e especificidade. Podem ser utilizados como pesticidas naturais, no entanto, a sua toxicidade em relação ao Homem é muitas vezes desconhecida (Vurro 2007). As leveduras e os seus produtos contribuem para o aroma e sabor, sendo biocatalisadores de processos de fermentação ou biotransformação dos componentes alimentares, produzindo uma grande variedade de produtos com características desejáveis (Abbas 2006).

A biotecnologia oferece a oportunidade de explorar a célula, o tecido, o órgão ou o organismo crescendo-o *in vitro* e manipulando-o geneticamente para a produção de compostos

desejados (Rao e Ravishankar 2002). No entanto, a evolução de estratégias de biocatálise não depende somente da área científica e da viabilidade tecnológica mas também da percepção pública do uso da engenharia genética para o melhoramento da qualidade dos alimentos e de processos de produção mais amigos do ambiente (Schrader *et al.* 2004).

## 1.4. Óleo essencial

De entre os compostos anteriormente referenciados como metabolitos secundários, os terpenos, alguns compostos fenólicos como os fenilpropanóides, os poliacetilenos e até alguns ácidos gordos, podem ocorrer nos óleos essenciais produzidos, e armazenados, em estruturas secretoras especializadas, existentes em muitas espécies de plantas.

Um óleo essencial, também definido como essência, óleo volátil ou óleo etéreo, é uma mistura complexa de constituintes voláteis. O Conselho da Europa descreve um óleo essencial como sendo um produto obtido a partir de material vegetal (Anónimo 2000). É definido como óleo devido à sua natureza líquida à temperatura ambiente. A sua ocorrência e função na natureza continuam a ser questões sujeitas a pesquisa. No entanto, há uma evidência de que as plantas produzem óleos essenciais para a sua defesa e sinalização como parte do seu metabolismo secundário. Os óleos essenciais ocorrem maioritariamente nas plantas aromáticas. As Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Hypericaceae, Lamiaceae e Zygophyllaceae são famílias ricas em óleos essenciais (Başer e Demirci 2007).

A escala de distribuição dos óleos essenciais de plantas pelos seus grupos taxonómicos é paralela à variedade de estruturas celulares especializadas, internas ou externas, existentes em cada família. Estas estruturas produzem e secretam combinações qualitativas e quantitativas variáveis dos constituintes voláteis que compõem os óleos destas plantas (Sangwan *et al.* 2001).

Em geral, os terpenos (mono- e sesquiterpenos) são os constituintes predominantes dos óleos essenciais. No entanto, a maioria dos óleos são extremamente complexos na sua composição, possuindo uma grande variedade de entidades químicas com elevada funcionalidade, pertencentes a diferentes classes de compostos (álcoois e aldeídos terpénicos, cetonas, fenilpropanóides e derivados, alcanos e álcoois alifáticos). Os óleos essenciais são aplicados na área da saúde, na indústria alimentar e da cosmética, reconstituindo aromas e fragrâncias naturais, que são resultado de uma combinação de centenas de compostos, muitos dos quais em concentrações vestigiais (Barroso e Pedro 1991).

### 1.4.1. Isolamento e análise de compostos voláteis

Os compostos voláteis são extraídos maioritariamente por processos de destilação. De entre os processos de isolamento de voláteis salientam-se a hidrodestilação, a destilação-extracção, extracção por solvente, extracção pelo vácuo, destilação por arrastamento de vapor e

extracção com dióxido de carbono supercrítico, Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Processos de extracção de compostos voláteis.

Processo de extracção	Tipo de extractor	Descrição
Hidrodestilação (Barroso e Pedro 1991)	Extractor de Clevenger	Os componentes do óleo essencial são extraídos e volatilizados pela água em ebulição, sendo posteriormente recolhidos por condensação. Rápida quantificação do volume de óleo destilado.
Destilação-Extracção Lickens-Nickerson (Lickens e Nickerson 1964)	Extractor de Lickens-Nickerson	A extracção é realizada a nível do condensador, na fase de vapor, através de um solvente orgânico volátil imiscível com a água (ex.: pentano)
Extracção por solvente (Barroso e Pedro 1991)	Extractor de Soxhlet	Extracção com solventes de baixo ponto de ebulição. Não sujeita o óleo a temperaturas elevadas.
Extracção por vácuo (Barroso e Pedro 1991)	Extractor de vácuo	Extracção por aquecimento do material vegetal a seco, sob pressão reduzida. No final do processo o óleo é extraído da água por extracção líquido-líquido com pentano.
Destilação por arrastamento de vapor (Pombeiro 1983)	Destilação por arrastamento de vapor saturado Sistema de arrastamento de vapor sobreaquecido	Destilação por passagem de vapor água através de uma mistura de água com uma substância orgânica total ou parcialmente imiscível. Evita a decomposição térmica e oxidação. Permite separar componentes mais voláteis de outros menos voláteis.
Extracção com dióxido de carbono supercrítico (Dauksas <i>et al.</i> 1999)	Equipamento para extracção por dióxido de carbono supercrítico	Extracção a baixas temperaturas. Inexistência de artefactos, o CO <sub>2</sub> é um gás com excepcionais propriedades como solvente: não é explosivo, é quimicamente inerte e sem odor nem sabor. Extracção de compostos voláteis com elevada qualidade. Necessidade para equipamento específico para cada produto a extrair, sendo por isso um processo dispendioso.

Os problemas que se podem encontrar na extracção estão relacionados com a localização do óleo essencial em estruturas especializadas, que podem ser internas, como é o caso dos canais e das bolsas, e em que a velocidade de difusão é relevante no processo de extracção ou quando o óleo é produzido por tricomas, que são estruturas secretoras externas. A técnica de cromatografia gasosa, associada à espectrometria de massa tem-se revelado de grande utilidade na análise dos componentes dos óleos, com particular incidência para os de menor concentração (Barroso e Pedro 1991).

A cromatografia gasosa (CG) é baseada na partição das substâncias entre uma fase líquida estacionária e uma fase gasosa móvel. Para o transporte da fase móvel o soluto necessita de permanecer algum tempo na fase de vapor e é necessária uma pressão de vapor a uma dada temperatura seleccionada para a separação. A temperatura de 350°C é considerada o limite praticável, devido à capacidade máxima do forno e à estabilidade da fase estacionária. A aplicação da cromatografia gasosa é por isso limitada aos compostos que têm pontos de ebulição abaixo dos 450° e que são estáveis à temperatura de separação. Na sua maioria, os compostos dos óleos essenciais têm pontos de ebulição menores e são um grupo perfeitamente adaptado

para a análise por cromatografia gasosa. A separação entre dois compostos é baseada na diferença de pontos de ebulição e às diferentes interações com a fase estacionária. Em regra, os componentes dos óleos essenciais eluem pela seguinte ordem: hidrocarbonetos monoterpénicos, monoterpénos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpénicos e sesquiterpénos oxigenados (Beek 1999).

Na espectrofotometria de massa, as moléculas são bombardeadas com um feixe de electrões de energia elevada. As moléculas ionizam-se em muitos fragmentos, alguns dos quais são iões positivos. Cada espécie de iões possui um determinado valor da razão da massa para a carga, ou valor  $m/e$ . Como a maioria dos iões possui carga 1,  $m/e$  é simplesmente a massa do ião. Analisa-se o conjunto de iões de forma a obter-se um sinal para cada valor de  $m/e$  que estiver representado e a intensidade de cada sinal traduz a abundância relativa do ião que o produz. O pico mais intenso denomina-se pico de base e as intensidades dos vários picos exprimem-se numa escala relativa, atribuindo-se o valor 100 a este pico. O espectro de massas é representado por um gráfico onde se exprimem as intensidades relativas dos sinais correspondentes aos vários valores de  $m/e$ , sendo esta uma característica altamente individualizada dos compostos. Os espectros de massa podem ser utilizados na verificação da identidade de dois compostos e na verificação da estrutura de um novo composto (Morrison e Boyd 1996).

## 1.5. Raízes transgénicas

Desde os princípios dos anos 80, que as raízes transgénicas ou *hairy roots* são utilizadas como um sistema experimental no estudo do metabolismo das raízes (Robins 1998) e vistas como uma alternativa às culturas de suspensões celulares na produção de compostos químicos em larga escala (Lanoue *et al.* 2004). Além disso, são uma opção à colheita destrutiva de espécies em que as raízes acumulam metabolitos de elevado interesse económico (Guillon *et al.* 2006).

As raízes transgénicas são caracterizadas por apresentarem elevadas taxa de crescimento como as culturas celulares e células não organizadas (*calli*), mantendo um fenótipo estável como uma raiz não transformada (Tone *et al.* 1997), e possuírem uma elevada estabilidade genética, considerada uma vantagem na cultura de órgãos (Giri e Narasu 2000, Giri *et al.* 2001, Choi *et al.* 2004). Muitos estudos usando diferentes raízes transformadas demonstraram uma estabilidade genética e bioquímica de mais de 10 anos (Baiza *et al.* 1999, Lanoue *et al.* 2002, Maldonado-Mendoza *et al.* 1993 em Lanoue *et al.* 2004) não produzindo quimeras ou variações somaclonais como as respectivas culturas celulares (Saxena *et al.* 2007). As *hairy roots* podem também ser consideradas um bom sistema no estudo da biologia das raízes, na formação de raízes secundárias e pêlos radiculares e da interacção da raiz com patógenos (Figueiredo *et al.* 2006) e organismos simbióticos (Jolicoeur *et al.* 1998).

### 1.5.1. Transformação genética

*Agrobacterium rhizogenes* é uma bactéria do solo gram-negativa responsável pelo síndrome *hairy root* em plantas (Giri and Narasu 2000, Bourgaud *et al.* 2001, Hu e Du 2006, Srivastava e Srivastava 2007). Quando a bactéria infecta a planta o T-DNA entre as regiões TR e TL do plasmídeo Ri da bactéria, indutor da formação de raízes, é transferido e integrado no genoma nuclear da planta hospedeira. Este T-DNA possui um conjunto de genes responsáveis pela produção de enzimas que controlam a biossíntese de auxinas e citocininas. O novo balanço hormonal induz a formação de uma proliferação de raízes, denominadas por *hairy roots*, que emergem do local da infecção. O fenótipo das *hairy roots* é caracterizado por um crescimento rápido, independente de hormonas, com ausência de geotropismo e geneticamente estável. Estas raízes têm a capacidade de crescer *in vitro*, na ausência da bactéria estabilizadora, e geralmente crescem melhor que as raízes não transformadas da mesma espécie, apresentando uma grande incidência de raízes secundárias laterais ao contrário das raízes não transformadas (Shen *et al.* 1988, Tone *et al.* 1997, Guillon *et al.* 2006, Hu e Du 2006). As ORFs (*open reading frames*) 10, 11 e 12 (*rol* (root locus) A, *rol* B e *rol* C, respectivamente), constituintes da região plasmídeo, são consideradas essenciais para a formação das *hairy roots* (White *et al.* 1985). O gene *rol* B tem um importante papel na indução das *hairy roots*, enquanto que o *rol* A e o *rol* C e as outras ORFs actuam sinergisticamente para promover a indução de raízes (Spena *et al.* 1987, Aoki and Syono 1999 em Zdravkovic-Korac *et al.* 2004). Foi referido que os genes *rol* do Ri T-DNA induzem um número de mudanças relativamente à sensibilidade a fitohormonas e ao metabolismo das fitohormonas (Ishizaki *et al.* 2002). Embora o mecanismo molecular de transferência do T-DNA para a planta seja bastante semelhante ao da espécie *Agrobacterium tumefaciens*, a fisiologia base da tumorigénese é fundamentalmente diferente. Os tumores de *crown gall* resultam da sobreprodução das fitohormonas auxinas e citocininas específicas dos genes T-DNA da *A. tumefaciens*. Embora o T-DNA de alguns Ri-plasmídeos das *A. rhizogenes* contenham genes biossintéticos de auxinas, este *loci* não é sempre necessário para a formação de *hairy roots*. Diferentes estudos sugerem que os tumores de *hairy roots* resultam do aumento da sensibilidade das células transformadas aos níveis endógenos de auxinas (Gelvin 1990).

Mais de 450 espécies de diferentes géneros e famílias (Juglandaceae, Lamiaceae, Moraceae, Ranunculaceae, Solanaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Plumbaginaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae e Apiaceae) são conhecidas como sendo susceptíveis à infecção com esta bactéria. As opinas, produzidas pelos tecidos das plantas infectadas, actuam como um substrato nutritivo para a bactéria na rizosfera (Hamill e Lidgett 1997, Srivastava e Srivastava 2007) Baseado nos tipos de opinas produzidas, as estirpes de *A. rhizogenes* podem ser separadas em cinco linhas: octopinas, agropinas, nopalinas, manopinas e cucumopinas (Zhou *et al.* 1998 em Hu e Du 2006). As estirpes agropina são as estirpes mais utilizadas devido a sua forte capacidade de indução (Hu e Du 2006). A escolha do tipo/estirpe de *A. rhizogenes* é conhecida por influenciar a frequência de transformação, a capacidade de crescimento, a morfologia, e a

qualidade e quantidade de produção de metabolitos secundários (Lourenço *et al.* 1999, Fu *et al.* 2005).

No estabelecimento de *hairy roots* podem utilizar-se diferentes tipos de material vegetal, como folhas, hipocótilos ou protoplastos. O material é ferido e inoculado com *A. rhizogenes*. Usualmente dois ou três dias depois, o explante é transferido para um meio de cultura com antibióticos como a cefotaxima, carbencilina, vancomicina, ampicilina ou tetraciclina de modo a eliminar a bactéria. Para a confirmação da transformação das raízes, podem ser inseridos, no plasmídeo transformante, o gene da  $\beta$ -glucoronidase (GUS), o gene neomicina fosfotransferase (NPT-II), que codifica para a enzima de resistência à canamicina, ou outros genes que conferem resistência às raízes transgênicas em relação a antibióticos (Hu e Du 2006).

A transformação dos tecidos das plantas por infecção com *A. rhizogenes* mostrou poder alterar tanto quantitativamente como qualitativamente o metabolitos produzidos (Shanks e Morgan 1999, Ishizaki *et al.* 2002).

Visto que a *A. rhizogenes* pode também transferir o T-DNA de vectores binários (segundo plasmídeo), o plasmídeo Ri tem sido amplamente usado como um vector de introdução de DNA externo num vasto leque de espécies de plantas dicotiledóneas (Cho e Widholm 2002, Ishizaki *et al.* 2002). No entanto, verificou-se que os genótipos das plantas hospedeiras podem afectar a expressão dos genes transferidos (Hu e Du, 2006).

### 1.5.2. Crescimento das raízes transgênicas e produção de metabolitos secundários

As raízes transgênicas diferem morfológicamente das raízes não transformadas, sendo mais ramificadas, com uma maior taxa de crescimento (Rhodes *et al.* 1997). O crescimento das raízes transgênicas é efectuado pela formação de muitas ramificações laterais juvenis a partir de ramificações parentais num determinado período de desenvolvimento. A formação de novas células ocorre 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). As raízes transgênicas podem ser mantidas em condições *in vitro* através do sistema *batch*. Este método consiste na manutenção do material vegetal, sob agitação num volume fixo de meio de cultura líquido. A biomassa aumenta até que um factor do ambiente de cultura se torne limitante e o crescimento cesse (Chawla 2000 em Costa 2005). O crescimento das culturas de raízes transgênicas apresenta cinco fases: 1) fase latente, de preparação para a divisão celular, 2) fase exponencial, na qual se dá o crescimento máximo uma vez que a taxa de divisão celular é máxima e onde em regra geral, ocorre a produção de metabolitos secundários 3) fase linear, onde se verifica um abrandamento na taxa de divisão celular e um aumento de taxa de expansão celular, 4) fase do decréscimo de crescimento, na qual as taxas de divisão e alongamento celular diminuem e, por último, 5) fase estacionária, na qual a biomassa permanece constante (Chawla 2000 em Costa 2005). Quando as culturas são subcultivadas para meio de cultura fresco, verifica-se uma nova fase latente, à qual se sucederá a fase exponencial. É possível a manutenção

continua das culturas na fase exponencial, por subcultivos frequentes, que permitem a obtenção de uma grande quantidade de biomassa.

As raízes transgênicas exibem frequentemente uma maior capacidade biossintética para a produção de metabolitos secundários do que culturas indiferenciadas e uma igual ou superior capacidade que as plantas mãe (Figueiredo *et al.* 2006, Srivastava e Srivastava 2007). As *hairy roots* são também bons produtores de metabolitos secundários típicos das raízes não transformadas (Verpoorte 2002, Srivastava e Srivastava 2007). Uma limitação que se poderia registar era a impossibilidade destas raízes produzirem compostos originários das partes aéreas da planta, no entanto, alguns estudos revelaram o contrário, verificando-se que metabolitos encontrados nas partes aéreas da planta mãe são produzidos pelas raízes transgênicas (Hamill e Lidgett 1997). Esta característica pode dever-se à transformação das raízes, que afecta as vias metabólicas e leva à produção de novos compostos que não são produzidos normalmente neste órgão (Hu e Du, 2006). Por outro lado, ao constituírem sistemas isolados, as raízes em cultura não têm acesso a precursores com origem noutra parte da planta e os compostos que na planta são translocados da raiz para outros locais, permanecem no seu local de síntese ou são excretados para o meio de cultura (Rhodes *et al.* 1997, Figueiredo *et al.* 2001)

Na cultura de raízes transgênicas é necessário, para uma boa produção de metabolitos secundários, otimizar as condições de cultura estudando os vários factores conhecidos por influenciarem o crescimento das raízes e a produção de compostos: a fonte de carbono e a sua concentração, a concentração iónica do meio, o pH do meio, a luz, as fitohormonas, a temperatura e o estado do inóculo (Christen *et al.* 1992, Toivonen *et al.* 1992, Rhodes *et al.* 1994, Arroo *et al.* 1995, Bhadra *et al.* 1995, Vanhala *et al.* 1998, Morgan *et al.* 2000 em Hu e Du 2006). Diversas estratégias podem ser utilizadas com o objectivo de aumentar a produção de metabolitos, entre elas, a eliciação, o aumento da quantidade do precursor, a permeabilização celular e a retenção das moléculas produzidas com adsorventes. O mensageiro vegetal metil jasmonato (MeJa) é utilizado como eliciador, induzindo o metabolismo secundário sem afectar a taxa de crescimento das culturas. Na permeabilização celular podem utilizar-se detergentes, cálcio, agentes quelantes, sonificadores de modo a estimular a secreção de metabolitos secundários (Guillon *et al.* 2006).

As *hairy roots* são um material promissor, não só pela produção de metabolitos importantes e úteis mas também no melhoramento de plantas através da regeneração de plantas transgênicas com características desejadas (Tone *et al.* 1997). Podem ser igualmente importantes na indústria farmacêutica, na produção de proteínas recombinantes e na área da fitorremediação devido à elevada proliferação das raízes. Os progressos recentes no *scaling-up* das culturas de raízes transgênicas tornam este sistema muito atractivo nos processos industriais (Guillon *et al.* 2006). Desenvolvimentos mais recentes indicam que a tecnologia associada à cultura de raízes transgênicas para a produção de fármacos passou de uma escala laboratorial para uma escala industrial [2].

Os problemas que se podem colocar na utilização do sistema de raízes transgênicas,

incluem a variação da capacidade de biossíntese dos diferentes clones utilizados, a possível perda de cromossomas, e cosupressão entre os genes exógenos e endógenos (Hu e Du 2006).

A investigação em curso foca-se no modo como se poderá influenciar o metabolismo normal das raízes, tendo como objectivo a produção de quantidades aumentadas de compostos e a produção de novos compostos que leve a uma eventual aplicação em larga escala, sob custos controlados, independente de factores sazonais e/ou das condições ambientais (Figueiredo *et al.* 2006).

### 1.5.3. Regeneração em raízes transgénicas

O interesse na utilização de *A. rhizogenes*, como um vector de transformação, aumentou, observando-se em muitos casos a regeneração de plantas a partir das *hairy roots* e o seu normal desenvolvimento no solo. Este fenómeno foi pela 1ª vez observado e registado por Ackermann (1977) (Hamill e Lidgett 1997), seguindo-se registos sucessivos de regenerações de sucesso de várias plantas a partir de raízes transgénicas (Ooms *et al.* 1985, Davey *et al.* 1987, Noda *et al.* 1987, Petit *et al.* 1987, Golds *et al.* 1991, Lambert e Tepfer 1991, Otani *et al.* 1993, Saitou *et al.* 1992, Uozumi *et al.* 1996, Stiller *et al.* 1997, Ohara *et al.* 2000, Yang and Choi 2000, Cho e Widholm 2002, Ishizaki *et al.* 2002, Choi *et al.* 2004). A possibilidade de regeneração de plantas a partir de raízes transgénicas e a possibilidade, através da engenharia genética, da alteração das propriedades das plantas estimularam o interesse em desenvolver procedimentos de regeneração (Subotic *et al.* 2003; Hamill *et al.* 1987 em Uozumi *et al.* 1996).

As *hairy roots* têm uma grande aplicabilidade na produção em larga escala de matérias úteis como enzimas e metabolitos secundários. No entanto, a regeneração de plantas a partir de raízes transgénicas possibilita uma potencial utilização destas na área agronómica. Parece por isso haver um maior interesse no estudo de regeneração de espécies cultivares, como algumas leguminosas, registando-se um menor número de estudos relativos à regeneração de espécies aromáticas.

Verifica-se em muitas espécies que a regeneração a partir de raízes transgénicas estabelecidas com *A. rhizogenes* é espontânea, ocorrendo a formação de *shoots* adventícios (Christey 1997 em Koike *et al.* 2003). No entanto, algumas raízes transgénicas não apresentam esta característica. Foi demonstrado que este facto pode dever-se à espécie a que pertencem ou pode estar relacionado com o tempo de cultura das raízes utilizadas, embora se verifique que as raízes com mais tempo de cultura mantêm um potencial de regeneração estável sendo capazes de formar *shoots* quando o meio de cultura é suplementado com reguladores de crescimento (Cho e Widholm 2002). Desta forma, pode observar-se que num número de espécies de plantas, a regeneração a partir de raízes transgénicas pode ser observada quando se procede à cultura num meio com reguladores/hormonas de crescimento (Trulson *et al.* 1986) e que por outro lado, noutras espécies, as raízes transgénicas cultivadas à luz, ou em condições de escuridão, formam *shoots* adventícios num meio sem fitohormonas (Petit *et al.* 1987, Saitou *et al.* 1992). Na espécie

*Astragalus sinicus* verificou-se que a luz não era essencial à formação de *shoots* desde que o meio fosse suplementado com reguladores de crescimento. A formação de *shoots* também ocorria às escuras na presença de TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina) (Cho e Widholm 2002). Em raízes de rábano com pouco tempo de cultura, não houve formação de *shoots* na escuridão, por outro lado em condições de luz as raízes produziram muitos *shoots* com elevada frequência e sem a presença de reguladores de crescimento (Saitou *et al.* 1992). Num estudo feito em *Angelonia salicarifolia* a maior frequência de regeneração foi obtida num meio contendo BA (benziladenina) com iluminação permanente. A iluminação permanente foi mais favorável à regeneração do que a escuridão permanente (Koike *et al.* 2003). Em espinafres (*Spinacia oleracea* L.) observou-se que uma grande concentração de auxinas era necessária para a indução de *calli* de raízes transformadas, reflectindo o resultado obtido em raízes não transformadas (Ishizaki *et al.* 2002). A formação de *shoots* adventícios *in vitro* está dependente de vários factores, incluindo os genéticos, o estado fisiológico das raízes transgênicas e as condições químicas e físicas da cultura (Saitou *et al.* 1992).

As plantas regeneradas a partir de raízes transgênicas possuem um fenótipo característico, como internós encurtados, folhas enrugadas, uma abundante massa de raízes com ramificação lateral (Tepfer 1984 em Ishizaki *et al.* 2002), redução da dominância apical e alteração do tamanho, forma e cor das suas flores (Choi *et al.* 2004). Algumas mudanças morfológicas podem ser hereditárias para algumas espécies (Tepfer 1984 em Cho e Widholm 2002). As plantas derivadas de *hairy roots* de tomate produzem flores e frutos com sementes viáveis, no entanto pode-se observar uma severa redução do tamanho das sementes. Apesar de algumas alterações deletérias das partes aéreas das plantas derivadas de *hairy roots*, a grande proliferação de raízes pode ser usada no desenvolvimento de *rootstocks* de cultivares de interesse (Peres *et al.* 2001). Fragmentos de *hairy roots* e primórdios de caules adventícios têm sido estudados para a aplicação em sementes artificiais (Uozumi *et al.* 1996). Este fenótipo característico é consequência da expressão dos genes *rol*. Os genes, *rol A*, *rol B* e *rol C* são conhecidos por estarem relacionados com o metabolismo/sensibilidade das células transformadas em relação às fitohormonas giberelinas (Moritz and Schmülling 1998), auxinas (Delbarre *et al.* 1994) e citocininas (Faiss *et al.* 1996). Neste sentido, a expressão do genes *rol* pode influenciar o processo de regeneração nas *hairy roots* e o fenótipo das plantas regeneradas (Peres *et al.* 2001, Cho e Widholm 2002). No entanto, em tabaco verificou-se que outros genes para além dos *rol* localizados em TI-DNA da *A. rhizogenes*, podem alterar a morfogénese e a sensibilidade a hormonas das plantas transgênicas (Lemcke and Schmülling 1998). Observou-se que diferentes linhas de raízes transgênicas de uma mesma espécie podiam originar regenerantes com fenótipos semelhantes a plantas obtidas da germinação da semente. Esta diferença de fenótipos pode estar relacionada com diferenças na expressão dos diferentes genes *rol* nas diferentes linhas (Cho e Widholm 2002). As plantas transgênicas produzidas das raízes transgênicas não apresentam quimeras, porque as *hairy roots* têm origem em células únicas e são formadas por células transformadas uniformemente

(Ohara 2000).

Um dos interesses na regeneração de plantas a partir de raízes transformadas é o estudo da composição volátil da planta transformada em relação à planta não transformada. No entanto, não existem muitos registos, visto que este interesse está ligado às espécies aromáticas. Um estudo em *Pelargonium* sp. refere que o óleo essencial de 81% das plantas transformadas era semelhante qualitativamente às plantas selvagens/não transformadas (Saxena *et al.* 2007).

Uma regeneração eficiente pode levar, através da inserção e expressão de transgenes, à modificação das propriedades das plantas, como o aumento da produção de um metabolito secundário de interesse por parte desta.

#### 1.5.4. Biotransformação em raízes transgénicas

A biotransformação baseia-se num conjunto de reacções químicas catalisadas por células, órgãos ou enzimas. Tem um grande potencial para gerar novos produtos ou para produzir produtos conhecidos de uma forma mais eficiente, levando a cabo conversões de substratos complexos usando células vegetais, animais ou microbianas ou enzimas purificadas como catalisadores (Giri *et al.* 2001).

A biotransformação através de culturas celulares de plantas é considerada um método importante para converter de modo barato e abundantemente compostos orgânicos em compostos mais úteis de acordo com a capacidade das culturas celulares de plantas para produzirem especificamente metabolitos secundários (Suga e Hirata 1990 em Shimoda *et al.* 2006). As reacções envolvidas na biotransformação de componentes orgânicos por culturas de células de plantas incluem a oxidação, redução, hidroxilação, esterificação, metilação, isomerização, hidrólise e glicosilação (Ishihara *et al.* 2003). As vantagens de utilizar culturas de células como biocatalisadores são o seu crescimento em laboratório em ciclos de 1 ou 2 semanas, a sua homogeneidade, a reprodutibilidade durante todo o ano e a acumulação de grandes quantidades de produtos pretendidos (Ishihara *et al.* 2003).

Nos processos de biotransformação catalisados por enzimas vegetais, conhecem-se vários compostos químicos existentes na natureza que podem ser submetidos a biotransformação: esteróides, alcalóides, cumarinas, terpenóides, lenhinas e outros. No entanto, não é necessária a extracção destes compostos directamente da planta, visto que podem ser utilizados substratos de origem sintética (Giri *et al.* 2001). As enzimas de plantas podem ser aplicadas na produção da totalidade de novos fármacos e podem ser utilizadas para modificar fármacos já existentes melhorando o seu espectro de bioactividade. Por exemplo, os efeitos secundários do fármaco podem ser reduzidos e a estabilidade pode ser aumentada pela modificação da molécula mãe (Giri *et al.* 2001). Na indústria farmacêutica, a primeira biotransformação realizada envolveu a produção de uma penicilina modificada produzida através de uma única reacção catalizada por uma penicilina aciclase imobilizada (West 1996 em Rao e Ravishankar 2002)

A biotransformação pode apresentar vários inconvenientes, como a baixa solubilidade dos

precursores, a toxicidade dos precursores e dos produtos e a diversidade metabólica que pode levar à produção de subprodutos ou à degradação de moléculas alvo (Schrader *et al.* 2004). A glicosilação é uma das reacções químicas que ocorre prontamente nas células das plantas como resposta à toxicidade dos precursores ou à sua baixa solubilidade. Estes precursores passam para a sua forma glicosilada sendo armazenados no vacúolo. A conjugação glicosil tem um interesse especial, pela possibilidade de produzir novos produtos, assim como converter substâncias insolúveis em água em compostos solúveis (Ishihara *et al.* 2003). Esta reacção tem uma aplicação industrial, nas indústrias farmacêutica e alimentar (Berger e Drawert 1988 em Figueiredo *et al.* 1996).

No melhoramento dos processos de biotransformação, sistemas como os microbianos podem ser mais vantajosos, visto que possuem um crescimento rápido e a metodologia relativa à manipulação genética de microorganismos está bem estabelecida (Giri *et al.* 2001). Por outro lado, a imobilização de culturas de células de plantas oferece algumas vantagens para a biotransformação de substratos exógenos: as células tornam-se mais resistentes a danos, podem ser utilizadas repetidamente por um período de tempo prolongado, originam-se grandes concentrações de biomassa e são possíveis elevadas conversões de substratos (Ishihara *et al.* 2003).

Vários estudos descrevem a biotransformação de terpenos usando enzimas, culturas de células vegetais, órgãos vegetais bactérias, cianobactérias, leveduras, microalgas e fungos (Carvalho e Fonseca 2006). A grande maioria de terpenóides biológicos activos são produzidos como metabolitos secundários de plantas, e demonstram possuir uma actividade biológica contra plantas, microorganismos e insectos. Também são constituintes de sabores e fragrâncias. Visto que as propriedades destes compostos se devem às configurações específicas e às reacções que levam a modificações das suas estruturas moleculares, a biotransformação de terpenóides apresenta-se como um processo proveitoso na produção biológica de terpenóides activos e de novos compostos deles derivados (Miyazawa *et al.* 1999, Miyazawa *et al.* 2003).

Infelizmente, os terpenos são pouco solúveis em água, o que dificulta a biotransformação, habitualmente associada a sistemas aquosos, visto que estes são geralmente compatíveis com enzimas e células em crescimento (Carvalho e Fonseca 2006).

Para além da utilização de culturas de células vegetais, são também utilizados outros organismos na biotransformação de terpenos. Esporos de fungo de *Penicillium digitatum* são capazes de biotransformar geraniol, nerol e citrol (mistura dos álcoois nerol e geraniol) e citral (misturas dos aldeídos neral e geranial) para 6-metil-5-hepten-2-ona (Demyttenaere e De Kimpe 2001 em Carvalho e Fonseca 2006). Outro exemplo é a cultura de microalgas, utilizada na biotransformação de compostos terpenóides, em compostos de grande valor para a indústria alimentar e de fragrâncias (Hook *et al.* 2003).

As raízes transgênicas não são só importantes sistemas na produção de compostos derivados de raízes mas também na produção de novos compostos através da biotransformação.

Estes novos compostos são produzidos num período de tempo mais pequeno do que se fossem produzidos na planta mãe, visto que o ciclo de crescimento é mais reduzido *in vitro* (Rao e Ravishankar 2002). Para além da produção de novos compostos, pode potenciar-se a produção de um composto de interesse e podem ser ultrapassados problemas associados à síntese química e às culturas de células em suspensão, como a instabilidade bioquímica ligada a fenómenos de variação somaclonal (Giri *et al.* 2001). Além disso, os processos de biotransformação e eliciação são mais fáceis de realizar do que em culturas de células em suspensão, visto que as culturas de raízes se encontram imobilizadas (Figueiredo *et al.* 2006).

Os estudos de biotransformação em raízes transgénicas levam a conhecer vias biossintéticas e servem como uma importante ferramenta na modificação estrutural de compostos que possuem actividade terapêutica (Rao e Ravishankar 2002).

## 1.6. Objectivos

Os metabolitos secundários são utilizados na medicina e em diversos processos industriais, sendo por isso compostos de grande importância. O cultivo de plantas aromáticas e medicinais produtoras de compostos de valor comercial é por vezes difícil e a síntese química destes compostos é dispendiosa e muitas vezes dificultada pela estrutura complexa do composto. Desta forma, os recursos naturais continuam a ser explorados com vista à recolha destes produtos, correndo-se o risco de perda de algumas espécies e de biodiversidade. As raízes transgénicas são um sistema de cultura *in vitro* utilizado no estudo das vias metabólicas e na produção de metabolitos secundários de interesse. Na tentativa de aumentar a produção destes compostos *in vitro*, têm sido utilizadas várias estratégias, de índole química, física ou genética. A regeneração de plantas a partir de raízes transformadas pode ser um passo na criação de plantas com características de interesse, como a produção aumentada de um metabolito secundário importante. A biotransformação engloba um conjunto de reacções que podem contribuir para um aumento da produção destes metabolitos e para a produção de novos compostos *in vitro*. Neste contexto, pretendeu-se com este trabalho:

- Avaliar a capacidade de regeneração das raízes transgénicas de *Levisticum officinale* e de que forma a obtenção de regenerantes condiciona a composição da componente volátil.

- Verificar de que modo a biotransformação de substratos monoterpénicos influencia a morfologia, o crescimento e a componente volátil das raízes transgénicas de *L. officinale*, comparativamente ao crescimento em condições controlo.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Material Vegetal

Nos vários ensaios realizados utilizaram-se raízes transgênicas de *Levisticum officinale* W. D. J. Koch, estabelecidas com a bactéria A4 pRiA4::70GUS como descrito em Santos *et al.* 2005. As culturas de raízes transgênicas foram mantidas em meio SH (Schenk & Hildebrandt 1972), Tabela 2.1 em anexo, em escuridão permanente, a 24°C, sob agitação, numa agitadora orbital Pilot-Shake RC-6-U (Adolf Kühner AG, Suíça) a 80r.p.m., e sujeitas a subculturas periódicas, com intervalos de 3 semanas.

### 2.2. Regeneração

#### 2.2.1. Regeneração espontânea de raízes transgênicas

##### 2.2.1.1. Em JIFFY “pellets”

Raízes transgênicas jovens de *L. officinale*, mantidas como referido em 2.1., foram transferidas para JIFFY “pellets” (turfa prensada, JIFFY-7 AS-JIFFY Products Norway), previamente humedecidos em água. As raízes foram colocadas a cerca de 2 cm da superfície dos JIFFYs. O ensaio foi realizado em seis JIFFYs mantidos a 24°C, sob radiação permanente de luz branca com lâmpadas Philips TLD 36W/84, durante cerca de 45 dias.

##### 2.2.1.2. Em meio de cultura

Porções de raízes transgênicas jovens de *L. officinale* foram inoculadas, assepticamente, em caixas de Petri contendo 20 ml de meio MS/2 [meio MS (Murashige & Skoog 1962) diluído para metade, Tabela 2.2 em anexo, segundo o método descrito em Hoshino e Mii (1998)]. Devido a uma adaptação deste método, não foram adicionados reguladores de crescimento, não se realizaram sub-culturas, modificaram-se as condições de temperatura e fotoperíodo e o tamanho do inóculo. As 4 caixas utilizadas foram mantidas a 24°C, sob condições de iluminação semelhantes às referidas em 2.2.1.1., sob fotoperíodo de 16h luz, durante um período de 90 dias. Estas culturas de raízes transgênicas serviram de controlo às experiências de regeneração induzida.

#### 2.2.2. Regeneração induzida

##### 2.2.2.1. Higromicina B

De acordo com o método adaptado do descrito em Hoshino e Mii (1998), utilizaram-se 4 caixas de Petri inoculadas com meio MS/2. Estas caixas foram divididas em três partes. O antibiótico Higromicina B foi utilizado em substituição de *bialaphos*, visto que em meios de cultura

para regeneração de raízes transgênicas, a utilização de um ou outro destes antibióticos é alternativa (Shrawat *et al.* 2007). Fez-se assim uma adaptação do método descrito por Hoshino e Mii (1998), convertendo-se as concentrações de *bialaphos*, utilizadas por estes autores, nas concentrações de Higromicina B referidas abaixo, tendo em conta a relação de 1:10, descrita por Shrawat *et al.* (2007). A partir de uma solução de Higromicina B,  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ , preparada assepticamente e esterilizada por filtração, colocaram-se  $80\mu\text{l}$ ,  $200\mu\text{l}$  e  $280\mu\text{l}$  no meio de cultura, de modo a obter as concentrações aproximadas de higromicina B de  $2\text{mg.l}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  e  $7 \text{ mg.l}^{-1}$  respectivamente. As caixas foram inoculadas com raízes e mantidas nas mesmas condições descritas em 2.2.1.2.

### 2.2.2.2. Ácido salicílico

Utilizando-se o mesmo método descrito em 2.2.1.2, 4 caixas de Petri contendo meio MS/2 foram divididas em três partes, sendo cada parte suplementada localmente com  $100\mu\text{l}$ ,  $208\mu\text{l}$  e  $345\mu\text{l}$  de uma solução estéril de ácido salicílico (AS), numa concentração de  $8 \text{ g.l}^{-1}$ , de modo a se atingirem  $0,3\text{mM}$ ,  $0,5\text{mM}$  e  $0,8\text{mM}$  [para obter concentrações aproximadas de  $41 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $83 \text{ mg.l}^{-1}$ ,  $138 \text{ mg.l}^{-1}$  de acordo com a adaptação do método descrito por Hao *et al.* (2006)]. Em seguida, inocularam-se e mantiveram-se as caixas do mesmo modo que em 2.2.1.2.

### 2.2.2.3. Radiação UV

Num terceiro ensaio, utilizaram-se caixas de Petri inoculadas com meio MS/2 e com raízes transgênicas que foram sujeitas a radiação UV, com uma lâmpada Philips TUV 15W/G15 T8 UV-C, durante 30min após a inoculação das raízes (tempo 0) e ao longo de 3 dias durante períodos de 15min. Foram utilizadas 8 caixas de Petri, 2 para cada período de exposição à radiação UV, Tabela 2.3. As caixas foram mantidas nas condições descritas em 2.2.2.1 para além dos períodos de exposição à luz UV.

Tabela 2.3. Ensaio de radiação UV.

		Tempo			
		0	1	2	3
Código	30 <sub>0</sub>	30 min			
	30 <sub>1</sub>	30 min	15 min		
	30 <sub>2</sub>	30 min	15 min	15 min	
	30 <sub>3</sub>	30 min	15 min	15 min	15 min

## 2.3. Biotransformação

Nos ensaios de capacidade de biotransformação das raízes transgênicas de *L. officinale* utilizaram-se dois substratos, mentol e geraniol, preparados, assepticamente em separado, em solução metanólica a 2%. Os substratos foram adicionados, assepticamente, às culturas de raízes

transgénicas, quinze dias após a sua inoculação em meio SH, de modo a se obter uma concentração de 25 mg.l<sup>-1</sup> de substrato (mentol ou geraniol) no meio de cultura.

As culturas de raízes transgénicas foram inoculadas em condições de assepsia em Erlenmeyers de 250 ml. No primeiro ensaio para o substrato mentol, utilizou-se um volume de 100 ml de meio SH e 1g de p.f. de raízes. Nos restantes cinco ensaios, três relativos ao substrato mentol e dois relativos ao geraniol, reduziu-se o volume de meio de cultura para metade, utilizando-se 50 ml de meio SH para a mesma quantidade de inóculo, 1 g de p.f.. Os frascos foram tarados numa balança Sartorius L 420-\*RC, gama 0-420g, precisão 1mg. As raízes transgénicas foram previamente filtradas assepticamente sob vácuo perfazendo uma concentração de 20 g.l<sup>-1</sup>.

As culturas de raízes transgénicas às quais se adicionou substrato e as culturas controlo (mantidas apenas em meio SH), foram avaliadas semanalmente em termos de morfologia, crescimento e composição de voláteis. Para se avaliar o efeito do substrato na componente volátil e no crescimento das raízes no período imediato após a sua adição, retiraram-se amostras suplementadas com substrato e amostras controlo ao fim de 1h, 4h, 8h, 24h, 32h e 48h, que foram armazenadas a -20°C até se proceder à extracção.

### 2.3.1. Análise Morfológica

A análise morfológica das raízes transgénicas controlo e suplementadas com os dois substratos, foi realizada à lupa (Highlight 2000 Olympus Europe) ao longo do período de crescimento das raízes transgénicas.

### 2.3.2. Caracterização do crescimento das raízes transgénicas

O crescimento foi determinado num período de 7 semanas pelo método de desassimilação (Schripsema *et al.* 1990) e pela determinação semanal do peso fresco e seco das raízes.

Os Erlenmeyers foram distribuídos de modo a separar as amostras controlo e as amostras sujeitas ao ensaio de biotransformação, utilizadas na determinação da desassimilação, na determinação do peso fresco e seco e na análise dos óleos essenciais, Tabela 2.4. Sempre que possível utilizaram-se, por ensaio experimental, dois Erlenmeyers para cada avaliação de crescimento e na análise da componente volátil.

Tabela 2.4. Delineamento experimental dos diferentes ensaios

Objectivo	Meio de cultura SH	Código
Determinação da desassimilação	Sem raízes (brancos controlo)	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub>
	Sem raízes e com substrato (brancos com substrato)	BS <sub>1</sub> , BS <sub>2</sub>
	Raízes sem substrato	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub>
	Raízes com substrato	RS <sub>1</sub> , RS <sub>2</sub>
Medição semanal do peso fresco e peso seco e análise da componente volátil	Raízes sem substrato	C <sub>1,2,3,4,5,6,7</sub>
	Raízes com substrato	CS <sub>1,2,3,4,5</sub>
Análise da componente volátil 1h, 4h, 8h, 24h, 32h e 48h após a adição de substrato	Raízes sem substrato	E <sub>1,4,8,24,32,48</sub>
	Raízes com substrato	ES <sub>1,4,8,24,32,48</sub>

### 2.3.2.1. Determinação do peso fresco

Na determinação do peso fresco as pesagens foram realizadas semanalmente. Após remoção do excesso de meio de cultura sobre papel de filtro, procedeu-se à pesagem das raízes numa balança de elevada precisão Sartorius BP 210S, gama 0-210g, precisão de 0,1mg. As amostras foram armazenadas a -20°C até extracção.

### 2.3.2.2. Determinação do peso seco

A partir das amostras utilizadas na determinação do peso fresco, retirou-se uma pequena porção de raízes, que foi pesada na balança referida em 2.3.2.1. Estas raízes foram congeladas a -20°C e posteriormente liofilizadas num liofilizador Chris Alpha I-5, a uma pressão de  $10^{-1}$ mbar, a -42°C, durante 3 dias, e pesadas na mesma balança.

### 2.3.2.3. Método da desassimilação

O método da desassimilação tem sido utilizado no estudo do crescimento celular de culturas de células em suspensão (Figueiredo *et al.* 1996) e culturas de raízes transgénicas (Santos *et al.* 2005). Estes dois sistemas são heterotróficos, ou seja, necessitam de uma fonte de carbono para o seu crescimento. Parte desta fonte é convertida em biomassa e a outra é desassimilada após a sua degradação para a obtenção de energia. Neste último processo dá-se a formação de uma mole dióxido de carbono por cada mole de oxigénio consumido. Esta perda de dióxido de carbono leva à diminuição de peso por parte das culturas. Para que se possa registar este balanço utilizam-se rolhas de silicone de poro reduzido e controlado e os pesos dos Erlenmeyers são medidos numa balança de elevada precisão (Sartorius L 420S-\*RC, gama 0-420g, precisão 1mg). Como é necessário introduzir um factor de correcção para a perda de água por evaporação, foram utilizados Erlenmeyers contendo só meio de cultura SH (brancos controlo) e Erlenmeyers contendo o meio de cultura e o respectivo substrato, mentol ou geraniol (brancos com substrato), servindo estes últimos como de factor de correcção aos Erlenmeyers com raízes e suplementados com substrato.

Neste método utilizam-se rolhas de silicone de poro reduzido e controlado (T-32 Shin-Etsu Polymer-Silicosen, Freudenberg Simrit, Holanda), que necessitam de um período de quinze dias antes de se proceder à inoculação, para secarem e estabilizarem depois da esterilização, por autoclavagem. Após a inoculação, as raízes transgénicas foram mantidas nas mesmas condições que se encontrava a cultura-mãe, como referido no ponto 2.1.

A análise do crescimento pelo método de desassimilação iniciou-se no momento após a inoculação (tempo 0), por pesagem diária dos Erlenmeyers.

### 2.3.3. Extracção da componente volátil

Na extracção dos óleos essenciais, utilizaram-se as amostras relativas à determinação do peso fresco, tendo como objectivo uma análise semanal dos compostos voláteis, e as amostras retiradas ao fim de 1h, 4h, 8h, 24h, 32h e 48h, após a adição de substrato.

Os compostos voláteis foram isolados das diferentes amostras, por destilação-extracção, durante 3h num aparelho do tipo Likens-Nickerson (Likens e Nickerson 1964), utilizando *n*-pentano como solvente. A componente volátil foi isolada com uma velocidade de destilação de 3 ml.min<sup>-1</sup> e, sempre que necessário, 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. As amostras da componente volátil foram armazenadas a -20°C até análise.

Com o objectivo de verificar a pureza e não degradação dos substratos utilizados nos ensaios de biotransformação, 63 µl de cada um dos substratos foram sujeitos, em separado, a destilação-extracção, como anteriormente referido. Para estabilizar o processo de ebulição durante a destilação utilizaram-se regularizadores de ebulição. As amostras recolhidas foram armazenadas a -20°C até análise. Para apurar a ocorrência de evaporação ou alteração dos substratos ao longo do tempo, procedeu-se no final de cada ensaio à destilação-extracção dos meios de cultura com substrato, correspondentes aos brancos com substrato.

#### 2.3.4. Análise da componente volátil

##### 2.3.4.1. Cromatografia Gás-Líquido

As componentes voláteis das diferentes amostras foram analisadas através de Cromatografia Gás-Líquido (CGL), num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois Detectores de Ionização de Chama (DIC/FIDs), um sistema de tratamento de dados e um injecto, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30m 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, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. A temperatura foi mantida durante 10 min quando atingidos os 300°C. O injecto e os detectores encontravam-se programados para as temperaturas de 290°C e 280°C, respectivamente. Foi utilizado o hidrogénio, como gás de arrastamento, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s, sendo a relação de repartição de fluxo de 1:50. A composição percentual relativa dos óleos foi determinada, usando o método da normalização, pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Os valores apresentados da componente volátil extraída correspondem ao valor médio de duas injeções.

##### 2.3.4.2. Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa

Na análise por Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa (CGL/EM) utilizou-se um Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30m 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 no ponto 2.3.4. A linha de transferência foi programada para a temperatura de 280°C e a câmara de ionização para uma

temperatura de 220°C. Como gás de arrastamento foi utilizado o hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s, sendo a relação de repartição de fluxo, 1:40, a energia de ionização, 70eV, a corrente de ionização, 60µA; gama de massas, 40-300u e o tempo de varrimento de 1s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção e 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.

### 2.3.5. Determinação dos voláteis glicosilados

Na análise efectuada para a averiguação da existência de compostos voláteis glicosilados utilizou-se a enzima  $\beta$ -glicosidase ( $26\text{U.mg}^{-1}$ ,  $1\text{mg.l}^{-1}$ ). Esta foi aplicada à solução aquosa remanescente (SAR), resultante do processo de destilação-extracção, de acordo com o método de Baerheim Svendsen and Merx (1989). Neste ensaio foram avaliadas as SARs das destilações realizadas às raízes controlo e com adição de mentol, após 4 semanas de crescimento e duas semanas após a adição do substrato. Este ensaio foi igualmente realizado com as SARs resultantes das destilações realizadas às raízes controlo e suplementadas com geraniol, 1, 8, 24, 32 e 48h após a adição deste substrato.

A digestão enzimática foi realizada durante 24h a 37°C. Procedeu-se em seguida ao isolamento da componente volátil como referido acima no ponto 2.3.3., completando-se o volume desejado para as destilações com água ultra pura, e utilizando-se regularizadores de ebulição. As amostras extraídas foram armazenadas a -20°C até análise com referido em 2.3.3.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Regeneração

##### 3.1.1. Regeneração espontânea de raízes transgênicas

Embora se tenha registado em vários estudos que muitas espécies de plantas transformadas com *A. rhizogenes* produzem de forma espontânea *shoots* adventícios (Christey 1997 em Koike *et al.* 2003), no presente estudo não se verificou a regeneração de *shoots* adventícios a partir das raízes transgênicas de *L. officinale*, quer quando mantidas em JIFFY *pellets*, quer nos ensaios em que se utilizou meio MS/2 sólido, sem reguladores de crescimento.

Relativamente ao ensaio com JIFFY *pellets* não se observou, durante os 45 dias de ensaio, crescimento das raízes transgênicas, formação de *calli* ou de *shoots* adventícios. Uma má selecção dos segmentos de raízes transgênicas relativa à fase de desenvolvimento em que estes se encontravam, uma deficiente manipulação das raízes transgênicas ou um excesso de radiação associado a uma rega deficiente, que levou a períodos de secura da turfa, podem ter provocado danos nos tecidos das raízes que diminuíram a viabilidade celular. Por outro lado, os *pellets* são utilizados frequentemente no processo de aclimatização e adaptação ao solo das plantas regeneradas e não como um meio de regeneração de plantas a partir de raízes transgênicas. Pode por isso ser considerado um meio inadequado para este processo.

Em relação à regeneração em meio MS/2 com um fotoperíodo de 16 h luz, observou-se a proliferação das raízes a partir dos primeiros dias, o seu reverdecimento e a formação de tecido caloso a partir da segunda semana. No entanto, não houve formação de *shoots*. Vários factores podem ter influenciado a obtenção deste resultado, sendo um deles o facto de o material utilizado neste ensaio se encontrar em cultura (meio SH líquido às escuras) há cerca de 7 anos, o que pode estimular a ocorrência de alterações genómicas, nomeadamente a redução do número de cromossomas (Xu e Jia 1996). Estes autores verificaram, a partir da análise genética de *hairy roots* de *Onobrychis viciaefolia*, que após quatro meses de subcultura contínua (com intervalos de 3 semanas), a percentagem de células de *hairy roots* com um número normal de cromossomas foi reduzida de 85% para 24%. Oito meses depois, só 4% das células apresentavam um número normal de cromossomas. Esta redução do número de células com um número de cromossomas normal foi acompanhada pela perda da capacidade de regeneração espontânea de plantas transformadas (Xu e Jia 1996).

A partir de culturas com cerca de 4 anos de uma espécie da mesma família que *L. officinale*, a *Pimpinella anisum*, também não se obteve regeneração espontânea por simples passagem do material do meio líquido para o meio MS/2 sólido. A regeneração ocorreu apenas nos ensaios em que se suplementou o meio base com reguladores de crescimento (Pereira 1999). Num estudo com culturas de raízes transgênicas, com 3 anos, da leguminosa *Astragalus sinicus* não se registou a regeneração espontânea de *shoots* num meio não suplementado com

reguladores de crescimento (Cho e Widholm 2002). Cho e Widholm (2002) verificaram ainda que estas raízes transgênicas perderam a sua capacidade de regeneração após 4 a 6 meses de cultura, mas demonstravam uma elevada formação de *shoots* quando o meio de regeneração era suplementado com citocininas. Pensa-se que é possível que as raízes transgênicas, embora com um tempo de cultura elevado e com a consequente redução cromossomal, mantenham o seu potencial de regeneração estável, sendo os reguladores de crescimento essenciais para a formação de *shoots*. No entanto, não se pode concluir que as raízes transgênicas de *L. officinale* reagissem da mesma forma, visto que a capacidade de regeneração está também associada à espécie, ao genótipo das raízes transgênicas utilizadas e à expressão diferenciada dos vários genes *rol* que pode influenciar a sensibilidade aos reguladores de crescimento (Cho e Widholm 2002). Além disso, a utilização aleatória de segmentos de raiz que possivelmente se encontravam em diferentes etapas de desenvolvimento, pode ter influenciado a capacidade de regeneração espontânea (Pereira 1999). Num estudo realizado por Saitou e colaboradores (1992) em raízes transgênicas de rábano observou-se que com um fotoperíodo de 16 horas luz as raízes produziram muitos *shoots* com elevada frequência e sem a presença de reguladores de crescimento. Estas raízes transgênicas possuíam um reduzido tempo de cultura, o que pode justificar ainda mais a hipótese de que o tempo de cultura elevado das raízes transgênicas influencia a sua capacidade de regeneração.

Em relação ao reverdecimento das raízes transgênicas quando colocadas à luz, vários autores sugerem que este está associado à aquisição, por parte das raízes, de funções típicas de órgãos não subterrâneos (Flores *et al.* 1993, Flores *et al.* 1987, Flores e Curtis 1992, Yoshimatsu *et al.* 1990, Aoki *et al.* 1992, Taya *et al.* 1994, Sauerwein *et al.* 1991 em Tone *et al.* 1997). Além disso, observou-se que raízes transgênicas de *Ipomoea aquatica* reverdeciam quando mantidas sob condições de luz e conservavam a sua morfologia ramificada (Taya *et al.* 1994 em Tone *et al.* 1997), o que pode explicar a contínua proliferação das raízes transgênicas de *L. officinale* à luz acompanhada de reverdecimento. Ainda que as raízes adaptadas à luz demonstrem, usualmente, diferentes capacidades biossintéticas comparadas com as mantidas às escuras, devido à presença de enzimas cloroplastidiais, as taxas de crescimento são reprimidas quando são cultivadas à luz (Bourgaud *et al.* 2001).

Podem ainda ser considerados outros factores responsáveis por uma não regeneração espontânea, tais como o tipo de *A. rhizogenes* utilizado no processo de estabelecimento das raízes transgênicas. Phelep e a sua equipa (1991) observaram que a regeneração de *shoots* a partir de raízes transgênicas estabelecidas com a estirpe A4 (tipo agropina) necessitavam de um meio enriquecido com reguladores de crescimento, enquanto que raízes estabelecidas com a estirpe 2659 (tipo cucumopinas) originaram de forma espontânea *shoots* num meio sem reguladores de crescimento.

No presente trabalho, observou-se a fenolização das raízes transgênicas de levístico a partir da sétima semana de ensaio no meio MS/2. Em raízes transgênicas de rábano foi observado que

o crescimento em meio MS sem reguladores de crescimento, em condições de luz, foi semelhante ao registado nas raízes sujeitas a escuridão permanente, havendo uma paragem no crescimento das raízes mantidas à luz na oitava semana de ensaio (Saitou *et al.* 1992). Estes resultados sugerem que o início da oxidação das raízes transgênicas de levístico pode estar relacionado com uma paragem do seu crescimento ou com a morte celular. No entanto, não se realizou um estudo relativamente ao crescimento das raízes em meio MS/2 à luz, não se podendo afirmar desta forma se houve uma paragem ou diminuição da taxa de crescimento.

### 3.1.2. Regeneração induzida

#### 3.1.2.1. Higromicina B

No ensaio de regeneração induzida utilizando meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de Higromicina B, não se observou proliferação e/ou crescimento de raízes transgênicas de levístico, formação de tecido caloso ou de *shoots*. Deste modo, no final do ensaio, os segmentos colocados no meio MS/2 possuíam o mesmo tamanho e espessura iniciais, observando-se a fenolização de alguns segmentos.

A utilização da Higromicina B como agente indutor da regeneração de *shoots* a partir de raízes transgênicas de levístico baseou-se num estudo realizado em raízes transgênicas de *Antirrhinum majus* L. (Hoshino e Mii 1998). Estes autores verificaram que estas raízes transgênicas não sofriam regeneração espontânea ou regeneração induzida por reguladores de crescimento, mas que a aplicação do antibiótico e herbicida *bialaphos* num meio de regeneração MS/2, sem reguladores de crescimento e sob luz permanente, induzia a regeneração de *shoots* combatendo esta recalcitrância. Tendo em conta que a) a Higromicina B e o *bialaphos* são produzidos pela mesma bactéria, *Streptomyces hygroscopicus*; b) os dois antibióticos são, muitas vezes, utilizados em alternativa, em meios de regeneração, como agentes de selecção dos tecidos transformados (Shrawat *et al.* 2007); e c) dado que a Higromicina B é menos dispendiosa que o *bialaphos*, nos ensaios realizados no presente trabalho foi utilizada a Higromicina B. No entanto, os genes que conferem resistência aos dois antibióticos são diferentes, sendo o gene *bar*, o gene que confere resistência ao *bialaphos* (*bar*) (Thompson *et al.* 1987 em Hoshino e Mii 1998) e o gene *Hph*, de resistência à higromicina, que codifica para a enzima higromicina fosfotransferase, catalisadora da formação de fosforil higromicina, que não possui actividade biológica *in vitro* ou *in vivo* [3].

Na bibliografia consultada não se encontraram registos do efeito da Higromicina B na regeneração de plantas a partir de *hairy roots*. No entanto, para uma espécie de Solanaceae, *Solanum melongena* (beringela), transformada com *A. tumefaciens* e não com *A. rhizogenes*, a resposta organogénica foi suprimida pela higromicina a uma concentração de 7,5 mg.l<sup>-1</sup>, enquanto que na presença de 10 mg.l<sup>-1</sup> registou-se a formação de alguns embriões. No entanto, os embriões que se foram formando sofreram oxidação sem qualquer evolução (Picoli 2002).

Hoshino e Mii (1998) observaram que o efeito do *bialaphos* só se verificava em raízes transgênicas e não em raízes não transformadas, parecendo que o efeito do *bialaphos* na regeneração de *shoots* podia estar relacionado ou associado à integração do T-DNA nas células (genes *rol*, gene síntese de auxinas). Pode pensar-se que a higromicina não provocou qualquer efeito nas raízes transgênicas visto que não actua ou interage com os genes *rol*. No entanto, a não proliferação de raízes transgênicas, nem o seu reverdecimento, ao contrário do que foi observado nas raízes controlo (*vide* 3.2.1.) pode levar a considerar que este antibiótico interage de alguma forma com o genótipo das raízes, cessando o seu crescimento. Por outro lado, sabe-se que os antibióticos e os herbicidas têm geralmente um efeito negativo na proliferação e diferenciação das células vegetais e podem retardar a regeneração de *shoots* adventícios (Cui *et al.* 2001). Este facto pode explicar a não proliferação de raízes transgênicas de levístico no meio MS/2 de regeneração com Higromicina B, ao contrário do que foi observado nas raízes transgênicas controlo.

Em ensaios de selecção, as células não resistentes à Higromicina B morrem quando são utilizadas concentrações entre 10 a 1000  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  [3]. No entanto, a sensibilidade das células é dependente do pH, sendo que quanto maior é o pH do meio, maior é a sensibilidade celular ao antibiótico [3]. No presente ensaio não se utilizaram concentrações desta ordem, o que pode explicar a permanência das raízes num mesmo estado fisiológico durante algum tempo, registando-se a oxidação de alguns segmentos nas últimas semanas de ensaio. A oxidação pode estar relacionada com o esgotamento de nutrientes no meio ou com o envelhecimento natural das raízes transgênicas. Pode concluir-se que as concentrações de Higromicina B utilizadas neste ensaio, não contribuíram para induzir a formação de *shoots* sendo provavelmente responsáveis pela inibição do crescimento das raízes transgênicas. Deve-se ter em conta que a Higromicina B não foi integrada no meio MS/2, mas sim colocada localmente sob meio sólido formando halos. Desta forma, as concentrações referidas são sempre concentrações aproximadas, visto que muito provavelmente existirão áreas em que a concentração é mais elevada (centro do halo) e áreas do halo onde as concentrações serão mais baixas, como na periferia.

As concentrações de Higromicina B utilizadas basearam-se no efeito registado pelas várias concentrações de *bialaphos*. Quando o *bialaphos* é adicionado ao meio de cultura numa concentração superior a 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$ , o crescimento das raízes é inibido (Hoshino e Mii 1998). No entanto, a adição de *bialaphos* a 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  tem uma influência menos negativa no crescimento das raízes e promove a regeneração de *shoots*. Depois de três meses de cultura, na presença de uma concentração de 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  de *bialaphos*, 56% de *hairy roots* de *Antirrhinum majus* L. originaram *shoots*. Hoshino e Mii (1998) explicam estes resultados através do mecanismo de acção do antibiótico *bialaphos*. A molécula de *bialaphos* é constituída por fosfonotricina e dois resíduos de L-alanina, sendo a fosfonotricina libertada pela degradação do *bialaphos*. A fosfonotricina inibe a enzima glutamina sintetase. Esta inibição resulta numa rápida acumulação de amónio que interrompe a cadeia de electrões dos cloroplastos e mitocôndrias, resultando na produção de

radicais livres e por fim na morte celular. Isto sugere que elevadas concentrações de *bialaphos* podem ser tóxicas e que a acumulação apropriada de amónia causada pelo tratamento com *bialaphos* pode actuar como um stress estimulador da regeneração de *shoots* a partir de raízes transgénicas, sem levar à morte celular. Visto que a utilização de concentrações correspondentes de Higromicina B não levaram à obtenção de resultados satisfatórios nas raízes transgénicas de *L. officinale*, sugere-se que o mecanismo de acção do antibiótico *bialaphos* é bastante importante na indução da capacidade de regeneração e que a Higromicina B, por possuir um mecanismo de acção diferente, não induz a formação de *shoots* adventícios.

### 3.1.2.2. Ácido salicílico

Este ensaio baseou-se nos resultados obtidos por Hao e colaboradores (2006), que tinham como objectivo determinar o efeito do ácido salicílico (SA) na embriogénese somática numa espécie de aveia (*Avena nuda*). Hao e colaboradores (2006) verificaram que a embriogénese e a regeneração de plantas a partir de *calli* originados de explantes de folhas foram induzidas por uma concentração de 0,5 mM de SA. Outros estudos já tinham registado que o desenvolvimento de embriões podia ser promovido pelo SA (Luo *et al.* 2001).

O ácido salicílico é uma importante molécula sinalizadora envolvida nas respostas de defesa a patógenos e stresses abióticos (Raskin 1992 em Hao *et al.* 2006). É conhecido como pertencente a um grupo de fenóis, bastante distribuído nas plantas e é considerado uma hormona, que desempenha um importante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento (Luo *et al.* 2001).

No presente ensaio, não se observou proliferação de raízes transgénicas de *L. officinale*, o seu reverdecimento, formação de tecido caloso ou de *shoots*. Visto que se utilizou a mesma concentração de SA que a utilizada no ensaio realizado por Hao e a sua equipa (2006), pode pensar-se que o SA não possui o mesmo efeito nas raízes transgénicas que em *calli*. O efeito de SA nas raízes transgénicas na formação de tecido caloso e de *shoots* pode considerar-se nulo. Assim como para o ensaio com Higromicina B, deve ter-se em conta que o SA não foi integrado no meio MS/2, mas sim colocado localmente sob meio sólido formando halos. Desta forma, as concentrações referidas são sempre concentrações aproximadas, visto que muito provavelmente existirão áreas em que a concentração é mais elevada (centro do halo) e áreas do halo onde as concentrações serão mais baixas, como na periferia.

Visto que nas raízes transgénicas controlo houve a formação de algum tecido caloso, poderia ter-se realizado uma subcultura e suplementado o meio com SA, com o objectivo de verificar o efeito de SA nos *calli* formados a partir de raízes transgénicas. A não proliferação de raízes transgénicas, ao contrário do que se registou nas raízes controlo é estranha, visto que o SA é um regulador de crescimento. Em culturas de raízes transgénicas de *Chicorium intybus* houve um aumento da biomassa de raízes quando o meio foi suplementado com SA, numa concentração de 100 µM e verificou-se que a fase exponencial relativa ao crescimento das culturas em meio MS

liquido ocorreu mais cedo (Malarz *et al.* 2007). Caules cortados de algumas plantas ornamentais, tratados com SA exibiram uma elevada taxa de diferenciação de raízes (Singh *et al.* 1993). Pelo contrário, Pancheva e a sua equipa (1996) observaram uma inibição do crescimento das folhas e raízes de germinantes de cevada (Hayat *et al.* 2007). Verifica-se assim que o efeito regulador do SA não é consensual, podendo diferir de espécie para espécie e podendo estar relacionado, nas raízes transgênicas, com a sensibilidade destas para as fitohormonas.

Pode colocar-se a hipótese de que as concentrações utilizadas para os *calli* na formação de embriões somáticos não sejam adequadas para estimular a regeneração de *shoots* a partir das raízes transgênicas. No entanto, se esta condição se verificar, a concentração óptima estará abaixo de 0,3 mM visto que as concentrações utilizadas podem ter sido tóxicas, inibindo o crescimento das raízes transgênicas e não permitindo o seu reverdecimento.

### 3.1.2.3. Radiação UV

Neste ensaio, em que se sujeitaram as raízes transgênicas, mantidas em meio MS/2 sem reguladores de crescimento, a vários períodos de radiação UV, figura 3.1, não se registou a formação de *shoots* e observou-se a proliferação de raízes e de algum tecido caloso como se verificou nas raízes transgênicas controlo. Pode concluir-se que a radiação UV não teve qualquer efeito nas raízes transgênicas de *L. officinale*, visto que não ocorreram diferenças de crescimento de raízes e de formação de tecido caloso entre os vários períodos de radiação a que as raízes foram expostas.

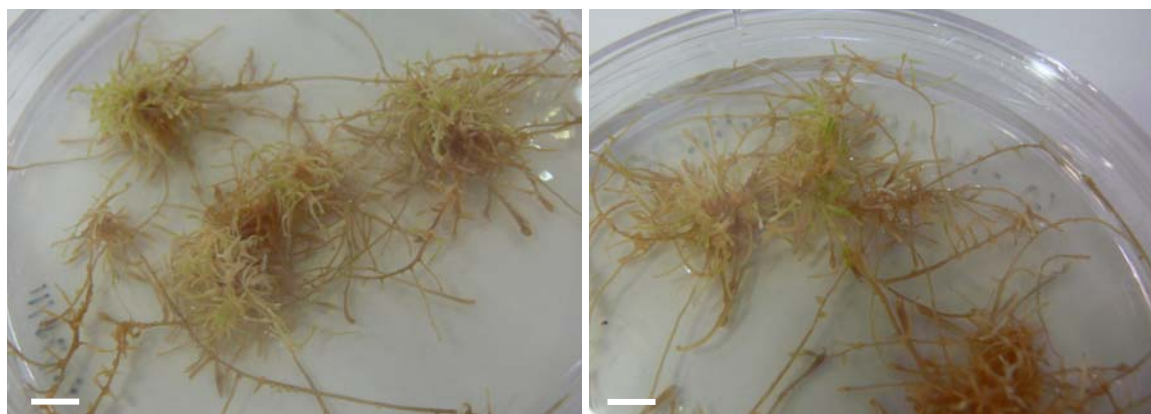


Figura 3.1. Aspecto das raízes transgênicas de *L. officinale* mantidas em meio MS/2, durante 90 dias, sem reguladores de crescimento, após exposição à radiação UV (barra = 1 cm).

Não se encontraram registos acerca da luz UV como indutor da regeneração a partir de raízes transgênicas. No entanto, alguns estudos revelam o efeito indutor da luz e de diferentes tipos de luz (diferentes comprimentos de onda) na regeneração, e que esta depende de planta para planta. Saitou e colaboradores (1992) verificaram que a formação de *shoots* a partir de *hairy roots* de rábano era induzida por luz branca e luz vermelha, mas que não havia formação de

*shoots* quando as raízes eram expostas a luz na banda do vermelho-longínquo. Este estudo indica que os fitocromos estão envolvidos na formação de *shoots* a partir de raízes transgênicas. Noutros casos, como em tabaco, a formação de *shoots* adventícios é estimulada por luz azul e inibida por luz vermelha. No entanto, a luz vermelha estimulou a formação de *shoots* em raízes transgênicas de *Pseudotsuga menziesii* (Saitou *et al.* 1992).

### 3.2. Biotransformação

#### 3.2.1. Análise Morfológica

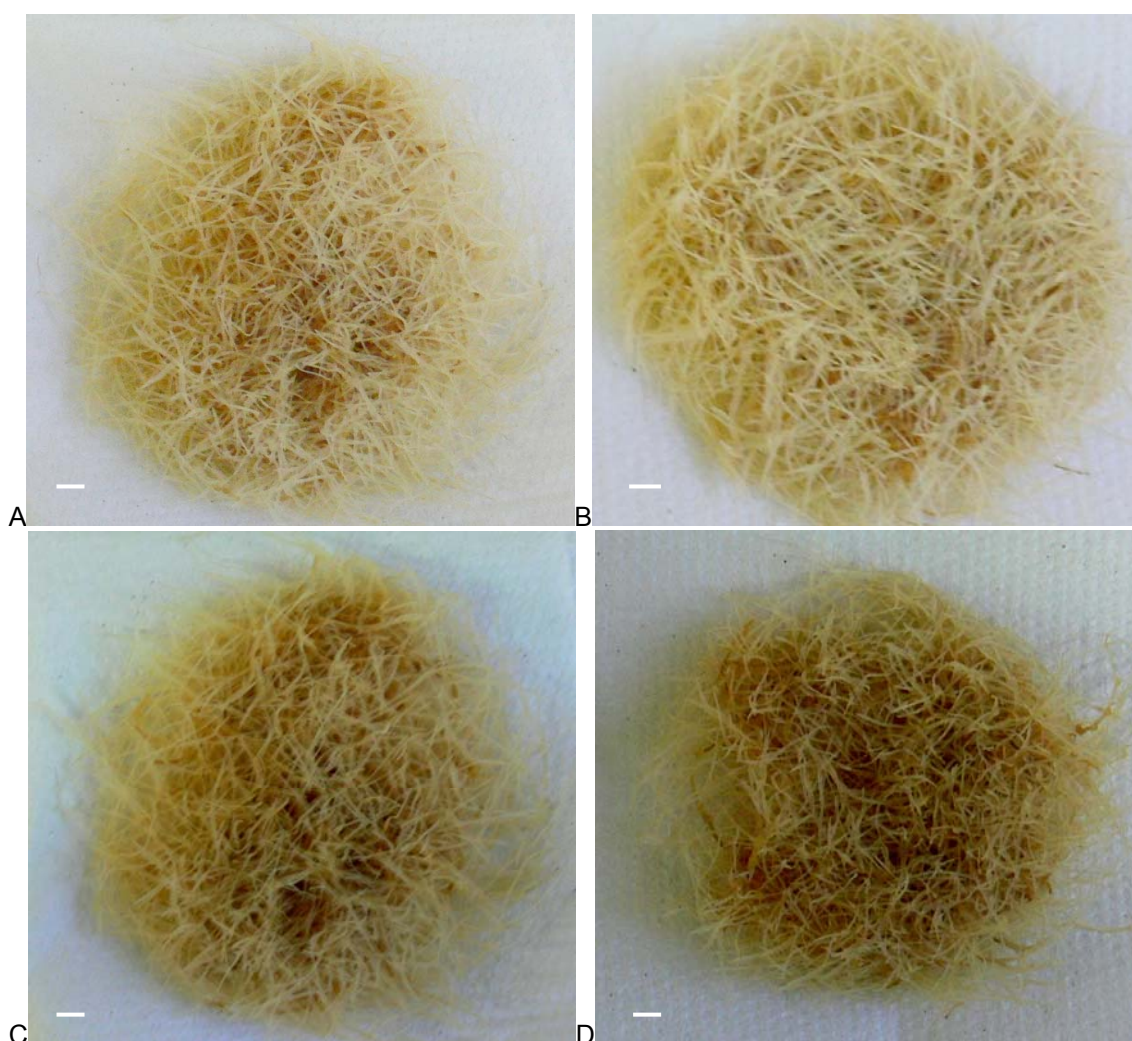


Figura 3.2. Aspecto macroscópico das raízes transgênicas de *L. officinale* mantidas em meio SH, em escuridão permanente, com quatro semanas de crescimento. A e C – raízes transgênicas controlo. B – raízes transgênicas após a adição de mentol. D – raízes transgênicas após a adição de geraniol. (barra=1 cm)

A análise morfológica das raízes transgênicas de levístico, controlo e suplementadas com os dois substratos, foi realizada ao longo do período de crescimento. As observações foram

realizadas todas as semanas aquando da medição dos pesos frescos. Não foram observadas diferenças morfológicas entre as raízes transgênicas controlo e as raízes transgênicas crescidas no meio de cultura suplementado com qualquer dos substratos, mentol ou geraniol, Fig 3.2. As raízes com mais tempo em cultura, cerca de 80 dias apresentavam uma cor mais acastanhada, devido ao envelhecimento acompanhado de oxidação.

### 3.2.2. Caracterização do crescimento das raízes transgênicas

O crescimento das culturas mantidas, em condições de escuridão permanente, em meio de cultura SH (Schenk & Hildebrandt 1972) e em meio SH ao qual foi adicionado o substrato mentol, ao fim de 15 dias, numa concentração de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  foi avaliado por determinação da: a) variação do peso fresco e peso seco ao longo de 7 semanas; b) desassimilação das culturas mantidas num volume de 100 ml de meio ao longo de 50 dias e desassimilação das culturas mantidas num volume de 50 ml de meio, ao longo de 94 dias.

Relativamente ao ensaio com o substrato geraniol, adicionado numa concentração de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$ , o crescimento das raízes transgênicas foi analisado por determinação da variação do peso fresco e seco ao longo de 7 semanas e da desassimilação das culturas mantidas em 50 ml de meio de cultura ao longo de 94 dias.

#### 3.2.2.1. Peso fresco e peso seco

##### 3.2.2.1.1. Mentol

Num primeiro ensaio de biotransformação com o substrato mentol, utilizou-se um volume de 100 ml de meio SH e 1 g de p.f. de raízes transgênicas. A análise do gráfico relativo à variação do peso fresco e peso seco não indicou diferenças significativas entre o crescimento das raízes controlo e das raízes sujeitas à presença de mentol, Fig 3.3 a. Uma semana após a adição do substrato o peso fresco das raízes transgênicas controlo foi de 8 g e das raízes transgênicas com substrato de 7 g, enquanto que o peso seco foi de 533 mg e 538 mg respectivamente. Duas semanas após a administração do substrato, parece ter havido um aumento da biomassa das raízes transgênicas suplementadas com mentol, sendo o seu peso seco de 956 mg, e o peso relativo às raízes transgênicas controlo de 768 mg. No entanto, passada uma semana verificou-se que os valores relativos ao peso seco eram muito próximos, tendo uma diferença mínima de 70 mg. A diferença entre os pesos secos das raízes transgênicas, registada na segunda semana após a colocação do substrato, pode ter estado relacionada com o tipo de fragmentos de raízes utilizados nesta análise. Estes fragmentos, mesmo pertencendo ao mesmo inóculo, poderiam encontrar-se em fases diferentes de desenvolvimento. Se o inóculo de raízes transgênicas contivesse uma maior percentagem de raízes jovens, estas teriam maior capacidade de crescimento, o que se pode ter reflectido no maior peso seco determinado ao fim de duas semanas após adição do mentol. Contudo, esse acréscimo de peso pode ter-se atenuado com o tempo, como consequência de um esgotamento dos nutrientes do meio. Com efeito, no final do

ensaio observou-se que os valores de peso fresco relativos às raízes transgênicas com e sem substrato eram bastante próximos. Em relação ao peso seco, as raízes transgênicas controlo atingiram os 1238 mg enquanto que as sujeitas à adição do mentol, 1419 mg.

Em relação ao ensaio em que se utilizou 50 ml de meio de cultura SH, observou-se que as raízes transgênicas controlo tiveram um crescimento regular, registando-se uma diminuição da biomassa na última semana. Em relação às raízes transgênicas sujeitas à presença de mentol os pesos frescos e secos registados após uma semana da adição do substrato foram muito semelhantes aos valores registados para as raízes transgênicas controlo. Após duas semanas da adição do substrato houve um aumento elevado da biomassa das raízes transgênicas, sendo o seu peso fresco de 7 g, enquanto que o peso fresco das raízes controlo não ultrapassou os 4 g. Esta diferença também foi verificada na análise do peso seco. Após uma semana, no entanto, observou-se que os pesos secos dos dois tratamentos eram semelhantes. Na quarta semana após a adição do mentol verificou-se uma diminuição do peso das raízes transgênicas sujeitas a este substrato. No final da análise registou-se que os pesos frescos e secos dos dois tratamentos eram semelhantes.

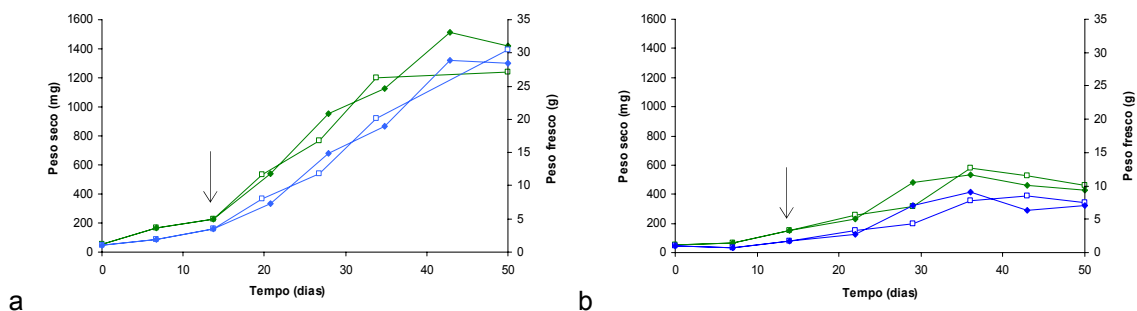


Figura 3.3. Avaliação do crescimento das raízes transgênicas mantidas num volume de 100 ml (a) e 50 ml (b) de meio SH controlo e suplementado com mentol ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ), pela determinação do peso fresco ( $\blacklozenge$  - mentol;  $\square$  - controlo) e peso seco ( $\blacklozenge$  - mentol;  $\square$  - controlo), ( $\rightarrow$  - momento da adição do substrato).

Em relação aos dois volumes de meio utilizados, verificou-se que tanto num como noutro caso não existem grandes diferenças entre o aumento da biomassa das raízes transgênicas controlo e das raízes transgênicas sujeitas ao substrato. O decréscimo dos pesos frescos e secos na sétima semana pode estar relacionado com o começo da fase estacionária das raízes.

Entre os dois ensaios, observou-se que as raízes transgênicas em cultura num volume de 100 ml atingiram valores de peso fresco e seco mais elevados que as culturas em 50 ml de meio SH. Este facto pode estar relacionado com o inóculo utilizado, ou simplesmente com uma maior quantidade e disponibilidade de nutrientes.

### 3.2.2.1.2. Geraniol

Relativamente ao ensaio de biotransformação com o álcool monoterpénico geraniol, os

pesos frescos e secos das raízes transgênicas controlo apresentaram um aumento regular, verificando-se um decréscimo destes valores na última semana, Fig. 3.4. Em relação às raízes transgênicas sujeitas à presença do substrato geraniol, numa concentração de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$ , observou-se que a sua biomassa aumentou ao longo do ensaio. Uma semana após a adição do geraniol, as raízes controlo apresentam um peso fresco de 3 g enquanto que as raízes transgênicas às quais se adicionou substrato registaram um peso fresco de 2 g. No entanto, esta diferença de peso não parece ser relevante visto que na semana seguinte os pesos frescos dos dois tipos de raízes são praticamente iguais. Na terceira semana após a adição do substrato parece ter ocorrido um aumento da biomassa das raízes transgênicas controlo em relação às raízes transgênicas sujeitas ao substrato, mas na semana seguinte houve novamente uma aproximação visível dos valores. No final do ensaio o peso fresco e seco é mais elevado para as raízes sujeitas ao geraniol, sendo de 10 g e 629 mg respectivamente, enquanto que as raízes transgênicas controlo apresentam valores da ordem de 7 g e 463 mg. Não se pode considerar esta diferença expressiva visto que as duas curvas apresentam oscilações ao longo do ensaio, registando-se valores muito próximos entre si em algumas semanas após a adição do substrato assim como valores mais afastados.

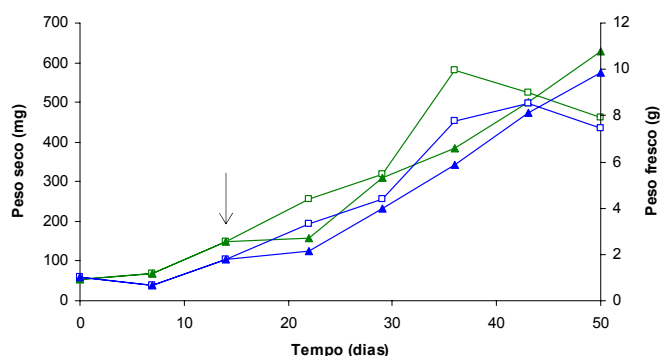


Figura 3.4. Avaliação do crescimento das raízes transgênicas mantidas num volume de 50ml de meio SH controlo e suplementado com geraniol ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ), pela determinação do peso fresco (▲ - geraniol; □ - controlo) e peso seco (▲ - geraniol; □ - controlo), (→ - momento da adição do substrato).

Tem de se ter em conta que os resultados obtidos através deste tipo de análise do crescimento são influenciados por vários factores. Os pesos frescos e secos obtidos para cada semana correspondem a uma média de valores de diferentes fragmentos de raízes transgênicas, que embora pertençam ao mesmo inóculo se podem encontrar em fases de desenvolvimento distintas. As condições de inoculação das raízes transgênicas nos Erlenmeyers também podem influenciar o seu crescimento, visto que durante este processo estas podem sofrer algum tipo de stress prejudicial para as suas estruturas. Visto que se utilizou um grande número de Erlenmeyers, algumas raízes permaneceram durante algum tempo fora do meio de cultura, o que poderá ter contribuído para a desidratação de algumas partes do inóculo, inviabilizando algumas células.

Esta análise não se mostrou conclusiva relativamente à influência dos dois substratos no

modo de crescimento das raízes transgênicas, visto que existiram muitas oscilações de valores entre os tratamentos. Mas porque não se verificaram diferenças muito elevadas entre os pesos frescos e secos das raízes transgênicas controlo e das raízes transgênicas ensaiadas, pode concluir-se que provavelmente estes monoterpênicos não influenciaram o crescimento das raízes transgênicas de levístico, o que está de acordo com a análise morfológica destas culturas.

### 3.2.2.2. Curvas de desassimilação

#### 3.2.2.2.1. Mentol

Em relação à análise do crescimento das raízes transgênicas a partir do método da desassimilação, verificou-se que no primeiro ensaio realizado com substrato mentol num volume de 100 ml de meio SH, as curvas de desassimilação respectivas ao controlo e à avaliação do efeito do substrato são muito semelhantes, Fig. 3.5. Há uma sobreposição das curvas aproximadamente até ao vigésimo dia de ensaio, seguida de um aumento da desassimilação por parte das raízes transgênicas controlo. A partir deste momento poderia considerar-se que as raízes transgênicas sujeitas ao ensaio com substrato apresentavam menores taxas de desassimilação, no entanto, as diferenças entre os valores de uma e outra curva não são relevantes, nunca atingindo os  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . O padrão da curva de crescimento é idêntico ao das raízes controlo, tendo as duas um traçado característico das curvas de desassimilação registadas anteriormente em meio SH, para a mesma espécie (Santos *et al.* 2005). Visto que o ensaio terminou ao fim de cinquenta dias, não foi visível uma nítida fase estacionária, ainda que se observe uma desaceleração de crescimento das raízes transgênicas.

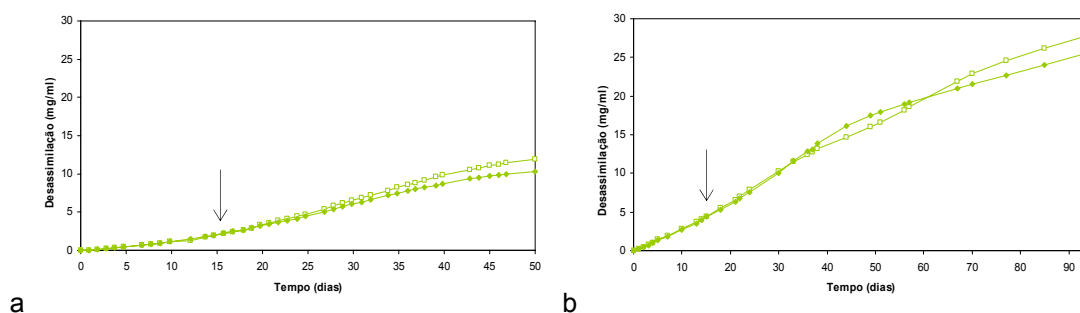


Figura 3.5. Determinação do crescimento pelo método de desassimilação de raízes transgênicas controlo ( $\square$  - controlo) e raízes transgênicas sujeitas à presença de mentol ( $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ( $\blacklozenge$  - mentol) em 100 ml (a) e 50 ml (b) de meio SH, ( $\rightarrow$  - momento da adição do substrato).

O padrão de crescimento das culturas controlo mantidas num volume de 50 ml de meio revelou-se sobreponível ao das culturas às quais se administrou mentol, até perto do quadragésimo dia de ensaio, correspondendo a um período de mais de duas semanas após a adição do substrato. A partir desse momento pareceu haver um aumento da desassimilação das raízes transgênicas sujeitas ao ensaio, no entanto, as diferenças não são acentuadas. A comparação das curvas de crescimento obtidas para um volume de 50 ml de meio, com as curvas

de desassimilação obtidas num volume de 100 ml de meio, revelou que ao longo de 50 dias as curvas apresentavam valores de desassimilação muito próximos.

Concluiu-se que a adição de mentol não influenciou a taxa de desassimilação das raízes transgênicas de levístico, e que as diferenças mínimas registadas entre as raízes controlo e aquelas a que se adicionou o substrato podem estar relacionadas com o estado de desenvolvimento em que se encontravam os fragmentos de raízes utilizados como inoculo.

#### 3.2.2.2. Geraniol

Comparativamente com as culturas controlo, as culturas às quais se adicionou geraniol mostraram um padrão de desassimilação semelhante até aproximadamente o sexagésimo dia, Fig. 3.6. A partir deste momento as curvas divergiram havendo uma diminuição da taxa de desassimilação por parte das raízes transgênicas sujeitas à presença do substrato. No entanto, não se pode considerar que esta diferença seja relevante e não se pode concluir que esta ocorra devido ao efeito do substrato, principalmente porque esta divergência surge passados aproximadamente 45 dias após a adição do geraniol às culturas. Este acontecimento pode estar relacionado com o estado de desenvolvimento e fisiológico das raízes utilizadas. Algumas raízes transgênicas utilizadas no ensaio com geraniol poderiam ter entrado na sua fase estacionária e de morte celular mais cedo que as raízes utilizadas para a determinação da curva controlo.

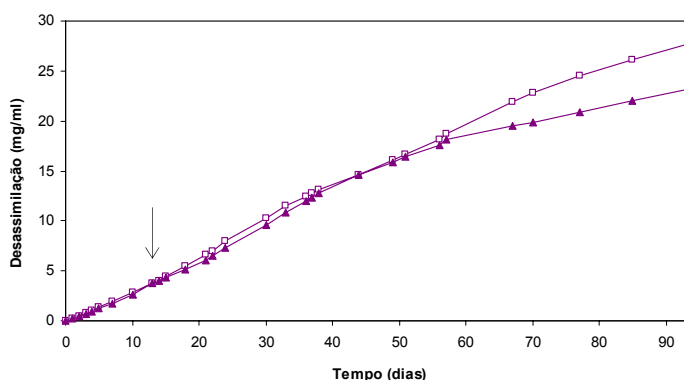


Figura 3.6. Determinação do crescimento pelo método de desassimilação de raízes transgênicas controlo (□ - controlo) e raízes transgênicas sujeitas à presença de geraniol ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ) (▲ - mentol) (→ - momento da adição do substrato).

### 3.2.3. Análise da componente volátil

#### 3.2.3.1. Composição constitutiva

A composição volátil constitutiva, produzida em condições controlo, das raízes transgênicas de *L. officinale*, ao longo de 7 semanas, sob escuridão permanente, num volume de 100 ml de meio de cultura SH foi dominada pelo grupo dos poliacetilenos (16-49%), ácidos gordos

## Resultados e Discussão

(5–14%), ftálicos (6-27%), e por um grupo denominado por “outros” (15–33%). Este último grupo inclui todos os compostos que não pertencem à família dos ftálicos, terpenos, poliacetilenos, fenilpropanóides e ácidos gordos. No total dos compostos voláteis isolados num período de 7 semanas identificaram-se 35 componentes, Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição percentual volátil das raízes transgênicas de *Levisticum officinale* ao longo de 7 semanas, mantidas em escuridão permanente a 24°C e 80 r.p.m. num volume de 100 ml de meio SH.

Compostos	IR	Tempo (semanas)						
		1	2	3	4	5	6	7
Benzaldeído	927	0,1	0,6	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2
$\alpha$ -Pino	930	0,1	0,4	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2
<i>n</i> -Heptanol	952	0,1	0,2	0,1	0,3	0,5	0,3	0,3
$\beta$ -Pino	963	0,1	0,5	0,4	0,6	0,5	0,2	0,2
2-Octanona	967	0,2	0,7	0,4	0,5	0,1	0,2	0,2
2-Pentilfurano	973	v	v	v	v	v	v	0
<i>n</i> -Octanal	973	5,1	11,8	8,5	10,2	5,8	5,1	5,3
Benzeno acetaldeído	1002	0,2	0,2	0,2	0,3	0,8	0,5	0,5
<i>p</i> -Cimeno	1003	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2
$\beta$ -Felandreno	1005	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2
Limoneno	1009	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1
<i>n</i> -Octanol	1045	0,1	0,7	0,3	1,1	0,3	0,3	0,3
2-Nonanona	1058	0,4	1,0	0,4	0,1	0,3	0,3	0,3
<i>n</i> -Nonanal	1073	0,8	1,0	0,8	1,4	0,6	0,7	0,6
<i>trans</i> -Vertocitral c*	1077	0,5	1,3	0,8	0,9	0,7	0,5	0,6
2- <i>trans</i> -Nonen-1-al	1114	2,2	2,2	1,4	1,4	0,8	0,3	0,6
Pentil Benzeno	1119	3,9	3,0	2,8	3,0	1,9	2,8	2,5
Pentil ciclo hexadieno	1125	1,2	2,5	2,8	4,8	3,1	1,9	1,7
2- <i>trans</i> ,4- <i>trans</i> Nonadienal	1184	0,1	2,5	1,1	2,0	v	0,7	0,4
<i>n</i> -Dodecano	1200	0,5	1,0	0,1	v	v	0,1	0,2
2- <i>trans</i> -Decenal	1224	3,2	2,5	1,8	0,5	0,9	0,7	0,6
Carvacrol	1286	1,0	3,2	0,5	v	v	0,3	1
<i>trans</i> -4-Undecenal	1402	2,8	2,2	2,3	0,5	0,9	0,9	1,1
$\gamma$ -Decalactona	1430	1,4	0,4	0,4	0,5	1,0	1,1	0,8
$\gamma$ -Elemeno*	1430	0,1	0,9	0,5	v	v	0,3	0,5
<i>cis</i> - $\beta$ -Farneseno*	1476	v	v	0,2	0,5	2,9	1,4	1,5
Germacreno B *	1533	6,9	2,9	3,2	2,0	4,5	4,5	4
3- <i>n</i> -Butilftálico*	1591	v	0,1	v	v	v	v	0,2
3- <i>cis</i> -Butilideno ftálico	1615	7,3	2,1	2,7	2,9	1,1	1,4	1,4
3- <i>trans</i> -Butilideno ftálico	1655	1,5	1,9	2,4	3,7	1,7	1,3	1,3
Z-Ligustilido	1660	14,6	4,0	9,7	15,1	10,4	2,6	2,5
E-Ligustilido	1669	3,4	3,6	1,4	2,1	v	0,8	1,0
NI	1835	2,4	1,3	2,4	1,5	2,6	3,2	3,5
Ácido hexadecanóico (palmítico)	1908	9,2	6,6	9,4	4,9	5,3	3,7	3,9
Z-Falcarinol	2002	16,0	20,1	22,7	20,3	43,8	49,0	47,7
Ácido linoléico	2125	4,8	3,1	3,7	6,7	3,3	1,1	1,5
<b>% de Identificação</b>		<b>88,4</b>	<b>83,6</b>	<b>82,0</b>	<b>87,6</b>	<b>92,4</b>	<b>83,5</b>	<b>83,6</b>
<b>Compostos agrupados</b>								
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,8	1,3	1,1	1,8	1,5	0,6	0,9
Monoterpenos oxigenados		2,4	3,6	0,9	0,5	1,0	1,4	1,8
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		7,0	3,8	3,9	2,5	7,4	6,2	6,0
Poliacetilenos		16,0	20,1	22,7	20,3	43,8	49,0	47,7
Ftálicos		26,8	11,7	16,2	23,8	13,2	6,1	6,4
Ácidos gordos		14,0	9,7	13,1	11,6	8,6	4,8	5,4
Outros		21,4	33,4	24,1	27,3	17,0	15,4	15,4

IR: Índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>22</sub> num coluna DB-1. v: vestigial (<0,1%).  
NI - não identificado \*Compostos identificados apenas com base no espectro de massa.

Resultados e Discussão

Tabela 3.2. Composição percentual volátil das raízes transgênicas de *Levisticum officinale* ao longo de 7 Semanas, mantidas em escuridão permanente a 24°C e 80 r.p.m. num volume de 50 ml de meio SH.

Compostos	IR	Tempo (semanas)						
		1	2	3	4	5	6	7
Benzaldeído	927	0,7	0,7	0,6	1,1	0,4	0,2	0,1
α-Pineno	930	0,6	0,7	0,6	1,2	0,3	0,2	0,2
<i>n</i> -Heptanol	952	0,6	3,6	0,2	1,2	0,2	0,3	0,1
β-Pineno	963	0,4	2,3	0,5	1,1	0,3	v	0,1
2-Octanona	967	0,5	0,0	0,3	1,1	0,2	0,5	0,4
2-Pentilfurano	973	v	0,0	v	v	v	v	v
<i>n</i> -Octanal	973	7,6	6,4	5,9	6,2	3,2	3,7	4,3
Decano	1000	v	v	0,2	v	0,1	v	v
1-deceno	1011	v	v	0,2	2,5	0,5	0,2	0,3
Benzeno acetaldeído	1002	0,1	2,3	0,2	0,6	0,2	0,1	0,1
<i>p</i> -Cimeno	1003	0,1	2,4	0,2	0,6	0,1	0,1	0,1
β-Felandreno	1005	0,1	1,8	0,2	0,6	0,1	0,1	0,1
Limoneno	1009	0,1	1,8	0,2	0,6	0,1	0,1	0,1
<i>n</i> -Octanol	1045	1,3	v	0,6	2,4	0,4	0,5	v
2-metil decano	1058	v	v	v	v	v	v	0,5
2-Nonanona	1058	1,3	0,9	0,8	1,3	0,3	0,6	0,4
<i>n</i> -Nonanal	1073	1,1	0,4	0,9	2,0	0,5	0,5	0,5
<i>trans</i> -Vertocitral c*	1077	0,4	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
Undecano	1100	0,0	0,2	v	0,2	0,1	0,0	0,3
2- <i>trans</i> -Nonen-1-al	1114	1,6	0,6	1,2	1,6	0,6	0,7	0,6
Pentil Benzeno	1119	1,5	2,6	1,1	0,8	0,8	0,7	1,8
Pentil ciclo hexadieno	1125	0,8	2,3	2,0	4,5	1,1	0,6	4,8
Naftaleno	1139	0,0	0	v	v	v	v	v
<i>n</i> -decenal	1180	0,0	0,1	v	v	0,1	v	v
2- <i>trans</i> ,4- <i>trans</i> Nonadienal	1184	0,9	0,3	1,6	1,3	0,2	0,6	v
<i>n</i> -Dodecano	1200	1,1	1,2	0,6	0,8	0,1	0,5	0,3
2- <i>trans</i> -Decenal	1224	2,0	1,9	1,8	1,6	0,6	0,9	0,7
Carvacrol	1286	0,0	2,8	0,8	0,9	0,3	0,7	0,6
<i>trans</i> -4-Undecenal	1402	3,4	3,6	2,4	2,0	0,8	1,7	0,8
γ-Decalactona	1430	v	0,3	1,8	0,9	0,5	0,9	1,2
γ-Elemento*	1430	v	0,3	1,8	1,1	0,5	0,5	0,8
<i>cis</i> -β-Farneseno*	1476	1,5	0,5	0,0	0,1	0,6	0,8	1,1
Germacreno B *	1533	4,8	2,8	4,4	3,7	3,2	3,0	0,5
3- <i>n</i> -Butilftálico*	1591	v	v	v	0,6	0,3	0,2	7,1
3- <i>cis</i> -Butilideno ftálico	1615	6,8	5,8	2,5	1,2	1,8	3,0	0,7
3- <i>trans</i> -Butilideno ftálico	1655	4,4	2,9	2,8	1,3	2,2	1,7	3,6
Z-Ligustilido	1660	8,9	8,0	7,3	5,4	6,3	3,8	2,4
E-Ligustilido	1669	6,7	1,0	2,5	0,8	1,7	1,6	6,6
NI	1835	4,2	3,9	1,1	1,7	2,0	1,4	1,8
Ácido hexadecanóico (palmítico)	1908	9,0	10,1	5,1	5,0	7,2	8,5	2,6
Z-Falcarinol	2002	1,8	1,4	25,2	22,2	44,9	15,1	7,8
Ácido linoléico	2125	2,5	2,4	3,1	2,3	4,5	2,0	18,2
<b>% de Identificação</b>		<b>72,8</b>	<b>75,1</b>	<b>79,7</b>	<b>80,8</b>	<b>85,8</b>	<b>54,8</b>	<b>70,3</b>
<b>Compostos agrupados</b>								
Hidrocarbonetos monoterpênicos		1,3	7,2	1,5	3,4	0,9	0,4	0,6
Monoterpenos oxigenados		0,0	3,1	2,6	1,8	0,8	1,6	1,8
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		6,4	3,6	6,2	4,9	4,4	4,3	2,4
Poliacetilenos		1,8	1,4	25,2	22,2	44,9	15,1	7,8
Ftálicos		26,7	17,6	15,1	9,2	12,3	10,3	20,4
Ácidos gordos		11,5	12,5	8,1	7,3	11,7	10,5	20,9
Outros		23,0	24,3	19,9	27,7	10,1	11,8	16,3

IR: Índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>22</sub> num coluna DB-1. v: vestigial (<0,1%). NI - não identificado \*Compostos identificados apenas com base no espectro de massa.

A composição volátil constitutiva das raízes transgênicas em cultura num volume de 50 ml de meio SH foi dominada pelos mesmos grupos de compostos: poliacetilenos (2-45%), ftálicos (9-27%), ácidos gordos (7-21%) e “outros” (10-28%). Neste caso foram identificados 41

componentes voláteis, Tabela 3.2. As percentagens de identificação foram mais elevadas para as raízes transgênicas em cultura em 100 ml de meio SH, variando entre os 82% e os 92%. As percentagens de identificação para as culturas em 50 ml de meio de cultura variaram entre os 55% e os 86%. As menores percentagens de identificação registaram-se nas duas últimas semanas deste ensaio e podem estar relacionadas com um aumento da concentração percentual de ácidos gordos não identificados. Para além destes compostos, registou-se a presença de dois compostos voláteis não identificados, um deles foi mencionado anteriormente por Costa (2005) em raízes transgênicas de *L. officinale* e encontra-se registado nas Tabelas 3.1 e 3.2 pela abreviatura N1a (não identificado a) e representado na Fig. 3.7. O espectro de massa do outro composto não identificado (N1b) encontra-se representado na Fig. 3.8.

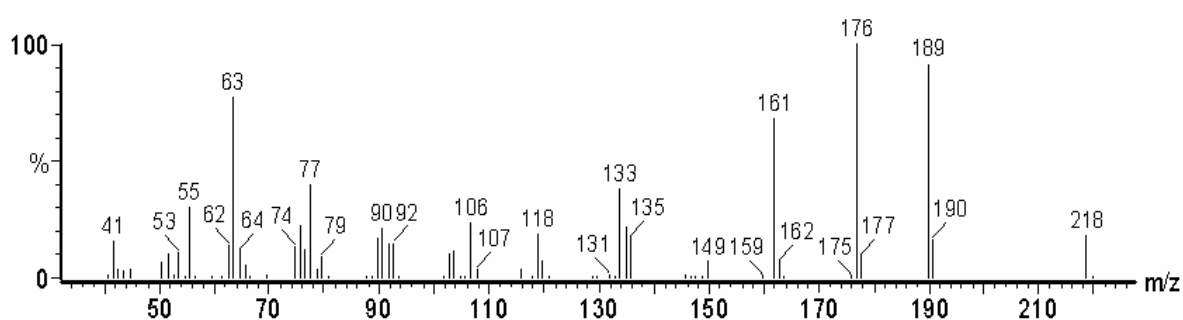


Figura 3.7. Espectro de massa do composto não identificado, N1a, existente no óleo das raízes transgênicas de *L. officinale*.

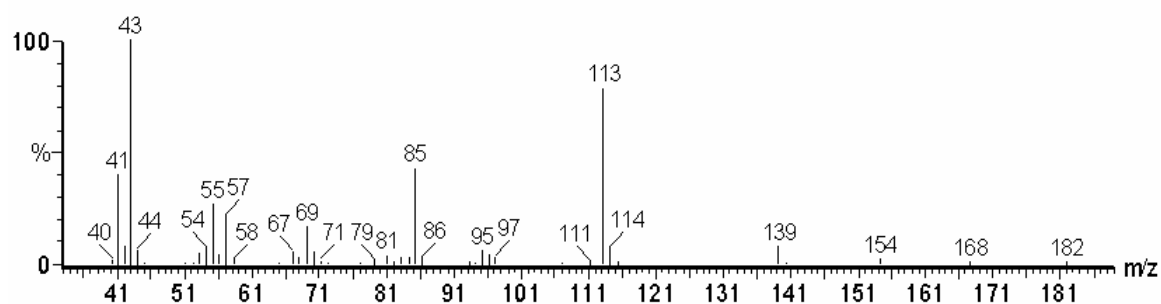


Figura 3.8. Espectro de massa de um composto não identificado, N1b, existente no óleo das raízes transgênicas de *L. officinale*.

Os compostos voláteis *n*-Octanal, Z-Ligustilido, Z-Falcarinol e o ácido hexadecanóico foram os componentes constitutivos maioritários (numa percentagem relativa  $\geq 5\%$ ) isolados das raízes transgênicas em cultura nos dois volumes de meio. A grande percentagem de poliacetilenos deveu-se essencialmente à elevada percentagem relativa de Z-Falcarinol ao longo do ensaio relativamente aos outros compostos. Este composto não costuma ser encontrado como fazendo parte da constituição do óleo essencial das raízes de levístico (Santos *et al.* 2005). Esta produção pode ser resultado de um mecanismo de defesa das raízes transgênicas ao *stress* provocado pelas condições *in vitro* (Flores *et al.* 1999). Uma capacidade biossintética estável por parte das

raízes transgênicas pode levar à produção deste composto útil, conhecido como sendo anticancerígeno. Os ftálicos parecem ser os componentes típicos do óleo essencial de todas as partes da planta, responsáveis pelo aroma característico do levístico (Szebeni-Galambosi *et al.* 1992) sendo esta a razão pela qual se registou uma grande percentagem destes compostos nas raízes transgênicas e essencialmente de Z-ligustilido.

Ao longo do tempo de estudo, não se verificaram alterações qualitativas na composição volátil constitutiva das raízes transgênicas. A nível quantitativo registaram-se algumas variações nas percentagens relativas dos componentes maioritários ao longo do ciclo de crescimento. Santos e colaboradores (2005) registaram que o composto Z-Falcarinol sofria um aumento durante o ciclo de crescimento, o que se verificou no presente trabalho para as raízes transgênicas em cultura num volume de 100 ml.

A fase de crescimento ou a taxa de crescimento são factores que podem influenciar a variação de concentração de um composto durante o ciclo de crescimento, uma vez que a produção de metabolitos secundários pode ser reduzida devido a uma maior produção de compostos essenciais ao crescimento e diferenciação celulares (Santos *et al.* 2005). Ao mesmo tempo, como a percentagem dos compostos voláteis determinada é relativa, não é possível analisar de modo rigoroso o aumento ou diminuição da concentração de um determinado composto e se esta variação se deve ao seu valor real absoluto ou ao decréscimo ou aumento da concentração percentual relativa de outros componentes.

### **3.2.3.2. Composição volátil das raízes transgênicas sujeitas ao ensaio de biotransformação**

#### **3.2.3.2.1 Mentol**

O mentol (*l*-mentol) é um composto monoterpénico oxigenado, possui um agradável odor e sabor e é utilizado na alimentação, cosmética e na preparação de fármacos orais (Miyazawa *et al.* 1999). Este composto volátil, utilizado como substrato de biotransformação no presente trabalho, não é só o componente maioritário dos óleos de menta, mas pode ser também sintetizado a partir de *d*-citronelal, timol e mirceno (Miyazawa *et al.* 2003). A molécula de mentol compreende 4 pares de isómeros ópticos: (±) – mentol, (±) – isomentol, (±) – neomentol e (±) – neo-isomentol. Dos oito isómeros ópticos activos, só o (-) – mentol possui as características odoríferas e exerce a sensação única de frescura/frio na pele e nas membranas mucosas (Trasarti *et al.* 2004).

Na análise realizada relativa ao efeito da adição do substrato mentol na composição de voláteis das raízes transgênicas de *L. officinale* registou-se que após a adição de mentol não se observou a formação de nenhum produto volátil novo resultante da biotransformação, Tabela 3.3 e Tabela 3.4. Para o primeiro ensaio, realizado num volume de 100 ml, nas primeiras 48h após a aplicação deste substrato, a percentagem relativa de mentol variou entre os 60 e os 80%, havendo um ligeiro decréscimo do primeiro para o segundo dia. Uma semana (168 h) depois da adição de substrato, ocorreu uma diminuição mais acentuada, passando para cerca de metade a quantidade

## Resultados e Discussão

percentual do mentol na composição volátil das raízes. Da primeira para a segunda semana (336h) após a aplicação do substrato, ocorreu um decréscimo de 33% para 5% na concentração relativa de mentol, Fig. 3.9. No ensaio realizado em 50 ml de meio, Fig. 3.9 a, a diminuição mais acentuada da quantidade de mentol registou-se durante a primeira semana (168 h) após a sua adição. Verificou-se também que a percentagem de mentol se manteve mais elevada nas últimas semanas para o ensaio em 50 ml de meio. No ensaio em 100 ml de meio, na quarta (672 h) e quinta semana (840 h) após a adição do substrato, verificou-se que o mentol era um componente praticamente vestigial, Fig. 3.9 b.

Tabela 3.3. Composição percentual volátil das raízes transgênicas de *Levisticum officinale* ao longo das primeiras 48 h e das 5 semanas após a adição do substrato mentol (25 mg.l<sup>-1</sup>), mantidas em escuridão permanente a 24°C e 80 r.p.m. num volume de 100 ml de meio SH.

Compostos	IR	Tempo (horas)						Tempo (semanas)				
		1	4	8	24	32	48	1	2	3	4	5
Benzaldeído	927	0,2	v	v	v	v	0,1	0,2	0,5	0,3	0,1	0,1
α-Pineno	930	0,4	v	v	v	v	0,2	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1
n-Heptanol	952	0,1	v	0,1	v	v	0,1	v	0,1	0,2	v	0,2
β-Pineno	963	0,2	v	v	v	v	0,2	0,1	0,6	0,4	0,2	0,2
2-Octanona	967	0,2	v	v	v	v	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1
2-Pentilfurano	973	v	v	v	v	0,3	v	v	v	v	v	v
n-Octanal	973	4,3	1,5	1,6	1,4	1	3,1	6	5,2	3,0	2,4	3,7
Benzeno acetaldeído	1002	0,1	v	v	v	v	v	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1
p-Cimeno	1003	0,1	v	v	v	v	v	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2
β-Felandreno	1005	0,1	v	v	v	v	v	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1
Limono	1009	0,1	v	v	v	v	v	0,1	0,2	0,2	v	0,1
n-Octanol	1045	0,5	v	0,2	v	v	0,1	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1
2-Nonanona	1058	0,5	0,2	0,1	v	v	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
n-Nonanal	1073	0,8	0,2	0,4	0,2	v	0,2	1,2	0,8	0,5	0,3	0,4
trans-Vertocitral c*	1077	0,3	0,2	0,1	v	v	0,4	0,1	0,2	v	0,4	0,2
2-trans-Nonen-1-al	1114	0,9	0,3	0,3	v	0,3	0,5	0,8	0,5	0,1	0,4	0,4
Pentil Benzeno	1119	0,9	0,5	0,5	0,4	0,5	1,1	0,3	2,7	1,6	1,8	2,4
Pentil ciclo hexadieno	1125	0,5	0,3	0,4	v	0,2	1,0	2,9	2,3	3,4	2,2	0,8
<b>Mentol</b>	<b>1148</b>	<b>70,2</b>	<b>66,1</b>	<b>71,5</b>	<b>82,4</b>	<b>79,6</b>	<b>72,6</b>	<b>33</b>	<b>4,8</b>	<b>1,0</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>
2-trans, 4-trans Nonadienal	1184	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	v	0,9	0,2	0,3	0,1	0,1
n-Dodecano	1200	0,1	v	0,1	0,2	v	v	0,3	0,3	v	0,2	0,4
2-trans-Decenal	1224	0,6	0,3	0,4	0,3	v	0,7	1,2	0,7	0,8	0,5	0,2
Carvacrol	1286	0,4	0,3	0,1	0,6	0,4	0,2	2,0	0,6	v	0,5	0,3
trans-4-Undecenal	1402	2,5	0,6	0,6	0,5	0,4	0,2	0,3	0,5	0,9	0,7	0,9
γ-Decalactona	1430	v	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	v	0,2	0,5	0,2	0,3
γ-Elemento*	1430	v	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	v	0,3	0,6	1,1	0,8
cis-β-Farneseno*	1476	v	0,4	0,4	0,4	0,1	0,1	0,2	0,3	3,6	0,9	0,3
Germacreno B *	1533	0,4	0,9	0,6	1,3	0,6	0,4	2,5	2,4	8,1	4,4	1,2
3-n-Butilftálico*	1591	v	v	0,1	v	v	0,1	v	v	v	0,2	0,2
3-cis-Butilideno ftálico	1615	1	1,1	0,5	0,4	0,5	0,3	0,2	1,2	0,6	1,1	1,3
3-trans-Butilideno ftálico	1655	1,3	0,9	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	2,3	0,9	1,5	2,1
Z-Ligustilido	1660	3,3	2,5	1,9	0,6	1,6	0,5	3,2	5,3	4,7	2,6	1,4
E-Ligustilido	1669	v	0,7	0,2	v	0,2	v	v	0,7	0,3	0,2	0,6
NI	1835	1	0,9	0,7	0,4	0,6	0,5	1,3	2,3	0,9	1,8	4,5
Ácido hexadecanóico (palmítico)	1908	0,8	4,6	2,9	2,8	3,2	2,5	5,6	7,2	3,1	3,0	3,0
Z-Falcarinol	2002	4,9	9,5	7,9	3,8	7,2	8,8	18,4	36,2	52,6	57,5	42,6
Ácido linoléico	2125	v	1,5	1,1	0,2	1,6	2,5	2,6	5,8	0,7	1,1	4,2
<b>% de Identificação</b>		<b>96,0</b>	<b>94,1</b>	<b>93,8</b>	<b>96,9</b>	<b>99,0</b>	<b>97,2</b>	<b>85,2</b>	<b>86,5</b>	<b>90,7</b>	<b>86,9</b>	<b>74,2</b>
<b>Compostos agrupados</b>												
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,7	1,8	1,4	0,7	0,6
Monoterpenos oxigenados		70,6	66,6	71,8	83,3	80,1	72,9	35,0	5,6	1,5	1,3	1,1
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		0,4	1,5	1,3	2,0	0,8	0,6	2,7	3,1	12,3	6,4	2,3
Poliacetilenos		4,9	9,5	7,9	3,8	7,2	8,8	18,4	36,2	52,6	57,5	42,6
Ftálicos		5,6	5,3	3,1	1,2	2,7	1,2	3,6	9,5	6,5	5,6	5,6
Ácidos gordos		0,8	6,1	4,0	3,0	4,8	5,0	8,2	13,0	3,8	4,1	7,3
Outros		12,8	4,2	5,0	3,2	2,8	7,9	15,3	15,1	11,9	9,4	10,2

IR: Índices de retenção relativos a uma série de n-alcenos C<sub>9</sub>-C<sub>22</sub> num coluna DB-1. v: vestigial (<0,1%).  
NI - não identificado \*Compostos identificados apenas com base no espectro de massa.

## Resultados e Discussão

Tabela 3.4. Composição percentual volátil das raízes transgênicas de *Levisticum officinale* ao longo das primeiras 48 horas e das 5 semanas após a adição do substrato mentol (25 mg.l<sup>-1</sup>), mantidas em escuridão permanente a 24°C e 80 r.p.m. num volume de 50 ml de meio SH.

Compostos	Tempo (horas)				Tempo (semanas)				
	IR	4	24	48	1	2	3	4	5
Benzaldeído	927	v	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,7	0,6
α-Pineno	930	v	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4	2,2	0,6
<i>n</i> -Heptanol	952	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,6	0,5	0,3
β-Pineno	963	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,6	0,9	1,0
2-Octanona	967	v	v	v	0,4	0,4	0,8	1,9	0,4
2-Pentilfurano	973	v	v	v	v	v	v	v	v
<i>n</i> -Octanal	973	2,6	3,4	2,5	3,0	4,0	7,4	13,1	5,7
Decano	1000	v	v	v	0,2	v	v	0,2	v
1-Deceno	1011	v	v	v	0,2	0,2	0,7	0,2	0,4
Benzeno acetaldeído	1002	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,8	0,7
<i>p</i> -Cimeno	1003	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,7
β-Felandreno	1005	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,7
Limoneno	1009	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,7	0,7
2-Metil decano	1058	v	v	v	v	v	v	0,3	0,4
<i>n</i> -Octanol	1045	0,8	v	0,2	0,7	0,5	1,0	1,6	2,2
2-Nonanona	1058	0,2	0,2	0,1	0,4	0,8	0,9	1,2	1,2
<i>n</i> -Nonanal	1073	0,9	0,7	0,6	1,0	0,5	1,2	1,6	2,1
<i>trans</i> -Vertocitral c*	1077	0,1	v	v	0,2	0,1	0,9	1,1	v
Undecano	1100	v	v	v	v	v	v	v	v
2- <i>trans</i> -Nonen-1-al	1114	1,6	0,2	0,4	0,7	0,8	1,6	1,4	1,0
Pentil Benzeno	1119	v	0,4	0,3	0,8	1,7	3,9	2,8	1,6
Pentil ciclo hexadieno	1125	v	v	v	1,6	2,8	3,9	2,2	5,2
Naftaleno	1139	v	v	v	v	v	v	v	v
<b>Mentol</b>	<b>1148</b>	<b>73,0</b>	<b>76,9</b>	<b>62,3</b>	<b>7,5</b>	<b>5,8</b>	<b>6,7</b>	<b>2,9</b>	<b>3,1</b>
<i>n</i> -Decanal	1180	v	v	v	0,1	v	v	0,4	v
2- <i>trans</i> ,4- <i>trans</i> Nonadienal	1184	0,5	0,3	0,2	0,4	0,6	0,6	1,0	2,4
<i>n</i> -Dodecano	1200	0,5	0,4	0,2	0,9	0,5	0,5	1,5	2,5
2- <i>trans</i> -Decenal	1224	0,8	v	0,6	0,7	0,5	2,6	1,2	1,5
Carvacrol	1286	0,8	v	v	0,6	0,7	0,2	1,1	v
<i>trans</i> -4-Undecenal	1402	2,2	0,6	0,8	0,7	0,9	1,0	0,6	1,0
γ-Decalactona	1430	v	v	v	0,5	1,0	0,6	0,2	1,0
γ-Elemento*	1430	v	v	v	0,2	v	0,2	0,2	0,1
<i>cis</i> -β-Fameseno*	1476	0,4	v	v	v	0,6	1,2	0,2	v
Germacreno B *	1533	0,4	v	0,2	2,5	3,1	6,0	3,8	7,0
3- <i>n</i> -Butilftálico*	1591	0,9	1,1	0,6	1,0	v	v	0,4	v
3- <i>cis</i> -Butilideno ftálico	1615	0,5	0,9	0,8	1,0	1,8	1,2	4,1	0,8
3- <i>trans</i> -Butilideno ftálico	1655	0,8	2,6	1,4	1,9	2,0	2,9	2,3	0,7
Z-Ligustilido	1660	0,8	v	0,6	2,1	6,2	12,5	4,6	7,5
E-Ligustilido	1669	v	v	v	0,9	1,5	v	0,8	v
NI	1835	0,0	0,5	0,6	1,0	0,6	1,8	0,8	4,8
Ácido hexadecanóico (palmítico)	1908	1,7	2,6	1,5	8,2	6,1	3,8	6,9	4,1
Z-Falcarinol	2002	2,5	3,0	3,2	30,0	36,4	16,4	10,1	25,0
Ácido linoléico	2125	v	0,7	0,5	5,0	2,7	1,8	0,4	2,4
<b>% de Identificação</b>		<b>93,1</b>	<b>95,3</b>	<b>78,0</b>	<b>74,7</b>	<b>83,7</b>	<b>83,4</b>	<b>77,1</b>	<b>84,7</b>
<b>Compostos agrupados</b>									
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,7	0,9	0,5	0,7	0,7	1,7	4,8	3,7
Monoterpenos oxigenados		73,8	76,9	62,3	8,6	7,5	7,5	4,2	4,2
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		0,9	v	0,2	2,7	3,6	7,4	4,2	7,1
Poliacetilenos		2,5	3,0	3,2	30,0	36,4	16,4	10,1	25,0
Fetálicos		2,9	4,6	3,4	6,9	11,5	16,6	12,2	8,9
Ácidos gordos		1,7	3,3	2,0	13,1	8,8	5,6	7,3	6,6
Outros		9,6	6,5	5,7	11,8	14,5	25,4	32,3	27,0

IR: Índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>22</sub> num coluna DB-1. v: vestigial (<0,1%). NI - não identificado \*Compostos identificados apenas com base no espectro de massa

## Resultados e Discussão

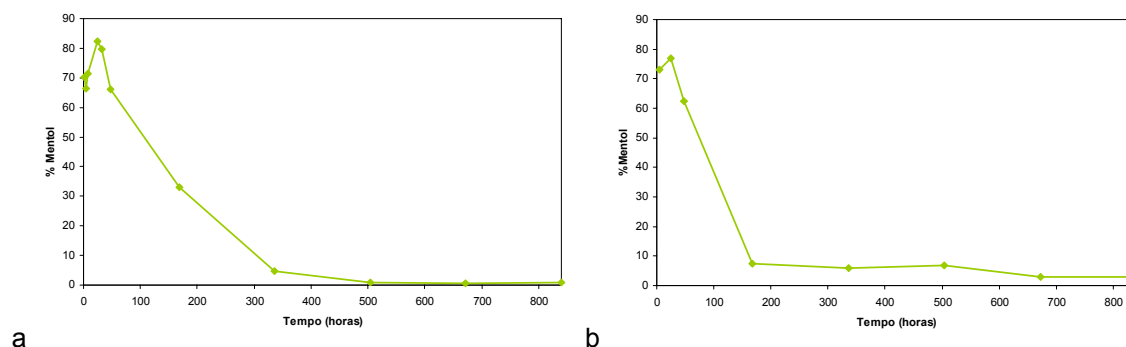


Figura 3.9. Variação da concentração relativa de mentol, ao longo do tempo, nas raízes transgênicas de *L. officinale* sujeitas à adição substrato, duas semanas após inoculação num volume de 100 ml (a) e 50 ml (b) de meio SH.

Comparando-se a composição volátil das raízes transgênicas sujeitas à presença do substrato mentol com a composição volátil constitutiva das raízes transgênicas de levístico, verificou-se que os grupos maioritários de compostos voláteis são os mesmos, havendo uma redução da percentagem relativa de alguns compostos devido à grande concentração percentual de mentol nalguns momentos do ensaio.

Com base na verificação da pureza do substrato e nos resultados da destilação-extracção dos meios de cultura com substrato (brancos substrato) no final dos ensaios, verificou-se que a evaporação do mentol ao longo do ensaio foi mínima ou nula e não se registou a partir da análise volátil que ocorresse decomposição deste composto noutros compostos. A partir destes resultados e tendo em conta que os monoterpenos em concentrações elevadas podem ser prejudiciais para as estruturas biológicas (Weidenhamer *et al.* 1993 em Lückner 2002), colocou-se a hipótese de que o mentol teria sido fitotóxico para as células das raízes transgênicas sendo armazenado nos vacúolos na sua forma glicosilada. Os vacúolos são considerados como sendo compartimentos de desintoxicação das células (Wink 1997). A análise dos voláteis isolados, após hidrólise, com a enzima  $\beta$ -glicosidase, das soluções aquosas resultantes das destilações realizadas às raízes transgênicas com adição de mentol, revelou uma percentagem relativa elevada de mentol na sua constituição. Conclui-se desta forma que o mentol foi glicosilado sendo a sua maioria armazenado nos vacúolos entre as 48 h e a primeira semana no caso das culturas em 100 ml de meio e entre a primeira e segunda semana após a adição do substrato relativamente às culturas em 50 ml de meio.

Em culturas de células vegetais em suspensão verificou-se que a glicosilação *in vitro* podia ser considerada um mecanismo de desintoxicação, visto que as culturas de células vegetais não têm estruturas especializadas de armazenamento (Figueiredo *et al.* 1996). As raízes transgênicas de levístico possuem estruturas secretoras internas, canais, característicos da família a que pertencem. No entanto, o composto mentol na concentração de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  é provavelmente tóxico para as raízes transgênicas, sendo armazenado no vacúolo das suas células. Furuya e a sua equipa (1989) verificaram que os mentil-glicósidos são importantes produtos da biotransformação

de mentol pelas culturas de células de *Eucalyptus perriniana*, e provavelmente estão relacionados com um mecanismo de defesa (Miyazawa *et al.* 1999). Apesar desta possível toxicidade, não se registaram alterações no crescimento das raízes transgênicas de levístico (*vide* 2.3.1), nem na sua morfologia (*vide* 2.3.2). No entanto, é possível que uma concentração mais elevada de mentol altere o seu crescimento e leve à morte celular. Berger e Drawert (1988) verificaram em células de *Mentha piperita*, que a formação de mentil-glicósidos estava dependente da concentração do substrato, do período de incubação, da idade e agregação celulares e da luz (Figueiredo *et al.* 1996). Alguns estudos revelaram que outros compostos como o limoneno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno, 1,8-cineole, cânfora, geraniol, nerol, linalol, citral, carvona e isomentona eram tóxicos para células de algumas espécies em cultura, sendo uma concentração de  $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  ( $=1,5 \text{ mg.g}^{-1}$  de peso fresco) suficiente para, nos primeiros estádios de desenvolvimento, levar à morte celular (Charlwood *et al.* 1988, Falk *et al.* 1990, Orihara e Furuya 1994 em Figueiredo 1996). Seria interessante a realização deste estudo aplicando às raízes transgênicas diferentes concentrações de substrato, de modo avaliar de que forma estas influenciariam os parâmetros analisados.

Para além de ser uma reacção envolvida na desintoxicação celular a glicosilação permite a conversão de compostos orgânicos instáveis e insolúveis em água em compostos estáveis e solúveis de modo a melhorar as suas propriedades bio- e farmacológicas. Glicósidos de compostos voláteis tais como álcoois aromáticos e álcoois terpênicos são usados extensamente em medicina popular (Shimoda *et al.* 2006). No presente trabalho, pode colocar-se a hipótese de que esta reacção não seja só um processo de desintoxicação celular, mas um mecanismo de transformação do mentol num composto mais estável e solúvel em água, de modo a facilitar o seu transporte. De acordo com Berger e Drawert (1988) as culturas de células podiam transformar substratos exógenos em carbono e energia através da transferência destes para as vias metabólicas primárias. A glicosilação destes substratos facilitaria o seu transporte para os sítios de catabolismo enzimático (Figueiredo *et al.* 1996). Desta forma, a glicosilação de mentol por parte das raízes transgênicas de levístico pode ter como objectivo a utilização deste substrato no metabolismo primário deste órgão. No entanto, para além de não se terem observado alterações na desassimilação das raízes transgênicas sujeitas à presença de mentol que revelem um aumento da sua actividade metabólica, não foi realizado um acompanhamento ao longo do ensaio em relação à variação de compostos glicosilados.

A biotransformação de mentol foi registada em diferentes organismos, originando-se vários produtos. Miyazawa e colaboradores (1999) verificaram a ocorrência de biotransformação de mentol no aparelho digestivo das larvas do insecto *Spodoptera litura*, produzindo-se 7-hidroximentol. Em *Aspergillus niger*, Asakawa e a sua equipa (1991) registaram a conversão de (-)-mentol em 1-,2-,6-,7-,8- e 9-hidroximentol e de (+)-mentol em 7-hidroximentol. Suga (1987) verificou que células em suspensão de *Nicotiana tabacum* biotransformavam o mentol dando origem a várias cetonas (Miyazawa *et al.* 1999). Estudos em microsomas do fígado de rato

revelaram a conversão o mentol em *p*-mentano-3,8-diol, *p*-mentano-3,9-diol, ácido 3,8-oxi-*p*-mentano-7-carboxilo e ácido 3,8-dihidroxi-*p*-mentano-7-carboxilo (Madhava e Srivatsan 1993 em Miyazawa *et al.* 2003).

Em raízes transgênicas de *Anethum graveolens*, da mesma família que o *L. officinale*, ocorreu a biotransformação de mentol em acetato de mentilo (Faria *et al.* 2007). Este facto mostra que mesmo que duas espécies sejam muito próximas, e que o seu metabolismo seja idêntico, a regulação deste metabolismo pode ser diferente, existindo diferentes enzimas envolvidas nesta regulação. Enquanto que as raízes transgênicas de aneto possuem acetiltransferases responsáveis pela formação deste acetato as raízes de levístico são ricas em glucosiltransferases.

#### 3.2.3.2.2. Geraniol

O geraniol (*trans*-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) é um composto terpénico usualmente utilizado na composição de importantes fragrâncias devido ao seu fresco odor a flores (Wolken e Werf 2001, Backtorp *et al.* 2007). É um dos mais antigos compostos orgânicos conhecidos e tem como fontes naturais plantas como a *Rosa damascena*, o *Pelargonium graveolens*, o *Cymbopogon martini* (Limberger *et al.* 2003), o *C. nardus* e o *P. roseum* (Takechi e Miyazawa 2006), mas é responsável sobretudo pelo típico aroma das plantas do género *Geranium* (Höschle e Jendrossek 2005). Um estudo realizado por Yu e colaboradores (1995) demonstrou a importância medicinal do geraniol, verificando que este ao ser adicionado à dieta de ratos inibia o crescimento dos tumores de que estes padeciam e aumentava o seu tempo de vida. A biotransformação do monoterpene geraniol tem sido referida em plantas, microorganismos e insectos (Demyttenaere e Pooter 1996, Figueiredo *et al.* 1996, Hamada *et al.* 1997, Demyttenaere e Kimpe 2000, King e Dickinson 2000, Demyttenaere e Kimpe 2001, Wolken e Werf 2001, Takechi e Miyazawa 2006).

Na análise da composição volátil das amostras correspondentes às raízes transgênicas sujeitas à presença de geraniol, verificou-se que houve formação de seis novos compostos voláteis: linalol,  $\alpha$ -terpeniol, citronelol, nerol, neral e geraniol acetato, Tabela 3.5. Verificou-se que a biotransformação ocorreu 1 h após a adição do substrato, embora se tenham registado concentrações percentuais reduzidas. A concentração percentual de geraniol tendeu a baixar ao longo do tempo, registando-se uma maior redução deste substrato uma semana após a sua adição. Às 24 h após a adição do substrato verificou-se que a concentração de geraniol era de 9%. Este valor poderá estar relacionado com o aumento da concentração percentual relativa de outros compostos. Registou-se que as concentrações relativas de geraniol nas últimas semanas atingiram valores mínimos. As concentrações percentuais de citronelol, nerol, e neral também tenderam a decrescer ao longo do tempo. Estes três compostos possuem índices de retenção muito próximos não sendo possível na maioria dos casos analisá-los separadamente, pelo que se optou pelo somatório das concentrações percentuais dos três compostos.

Os compostos voláteis linalol,  $\alpha$ -terpeniol e acetato de geraniol variam praticamente da mesma forma ao longo do ensaio, verificando-se que as suas concentrações nunca atingiram

## Resultados e Discussão

valores elevados, isto é ocorreram numa percentagem relativa <2%.

Tabela 3.5. Composição percentual volátil das raízes transgênicas de *Levisticum officinale* ao longo das primeiras 48 horas e das 5 semanas após a adição do substrato geraniol (25 mg.l<sup>-1</sup>), mantidas em escuridão permanente a 24°C e 80 r.p.m. num volume de 50 ml de meio SH.

Compostos	IR	Tempo (horas)						Tempo (semanas)				
		1	4	8	24	32	48	1	2	3	4	5
Benzaldeído	927	0,6	0,2	0,4	0,3	0,9	0,4	1,0	0,4	0,3	0,1	0,2
α-Pineno	930	0,6	0,2	0,6	0,2	0,8	0,5	1,0	0,3	0,3	0,2	0,3
<i>n</i> -Heptanol	952	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,3	1,7	0,4	0,2	0,2	0,3
β-Pineno	963	0,2	0,3	0,7	0,4	0,5	0,2	2,1	0,5	0,2	0,2	0,3
2-Octanona	967	0,1	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,5	0,3	0,2	0,2	0,6
2-Pentilfurano	973	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v
<i>n</i> -Octanal	973	2,7	4,1	3,1	6,3	5,3	3,7	5,8	3,1	2,0	2,6	5,6
Decano	1000	0,2	v	0,1	0,5	v	v	1,0	0,2	0,1	v	0,2
1-Deceno	1011	0,2	0,4	0,5	0,1	0,5	0,4	0,4	0,5	0,1	0,2	0,1
Benzeno acetaldeído	1002	0,2	0,5	1,1	0,2	0,4	0,1	3,9	0,8	0,2	0,2	0,3
<i>p</i> -Cimeno	1003	0,2	0,5	1,1	0,2	0,4	0,1	5,0	0,4	0,1	0,1	0,2
β-Felandreno	1005	0,2	0,5	0,5	0,2	0,4	0,1	4,7	0,1	0,1	0,1	0,3
Limoneno	1009	0,2	0,5	0,3	0,2	0,4	0,1	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4
<i>n</i> -Octanol	1045	0,2	0,4	0,5	0,6	1,5	0,5	1,0	0,4	0,2	0,3	0,5
2-Metil decano	1058	0,1	v	v	0,1	v	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1
2-Nonanona	1058	0,2	0,5	0,4	0,6	0,6	0,5	0,7	0,3	0,2	0,3	0,4
<i>n</i> -Nonanal	1073	0,6	0,8	0,7	0,7	1,2	0,8	0,9	0,4	0,3	0,3	0,8
<b>Linalol</b>	<b>1074</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,7</b>	<b>1,1</b>	<b>1,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>
<i>trans</i> -verticilral c*	1077	0,1	0,4	v	0,8	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
Undecano	1100	0,1	v	v	0,1	0,1	v	v	0,4	v	v	0,1
2- <i>trans</i> -Nonen-1-al	1114	0,5	0,5	1,4	1,4	1,0	0,8	1,2	0,7	0,5	0,5	0,7
Pentil Benzeno	1119	0,4	1,6	0,6	2,1	1,0	1,0	0,8	0,7	0,8	1,0	0,9
Pentil ciclo hexadieno	1125	0,4	0,5	0,2	0,9	1,4	1,2	0,4	0,4	1,2	1,4	1,6
Naftaleno	1139	0,1	0,1	0,2	0,4	v	0,4	0,4	0,1	v	0,1	0,1
<b>α-Terpineol</b>	<b>1159</b>	<b>1,1</b>	<b>0,6</b>	<b>3,0</b>	<b>1,4</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>
<i>n</i> -Decanal	1180	0,1	v	0,2	0,1	0,1	0,1	0,5	0,2	v	0,3	0,3
2- <i>trans</i> ,4- <i>trans</i> Nonadienal	1184	0,1	0,4	0,6	0,7	0,5	0,6	0,3	0,4	0,3	0,7	0,2
<i>n</i> -Dodecano	1200	0,4	0,4	0,7	0,8	1,4	0,2	1,2	0,8	0,1	0,5	0,9
<b>Citronelol+Nerol+Neral</b>	<b>1206-1210</b>	<b>5,1</b>	<b>14,5</b>	<b>10,4</b>	<b>14,7</b>	<b>6,4</b>	<b>1,2</b>	<b>4,6</b>	<b>0,9</b>	<b>v</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>Geraniol</b>	<b>1236</b>	<b>38,6</b>	<b>40,6</b>	<b>29,7</b>	<b>9,2</b>	<b>30,0</b>	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
2- <i>trans</i> -Decenal	1224	3,3	5,2	8,8	2,6	2,4	1,4	1,4	0,7	0,4	0,7	0,5
Carvacrol	1286	0,4	0,6	1,0	1,5	2,1	0,3	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1
<b>Acetato de Geraniol</b>	<b>1370</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>1,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,1</b>
<i>trans</i> -4-Undecenal	1402	1,1	1,3	2,3	2,4	2,9	2,2	2,3	1,5	0,7	1,0	1,2
γ-Decalactona	1430	0,1	v	0,1	0,7	0,1	0,3	1,0	0,6	0,5	0,6	0,6
γ-Elemeno*	1430	0,1	v	v	0,7	0,1	0,3	0,9	0,7	0,7	0,6	0,4
<i>cis</i> -β-Fameseno*	1476	0,2	v	v	1,0	0,4	0,2	1,4	0,9	0,4	1,4	0,9
Germacreno B *	1533	1,4	1,3	0,8	1,8	4,3	2,5	1,6	2,5	4,2	4,3	3,2
3- <i>n</i> -Butilftáido*	1591	0,1	v	v	0,3	0,3	0,3	0,6	0,2	0,3	0,3	0,8
3- <i>cis</i> -Butilideno ftáido	1615	0,9	2,1	1,4	2,8	0,7	2,4	3,0	2,7	1,7	3,0	2,3
3- <i>trans</i> -Butilideno ftáido	1655	1,3	0,2	0,7	2,4	0,6	2,9	1,9	1,8	1,7	2,1	2,4
Z-Ligustilido	1660	3,0	3,5	1,3	7,3	2,5	6,8	3,8	6,7	6,6	5,1	3,8
E-Ligustilido	1669	0,2	0,0	0,1	1,4	0,4	1,4	1,0	1,2	1,4	1,0	0,8
NI	1835	1,4	0,7	1,2	1,9	1,3	3,9	1,1	2,6	1,9	2,7	3,1
Ácido hexadecanóico (palmítico)	1908	5,3	3,8	6,1	3,9	4,6	13,1	5,3	12,6	5,0	7,5	10,4
Z-Falcarinol	2002	10,3	3,0	3,2	7,1	6,8	24,2	v	18,9	47,9	35,8	26,5
Ácido linoléico	2125	3,6	v	2,9	0,9	2,5	5,8	1,8	8,4	4,2	3,8	4,6
<b>% de Identificação</b>		<b>86,1</b>	<b>91,1</b>	<b>87,7</b>	<b>83,4</b>	<b>88,5</b>	<b>81,8</b>	<b>68,4</b>	<b>74,9</b>	<b>84,8</b>	<b>78,8</b>	<b>74,8</b>
<b>Compostos agrupados</b>												
Hidrocarbonetos monoterpênicos		1,5	1,9	3,1	1,4	2,3	1,0	13,1	1,4	1,0	0,7	1,4
Monoterpenos oxigenados		46,0	57,7	45,3	30,2	41,0	5,6	8,3	3,8	1,5	2,3	1,7
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		1,7	1,3	0,8	3,4	4,8	3,0	4,0	4,1	5,3	6,3	4,5
Poliacetilenos		10,3	3,0	3,2	7,1	6,8	24,2	v	18,9	47,9	35,8	26,5
Fetalidos		5,5	5,7	3,4	14,1	4,6	13,8	10,2	12,6	11,8	11,4	10,0
Ácidos gordos		9,0	3,8	9,0	4,8	7,1	19,0	7,1	21,0	9,2	11,3	15,0
Outros		12,2	17,7	22,8	22,3	21,8	15,2	25,8	13,1	8,0	10,8	15,6

IR: Índices de retenção relativos a uma série de *n*-alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>22</sub> num coluna DB-1. v: vestigial (<0,1%). NI - não identificado \*Compostos identificados apenas com base no espectro de massa

Neste trabalho analisou-se ainda o grau de pureza do geraniol, no momento da adição às culturas (tempo 0), isto é, determinou-se que não existiam outros compostos presentes na solução de substrato que pudessem interferir no ensaio, e serem eles mesmos substratos de biotransformação. Determinou-se ainda se, ao longo do tempo da experiência, ocorria perda do substrato por evaporação e conclui-se que a sua evaporação era mínima ou nula ao longo do

ensaio. Por outro lado, não se registou a partir da análise volátil do branco com substrato a decomposição do geraniol noutros compostos. Da mesma forma que para o substrato mentol, colocou-se a hipótese de que tanto o geraniol como os produtos resultantes da biotransformação seriam transportados para o vacúolo sob a forma de compostos glicosilados. No entanto, tem que se ter em conta que os compostos resultantes da biotransformação do geraniol também podem sofrer evaporação (King e Dickinson 2000).

A análise dos voláteis isolados, após hidrólise, com a enzima  $\beta$ -glicosidase, das soluções aquosas resultantes das destilações das raízes transgênicas realizadas 1, 8, 24, 32 e 48 h após a adição de geraniol, revelou a presença de geraniol, citronelol, nerol, neral na sua constituição. Conclui-se desta forma que houve biotransformação de geraniol com a formação de novos compostos voláteis e glicosilação deste e de alguns dos seus produtos, 1 h após a sua adição.

Em culturas de células em suspensão de *Achillea millefolium* verificou-se que os compostos nerol, neral e geraniol eram os componentes maioritários detectados depois da incubação com uma concentração de 50 mg.l<sup>-1</sup> de geraniol (Figueiredo *et al.* 1996). Figueiredo e colaboradores (1996), registaram que dois dias após a adição do geraniol, este e os produtos resultantes da sua biotransformação deixaram de ser detectados durante o crescimento da cultura celular sendo convertidos nas suas formas glicosídicas, até um período da fase estacionária correspondente à lise celular. A conversão de geraniol para nerol, também foi detectada em culturas de células em suspensão de *Euphorbia characias*, *Nicotiana tabacum*, *Catharanthus roseus*, *Glycine Max* por Carriere e a sua equipa (1989) e em *Petroselinum crispum* por Gbolable e Lockwood (1989) (Figueiredo *et al.* 1996). Pensa-se que a conversão de geraniol para nerol é realizada por uma reductase ou uma isomerase. Dunphy e Allcock (1972) isolaram uma reductase das pétalas de rosa (Luan *et al.* 2004). Mas foi também detectada a presença de uma isomerase, que já tinha sido detectada por Banthorpe e Poots (1979) em *Rosa damascena* (Luan *et al.* 2004). Hamada e colaboradores (1997) verificaram que em células em suspensão de *Catharanthus roseus* a oxidação da posição C-8 (grupos metil alílicos) do geraniol é provavelmente a via metabólica principal na biotransformação deste composto, originando-se compostos como o 8-hidroxicitronelol e 8-hidroxinerol. Nestas culturas de células, numa fase precoce da incubação, o geraniol era convertido em nerol e citronelol. Isto demonstrou que a cultura de células possuía isomerases que convertiam o geraniol em nerol e reductases responsáveis pela redução da cadeia dupla C-C do geraniol transformando-o em citronelol na primeira fase de incubação das culturas (Hamada *et al.* 1997). Visto que as raízes transgênicas de levístico biotransformaram o geraniol produzindo nerol e citronelol, possivelmente possuem isomerases e reductases com especificidade para este composto.

Em relação à formação de acetato de geraniol pelas raízes transgênicas de levístico, um estudo de Dubey e Luthra (2001) em *Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. *motia*, conhecida vulgarmente como palmarosa, demonstrou que esta produzia um óleo essencial rico no composto monoterpénico geraniol, nas suas flores e folhas. Estes autores verificaram que em inflorescências

imaturas desta planta uma quantidade considerável de geraniol sofria acetilação para formar acetato de geraniol, que sofria depois hidrólise para formar geraniol, nas inflorescências maduras. Neste estudo, fez-se pela primeira vez a identificação da enzima esterase e da sua actividade na catálise do acetato monoterpénico acíclico, convertendo acetato de geraniol em geraniol (Dubey e Luthra 2001). No presente trabalho como se verificou a biotransformação de geraniol em acetato de geraniol, pensa-se que as raízes transgénicas de levístico possuam acetil transferases responsáveis por este processo. No entanto, pode colocar-se a hipótese de que ao mesmo tempo que ocorre esta transformação, existam esterases que catalizem a reacção inversa.

Dubey e Luthra (2001) observaram ainda um decréscimo de conteúdo de geraniol destas plantas com o aumento da sua maturidade, verificando que esta variação podia dever-se a um processo de glicosilação na formação de geraniol-D-glicósidos. Estes compostos seriam depois usados em processos do metabolismo primário (Dubey e Luthra 2001). Assim como para o processo de glicosilação no caso do substrato mentol nas raízes transgénicas de levístico poder estar relacionado não só com a toxicidade do substrato monoterpénico, a glicosilação do geraniol pode também representar uma forma deste composto ser utilizado de uma melhor maneira pelas raízes transgénicas. O mesmo pode acontecer relativamente aos seus compostos derivados. A glicosilação destes compostos voláteis pode ser uma maneira de os transformar em compostos mais úteis que poderão vir a ser utilizados no metabolismo primário da planta ou como intermediários no metabolismo secundário. Stahl-Biskup (1987) refere que o geraniol, nerol, linalool e  $\alpha$ -terpeniol representam os monoterpénos glicosilados mais vezes detectados em várias plantas, sendo quatro intermediários importantes na biossíntese de monoterpénos. Este facto pode indicar uma ligação entre os monoterpénos glicosídicos e a biossíntese de monoterpénos (Stahl-Biskup 1987). Outros resultados registados por Hörster (1976) e outros investigadores referem os compostos glicosídicos como uma forma de transporte dos monoterpénos, do local de biossíntese para o local da sua acumulação, em estruturas especializadas das plantas (Stahl-Biskup 1987). Para além disso é conhecido que o geraniol é insolúvel na água, no entanto, o glicósido do  $\beta$ -geraniol é solúvel em fases orgânicas e aquosas, e em adição pode representar uma forma do seu transporte (Stahl-Biskup 1987). No presente trabalho não foi possível analisar a variação dos compostos glicosídicos por um período de tempo mais prolongado. No entanto, durante o tempo de ensaio não se registaram alterações relevantes no crescimento em relação aos parâmetros analisados.

Encontra-se na bibliografia grande referência a estes compostos terpénicos derivados do geraniol e obtidos no presente trabalho com raízes transgénicas de levístico e às suas formas glicosiladas, na produção e qualidade de vinhos. Os constituintes principais terpenóides aromatizantes de vinhos são o linalol, o nerol, o geraniol, o  $\alpha$ -terpeniol e o citronelol (Park e Noble 1993 em King e Dickinson 2000). Os terpenóides são importantes para distinguir as diferentes variedades de uvas, a variedade Muscat por exemplo, apresenta um elevado nível de linalol (King e Dickinson 2000). Nas uvas, os terpenóides existem tanto na sua forma livre como na sua forma

glicosilada. Estes complexos glicosídicos não voláteis são conhecidos como sendo precursores dos aromas dos vinhos. Park e Noble (1993) e Zoecklein e colaboradores (1997) verificaram que estes terpenóides podiam voltar às suas formas livres durante o processo de vinificação através da actividade de glicosidases, existentes em leveduras (King e Dickinson 2000). Ganga e a sua equipa (1999) sugeriram aumentar a actividade desta enzima de modo a amplificar os níveis de terpenóides nos vinhos (King e Dickinson 2000). A acção da enzima consiste na quebra da cadeia do terpeno com o açúcar e leva à formação de estruturas químicas como as agliconas (volátil quando livre) que podem variar tomando a forma de terpenos (linalol, geraniol, nerol, citronelol ou  $\alpha$ -terpeniol) (Villena *et al.* 2007). Para além da aromatização dos vinhos a formação de aroma nas flores também parece ser regulada pela acção de vários tipos de glicosidases ou por uma glicosidase que hidrolisa uma grande quantidade de precursores de aromas glicosídicos. Oka e colaboradores (1997) verificaram que a  $\beta$ -glucosidase parece estar principalmente envolvida na formação de aromas nas flores de rosas. Francis e Allcock's (1969) verificaram que o geraniol, nerol e citronelool são encontrados como glicósidos em espécies de Rosa (Stahl-Biskup 1987).

Para além de possuírem glicosidases as leveduras são também capazes de biotransformar alguns terpenos através de outras reacções. Drawert e Barton (1978) verificaram que a levedura *Kluyveromyces lactis* era capaz de produzir geraniol, linalol e citronelol, a uma baixa concentração ( $50 \mu\text{g.l}^{-1}$ ), sendo o geraniol convertido em citronelol (King e Dickinson 2000). Foi demonstrado por Gramatica e a sua equipa (1982) que *Saccharomyces cerevisiae* era capaz de reduzir o geraniol ao seu enantiómero puro R-(+)-citronelol (King e Dickinson 2000). Esta reacção pode ter interesse comercial visto que as diferentes formas de enantiómeros dos monoterpenos têm qualidades sensoriais diferentes. No estudo realizado por King e Dickinson (2000) com estas duas leveduras verificou-se que nenhuma possuía capacidade para produzir monoterpenos, no entanto biotransformavam o geraniol através de vários tipos de reacções: reduções (geraniol para citronelol), translocações (geraniol e nerol para linalol), isomerizações de *cis*- para *trans*- (nerol para geraniol), e ciclizações (nerol e linalol para  $\alpha$ -terpeniol) (King e Dickinson 2000). Visto que no presente trabalho, se registou a formação de citronelol, possivelmente este formou-se a partir do geraniol através de uma redução catalizada por uma reductase. O linalol pode ter-se formado a partir de geraniol ou do nerol resultante do geraniol por isomerização. O linalol e o nerol podem ter dado origem ao  $\alpha$ -terpeniol através de reacções de ciclização.

Para além das leveduras utilizadas na vinificação, o fungo *Botrytis cinerea*, é reconhecido como sendo responsável pela degradação de terpenóides observados em vinhos feitos de uvas que estiveram em contacto com o fungo (Boidron 1978, Shimizu *et al.* 1982 em Bock *et al.* 1988).

Relativamente à biotransformação do geraniol através de outros microorganismos, Demyttenaere e Pooter (1996) verificaram que esporos de *Penicillium italicum* possuíam a capacidade de biotransformar geraniol e nerol produzindo o composto 6-metil-5-hepten-2-ona por períodos prolongados de tempo. Estes autores verificaram também que os esporos de fungos parecem resistir de uma melhor forma à toxicidade provocada por elevadas concentrações de

substratos monoterpénicos, não inibindo o seu crescimento ao contrário do que se verifica em células em suspensão (Demyttenaere e Pooter 1996), sendo ainda mais resistentes que o seu próprio micélio (Wolken et al. 2002). *Aspergillus niger* é conhecido por biotransformar não só geraniol, mas também os compostos citronelol e linalol nos seus derivados 8-hidroxi, uma reacção referida como sendo  $\omega$ -hidroxilação (Madyastha et al. 1988, Madyastha e Murthy, 1988 em Demyttenaere et al. 2004). Num estudo de Demyttenaere e a sua equipa (2000) os principais produtos resultantes da bioconversão do geraniol e do nerol em culturas líquidas de *Aspergillus niger* foram o linalol, o  $\alpha$ -terpeniol, 2,6,6-trimetil-2-viniltetrahidropirano (TMVP) e um composto não identificado. Nesse trabalho com *Aspergillus niger* o pH das culturas foi sempre tido em conta, para testar a possibilidade de conversão química dos substratos devido às condições ácidas do meio. Foi descoberto que nem o geraniol nem o nerol foram convertidos em nenhum composto num pH neutro e a pH 5. No entanto, num pH igual a 3,5, foi recolhido o composto linalol e a formação de  $\alpha$ -terpeniol a partir de nerol também foi registada a um pH de 3,5 (Demyttenaere et al. 2000). Nas raízes transgénicas de levístico não foi estudada a variação do pH do meio ao longo do ensaio. No entanto, na análise da composição volátil realizada ao meio com o substrato geraniol, verificou-se que não houve degradação do geraniol noutros compostos. Este resultado pode querer dizer que o pH não variou ao longo do ensaio, mantendo-se nos 5,5. Pode colocar-se a hipótese de que as raízes transgénicas sejam responsáveis pela acidificação do meio, e que a formação de  $\alpha$ -terpeniol e linalol seja uma consequência desta acidificação.

Para além das condições acídicas do meio, Demyttenaere e colaboradores (2000) registaram também que as condições de extracção, como a destilação a vapor, podem influenciar a conversão de geraniol noutros produtos, verificando que estes dois factores em conjunto, acidificação do meio e a temperatura de extracção, eram responsáveis pela formação de compostos a partir do geraniol. Para dois substratos, geraniol e nerol, Demyttenaere e colaboradores (2000) utilizaram frascos controlo com diferentes pHs. Durante a destilação, uma conversão de geraniol para linalol foi registada a um pH de 3,5, e houve também a conversão de geraniol em  $\alpha$ -terpeniol nestas condições. Durante a destilação por vapor houve também uma significativa conversão de nerol para linalol e  $\alpha$ -terpineol a um pH de 3,5.

Em relação à biotransformação de geraniol em insectos Takechi e Miyazawa (2006) verificaram que larvas do insecto da espécie *Spodoptera litura* biotransformavam o geraniol originando 8-hidroxisgeraniol, 9-hidroxisgeraniol, ácido (2E,6E)-8-hidroxi-3,7-dimetil-octadienóico, ácido (2E,6E)-3,7-dimetil-octadieno-1,8-dióico e ácido (2E,6Z)-3,7-dimetil-octadieno-1,9-dióico. O interesse no estudo destas larvas está na sua importância como catalisadores biológicos pois possuem grandes níveis de actividade enzimática contra terpenóides visto que se alimentam de plantas que contêm estes compostos (Takechi e Miyazawa 2006).

Por fim, em raízes transgénicas de *Anethum graveolens*, da família Apiaceae, Faria (2007) registou a presença de linalol,  $\alpha$ -terpeniol, citronelol, geraniol, neral, acetato de geraniol, acetato de nerol, acetato de citronelilo, óxido de linalol e óxido de nerol quando suplementaram o meio de

cultura com geraniol numa concentração de 25 mg.l<sup>-1</sup>. De igual forma que para o substrato mentol as raízes transgénicas das duas espécies de Apiaceae apresentaram respostas diferentes aos substratos aplicados. Em raízes transgénicas de *Anethum graveolens* registou-se a presença de um maior número de acetatos aquando da análise da composição volátil, podendo possivelmente indicar uma maior actividade por parte de acetiltransferases ou um maior número destas enzimas nesta espécie do que em *Levisticum officinale*.

## Resultados e Discussão

## 4. Conclusões e perspectivas futuras

O reconhecimento de que as funções das raízes das plantas envolvem mais do que absorção de água e de nutrientes ou o estabelecimento de relações simbióticas abriu perspectivas fascinantes para a investigação deste órgão. As raízes podem ser reconhecidas como sendo um local de actividade metabólica única, sendo em muitos casos responsáveis pela biossíntese de metabolitos existentes em toda a planta. As *hairy roots* são cada vez mais utilizadas como um sistema para o estudo da produção de metabolitos secundários, devido à sua estabilidade genética e bioquímica, ao crescimento rápido num meio sem reguladores de crescimento. Algumas culturas de raízes transgénicas têm sido testadas com o objectivo da produção de óleos essenciais e são utilizadas várias estratégias para aumentar a produtividade de alguns compostos, embora não se conheça actualmente nenhum procedimento geral eficiente visto que existem diferenças entre espécies. Os terpenos podem ser uma promissora classe de produtos naturais, particularmente os monoterpenos, que são relativamente baratos e produzidos em grandes quantidades e muitos produtos com importância industrial podem ser seus derivados.

A regeneração e a biotransformação podem ser vistas como formas de aumentar ou produzir um composto de interesse. Neste trabalho procedeu-se à tentativa de regeneração espontânea e induzida de plantas transformadas a partir das raízes transgénicas de *Levisticum officinale* em meio MS/2 sob um fotoperíodo de 16 h luz. Utilizaram-se como indutores da regeneração a Higromicina B, Ácido salicílico e radiação UV. Procedeu-se ainda à análise do crescimento, da composição volátil e da capacidade de biotransformação das raízes transgénicas de *Levisticum officinale* mantidas em meio SH, sob escuridão permanente, utilizando como substratos mentol e geraniol numa concentração de 25 mg.l<sup>-1</sup>.

No que se refere à regeneração, não se obtiveram regenerantes, havendo apenas a formação de tecido caloso no caso da regeneração espontânea em meio MS/2 sob um fotoperíodo de 16 h luz e no caso da regeneração induzida por radiação UV. Não se pode concluir que radiação UV tenha um efeito indutor visto que os resultados foram semelhantes aos da regeneração espontânea. Conclui-se ainda que provavelmente o principal factor responsável pela não regeneração de plantas a partir das raízes transgénicas seja o elevado tempo de cultura destas raízes. Em trabalhos futuros seria interessante a realização dos mesmos ensaios suplementando o meio de cultura com reguladores de crescimento. Também seria interessante utilizar novamente a Higromicina B e o Ácido salicílico integrando-os de outra forma no meio de regeneração, utilizando outras concentrações e estudar outro procedimento para a utilização da radiação UV.

Em relação aos ensaios de biotransformação pode concluir-se que os substratos monoterpénicos utilizados não influenciaram o crescimento nem a morfologia das raízes transgénicas. Na análise realizada relativa ao efeito da adição do substrato mentol na composição de voláteis das raízes transgénicas de *L. officinale* não se observou a formação de nenhum produto volátil resultante da biotransformação. Pelo contrário, após a adição de geraniol

registrou-se a formação de seis novos compostos voláteis: linalol,  $\alpha$ -terpeniol, citronelol, nerol, neral e geranilo acetato. No entanto, tanto o mentol como o geraniol e alguns dos seus produtos foram armazenados na forma de compostos glicosilados no vacúolo. Este mecanismo de glicosilação pode ser um processo de desintoxicação ou um modo de conversão dos compostos insolúveis e instáveis em compostos solúveis e mais estáveis, que possam ser transportados para outras partes da planta e utilizados no seu metabolismo primário. Possivelmente as raízes transgênicas de *L. officinale* possuem uma grande percentagem de enzimas glucosiltransferases que apresentam uma grande actividade. Neste sentido são necessários mais estudos relativamente ao metabolismo destas raízes. Em trabalhos futuros seria interessante perceber qual a regulação das vias metabólicas envolvidas na biotransformação de mentol e geraniol pelas raízes transgênicas de *L. officinale*, passando pelo isolamento e caracterização das enzimas envolvidas. Outro trabalho futuro a realizar seria a biotransformação de concentrações variadas de mentol e geraniol com o objectivo de verificar a influência das diferentes concentrações no crescimento e na composição volátil das raízes transgênicas destas raízes. Seria ainda aliciante, realizar o mesmo estudo de biotransformação com o substrato geraniol analisando ao mesmo tempo as variações de pH do meio de cultura de modo a averiguar a sua influência na formação de alguns compostos.

No contexto do trabalho realizado, seria interessante continuar a explorar o potencial das raízes transgênicas de *L. officinale* na transformação de outros substratos exógenos, ensaiando outro tipo de compostos, concentrações e momentos de adição diferentes.

## 5 - Bibliografia

- Abbas, C.A. 2006. Chapter 10, Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. Em: The Yeast Handbook - Yeasts in Food and Beverages. Querol, A., Fleet, G.H. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 285 – 334.
- Anónimo 2000. Natural Sources of Flavourings. Report no 1. Council of Europe Publishing, Strasbourg.
- Bäcktorp, C., Hagvall, L., Börje, A., Karlberg, A.T., Norrby, P.-O., Nyman, G. 2007. Mechanism of Air Oxidation of the Fragrance Terpene Geraniol. *J. Chem. Theory Comput.*, A – F.
- Baerheim Svendsen, A., Merx, I.J.M. 1989. A simple method for screening of fresh plant material from glycosidic bound volatile compounds. *Plant Med.* 55, 38 – 40.
- Barroso, J., Pedro, L. 1991. Análise de produtos naturais: cromatografia gás-líquido e espectrometria de massa na análise de óleos essenciais. *Ciência, Série VI* 1:20-24.
- Başer, K.H.C., Demirci, F. 2007. Chemistry of Essential Oils. Em: Book Flavours and Fragrances. Publisher Springer Berlin Heidelberg, 43 - 86.
- Batz, O, Logemann, E., Reinold, S., Hahlbrock, K.B. 1998. Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Chemistry* 379, (8-9):1127-35.
- Beek, T.A. 1999. Modern methods of secondary product isolation and analysis. Em: Chemical from plants perspectives on plant secondary products. Walton, N.J., Brown, D.E. eds. Imperial College press - World Scientific. London. 91-186.
- Bhat, S.V., Nagasampagi, B.A., Sivakumar, M. 2005. Chemistry of Natural Products. Springer Narosa Publishing House. India.
- Blank, I., Schieberle, P. 1993. Analysis of the seasoning-like flavour substances of a commercial lovage extract (*Levisticum officinale* Koch.). *Flavour and Fragrance Journal* 8, 191-195.
- Boek, G., Benda, I., Schreier, P. 1988. Microbial transformation of geraniol and nerol by *Botrytis cinerea*. *Microbiol Biotechnol* 27, 351 – 357.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical. *Plant Science* 161, 839–851.
- Bylaitė, E., Roozen, J.P., Legger, A., Venskutonis, P., Posthumus, M.A., 2000. Dynamic headspace gas chromatography of different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) at eight growing stages. *J. Agri. Food Chem.* 48, 6183 – 6190.
- Bylaitė, E., Venskutonis, R.P. & Roozen, J.P. 1998. Influence of harvesting time on the composition

- of volatile components in different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch.). J. Agric. Food Chem. 46, 3735 - 3740.
- Carvalho, C.C.C.R., Fonseca, M. M. R. 2006. Biotransformation of terpenes. Biotechnology Advances 24, 134 – 142.
- Chapple, C.C., Vogt, T., Ellis, B.E., Somerville, C.R. 1992. Citation: An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. Plant-Cell 4, 11: 1413-24.
- Cho, H., Widholm, J.M. 2002. Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69, 259 – 269.
- Choi, P.S., Kim, Y.D., Choi, K.M., Chung, H.J., Choi, D.W., Liu, J.R. 2004. Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. Plant Cell Rep 22, 828 – 831.
- Collin, H.A., 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. Plant Growth Regulation 34, 119–134.
- Costa, M.C. 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.
- Crane, C., Wright, E., Dixon, R.A., Wang, Z. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. Planta 223, 1344 – 1354.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). Em: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B. Gruissem, W., Jones, R. eds. American Society of Plant Physiologists. Rockville. 1250 – 1311.
- Cu, J.Q., Pu, F., Shi, Y., Perineau, F., Delmas, M., Gaset, A. 1990. The chemical composition of lovage headspace and essential oils produced by solvent extraction with various solvents. J. Essent. Oil Res. 2, 53 - 59.
- 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. Plant Cell Reports 20, 55 – 59.
- Dauksas, E., Venskutonis, P.R., Sivik, B. 1999. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the main constituents of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) essential oil in model systems and overground botanical parts of the plant. Journal of Supercritical Fluids 15, 51-62.
- Davey, M. R., Mulligan, B. J., Gartland, K. M. A., Peel, E., Sargent, A. W. and Morgan, A. J. 1987. Transformation of *Solanum* and *Nicotiana* species using an Ri plasmid vector. J. exp. Bot. 38, 1507–1516.

- Demyttenaere, J., De Kimpe, N. 2001. Biotransformation of terpenes by fungi, study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 265 – 270.
- Demyttenaere, J.C.R., Pooter, H.L. 1996. Biotransformation of Geraniol nad Nerol by spores of *Penicillium italicum*. *Phytochemistry* 41, 4:1079-1082.
- Demyttenaere, J.C.R., Vanoverschelde, J., Kimpe, N.D. 2004. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography A* 1027, 137–146.
- Dubey, V.S., Luthra, R. 2001. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. *motia*) inflorescence development. *Phytochemistry* 57, 675–680.
- Edwards, R., Gatehouse, J.A. 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Em: Lea, P.J., Leegood, R.C. eds. England.
- Falk, K.L., Gershenzon, J., Croteau, R. 1990. Metabolism of Monoterpenes in Cell Cultures of Common Sage (*Salvia officinalis*) - Biochemical Rationale for the Lack of Monoterpene Accumulation. *Plant Physiol.* 93, 1559 - 1567.
- Faria, J. 2007. Produção de voláteis por culturas de raízes transgênicas de *Anethum graveolens*: Influência da regeneração e da capacidade de biotransformação. *Tese de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Figueiredo, A.C., Almendra, M.J., Barroso, J.G., Scheffer, J.J.C. 1996. Biotransformation of monoterpenes and sesquiterpenes by cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Biotechnology letters* 18, 863-868.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C. 2006. Potentialities of Hairy root cultures for in vitro essential oil production. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 2, 478 – 486.
- Figueiredo, A.C.S., Barroso, J.G., Pedro, L.G. 2001. Raízes transgênicas em engenharia metabólica de plantas: produção de voláteis. *Melhoramento* 37, 271 – 280.
- Flores, H.E., Vivanco, J.M., Loyola-Vargas, V.M. 1999. “Radicle” biochemistry: the biology of root specific metabolism. *Trends Plant Sci.* 4, 6:220 - 226.
- Fu, C.-X., Zhao, D.-X., Xue, X.-F., Jin, Z.-P., Ma, F.S. 2005. Transformation of *Saussurea involucreta* by *Agrobacterium rhizogenes*: Hairy root induction and syringin production. *Process Biochemistry* 40, 3789–3794.
- Gartland, J.S., Brasier, C.M., Fenning, T.M., Birch, R., Gartland, K.M.A. 2001. *Ri*-plasmid mediated transformation and regeneration of *Ulmus procera* (English Elm). *Plant Growth Regulation* 33, 123 – 129.

- Gelvin, S.B., 1990. Crown Gall Disease and Hairy Root Disease. *Plant Physiol* 92, 281-285.
- Gibjels, M.J.M., Scheffer, J.J.C., Baerheim Svendsen, A. 1982. Phthalides in the essential oil from roots of *Levisticum officinale*. *Planta Med.* 44, 207-211.
- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C.C., Singh, A., Ward, O.P., Narasua, M. L. 2001. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances* 19, 175 – 199.
- Giri, A., Narasu, M.L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18, 1–22
- Golds TJ, Lee JY, Husnain T, Ghose TK & Davey MR (1991) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the forage legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia* J. Exp. Bot. 42, 1147 – 1157.
- Gómez-Galera, S., Pelacho, A.M., Gene, A., Capell, T., Christou, P. 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Rep* 26, 1689–1715.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., Gantet, P. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 9:341–346
- Gutiérrez-Pesce, P., Taylor, K., Muleo, R., Rugini, E. 1998. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium P. pseudocerasus*) mediated by pRi 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 17, 574 – 580.
- Hadacek, F. 2002. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 4:273–322.
- Hamill, J.D., Lidgett, A.J. 1997. Hairy root cultures – opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. Em: Hairy roots culture and applications. Doran, P.M. ed.. Harwood Academic Publishers. Netherlands. 1 - 22.
- Hao, L., Zhou, L., Xin, 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.
- Hao, L., Zhou, L., Xu, X., Cão, 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, J.B., 1999. Classes and functions of secondary products from plants. Em: Chemical from plants perspectives on plant secondary products. Walton, N.J., Brown, D.E. eds. Imperial College press - World Scientific. London. 1-25.

- Hayat, S., Ali, B., Ahmad, A. 2007. *Salicylic acid: Biosynthesis, metabolism and physiological role in plants*. Em: SALICYLIC ACID: A Plant Hormone. Hayat S. ed. Springer The Netherlands, 1-14.
- Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F. 2001. Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *PNAS Biochemistry* 98, 26:14837 – 14842.
- Hogg, C.L., Svoboda, K.P., Hampson, J.B. and Brocklehurst, S. 2001. Investigation into the composition and bioactivity of essential oil from lovage (*Levisticum officinale* W.D.J. Koch). *The International Journal of Aromatherapy* 11, 3.
- Höschle, B., Jendrossek, D. 2005. Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology* 151, 2277 – 2283.
- 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.
- Hoshino, Y., Tuèrkan, I., Mii, M. 1998. Transgenic bialaphos-resistant snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) produced by *Agrobacterium rhizogenes* transformation. *Scientia Horticulturae* 76, 37 – 57.
- Hu, W.-J., Kawaoka, A., Tsai C.-J., Lung, J., Osakabe, K., Ebinuma, H., Chiang, V.L. 1998. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Plant Biology* 95, 5407–5412
- Hu, Z.-B., Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integartive Plant Biology* 48, 121 – 127.
- Ishihara, K., Hamada, H., Hirata, T., Nakajima, N. 2003. Review - Biotransformation using plant cultured cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 23, 145 – 170.
- Ishizaki, T., Hoshino, Y., Masuda, K., Oosawa, K. 2002. Explants of Ri-transformed hairy roots of spinach can develop embryogenic calli in the absence of gibberellic acid, an essential growth regulator for induction of embryogenesis from nontransformed Roots. *Plant Science* 163, 223-231.
- Jolicoeur, M., Williams, R. D., Chavarie, C., Fortin, J.A., Archambault, J. 1999. Production of *Glomus intraradices* Propagules, an Arbuscular Mycorrhizal Fungus, in an Airlift Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 63, 2:224 – 232.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, J. 2002. *Plant Systematics – a phylogenetic approach*. Second Edition, Sinauer Associates. Inc. Publishers.

- Kim, S., Hopper, E., Yjortso, M. 1995. Hairy Root Growth Models: Effect of Different Branching Patterns. *Biotechnol. Prog* 11, 178 – 186.
- King, A., Dickinson, J.R. 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 16, 499 – 506.
- Koike, Y., Hoshino, Y., Mii, M., Nakano, M. 2003. Horticultural characterization of *Angelonia salicariifolia* plants transformed with wild-type strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* 21, 981–987.
- Kuzovkina, I.N., Al'terman, I.E., Karandashov, V.E. 2004. Genetically Transformed Plant Roots as a Model for Studying Specific Metabolism and Symbiotic Contacts of the Root System. *Biology Bulletin* 31, 3: 255 – 261.
- Lambert, C., Tepfer, D. 1991. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting. *Bio/Technol.* 9, 80-83.
- Lanoue, A., Shakourzadeh, K., Marison, I., Laberche, J., Christen, P., Sangwan-Norreel, B., Boitel-Conti, M. 2004. Occurrence of Circadian Rhythms in Hairy Root Cultures Grown Under Controlled Conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 6:722 – 729.
- Lawless, J. 1995. The illustrated encyclopaedia of essential oils. In: Element, Shaftesbury, Dorset, p. 165.
- Lemcke, K., Schmülling, T. 1998. Gain of function assays identify non-rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA that alter plant morphogenesis or hormone sensitivity. *The Plant Journal* 15, 3:423 – 433.
- Lickens, S.T., Nickerson, G.B. 1964. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.*, 1 – 13.
- Limberger, R.P., Ferreira, L., Castilhos, T., Aleixo, A.M., Petersen, R.Z., Germani, J.C., Zuanazzi, J.A., Fett-Neto, A.G., Henriques, A.T. 2007. The ability of *Bipolaris sorokiniana* to modify geraniol and (–)-alpha-bisabolol as exogenous substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 552 – 555.
- Lourenço, P.M.L., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Oliveira, M.M., Deans, S.G., Schefer, J.J.C. 1999. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. *Phytochemistry* 51, 637 – 642.
- Luan, F., Mosandl, A., Münch, A., Wü, M. 2005. Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, E/Z-isomerization, oxidation and glycosylation. *Phytochemistry* 66, 295 – 303.
- Lücker J. 2002. Metabolic Engineering of Monoterpene Biosynthesis in Plants. Proefschrift Wageningen University.

- Lücker, J., Bouwmeester, H.J., Aharaoni, A. 2007. Chapter 9 – Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. Em: Applications of Plant Metabolic Engineering. *Verpoorte R. et al. eds.* Springer, 219 – 236.
- Luo, J.-P., Jiang, S.-T., Pan, L.-J. 2001. Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzyme activities. *Plant Science* 161, 125 – 132.
- Malarz, J., Stojakowska, A., Kisiel, W. 2007. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Cichorium intybus*. *Acta Physiol Plant* 29, 127–132.
- Marasco, E.K., Dannert, C.S. 2007. Biosynthesis of plant natural products and characterization of plant biosynthetic pathways in recombinant microorganisms. Em: Applications of Plant Metabolic Engineering. R. Verpoorte et al., eds. Springer, 1 – 43.
- Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, T.S., Newman, J.D., Keasling, J.D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature biotechnology* 21, 7:796 – 802.
- Miyazawa, M., Kawazoe, H., Hyakumachi, M. 2003. Biotransformation of l-menthol by twelve isolates of soil-borne plant pathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*) and classification of fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78, 620 –625.
- Miyazawa, M., Kumagae, S., Kameoka, H. 1999. Biotransformation of (+)- and (-)-Menthol by the Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*). *J. Agric. Food Chem* 47, 3938-3940.
- Morrison, R., Boyd, R. 1996. Química Orgânica. 13ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian. 673 - 740.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473.
- Noda, T., Tanaka, N., Mano, Y., Nabeshima, S., Ohkawa, H., Matsui, C. 1987. Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes* infection. *Plant Cell Reports* 6, 283 – 286.
- 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, 9: 433 – 440.
- Ooms, G., Karp, A., Bnrrell, M. M., Twell, D., and Roberts, J. 1985. Genetic modification of potato development using Ri T-DNA. *Theor. Appi. Genet.* 70, 4404-4406.

- Otani, M., Mii, M., Handa, T., Kamada, H., Shimada, T. 1993. Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Sci* 94, 151 – 159.
- Pereira, I.D.P. 1999. Raízes transgênicas de *Pimpinella anisum*: otimização da produção de voláteis. Estágio profissionalizante. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Peres, L.E.P., Morgante, P.G., Vecchi, C., Kraus, J.E., Sluys, M.-A. 2001. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65, 37 – 44.
- Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K.A., Tempé, J. 1987. Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: A system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 207, 245–250.
- Phelep, M., Petit, A., Martin, L., Duhoux, E., Tempé, J. 1991. Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina verticillata* Lam. *Bio/Technology* 9, 461-466.
- Picoli, E.A.T., 2002. In vitro morphogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Embú). *Genet. Mol. Biol.* 25, 4.
- Polunin, M., Robbins, C. 1993. A farmácia natural – guia de medicamentos naturais – Enciclopédia Ilustrada. Editora Civilização. Alemanha.
- Pombeiro, A. 1983. Técnicas e operações unitárias em química laboratorial. Fundação Calouste Gulbenkian. Portugal. pp. 1068.
- Poulev, A., O'Neal, J.M., Logendra, S., Pouleva, R.B., Timeva, V., Garvey, A.S., Gleba, D., Jenkins, I.S., Halpern, B.T., Kneer, R., Cragg, G.M., Raskin, I. 2003. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 2542–2547.
- Ramakrishnan, D., Luyk, D., Curtis, W.R. 1999. Monitoring Biomass in Root Culture Systems *Biotechnology and Bioengineering* 62, 6.
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20, 101 – 153.
- Rhodes, M.J., Parr, A.J., Walton, K.J. 1997. Studies of secondary pathways in transformed roots engineering. Em: Hairy roots culture and applications. Doran, P.M. ed. Harwood Academic Publishers. Netherlands. 31-40.
- Robins, R.J., 1998. The application of root cultures to problems of biological chemistry. *Natural Product Reports*, 549 -570.
- Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., Eisenreich, W. 2002. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *PNAS* 99, 3: 1158 – 1163.

- Rohmer, M. 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* 16, 565–574.
- Saitou, T., Kamada, H., Harada, H. 1992. Light Requirement for Shoot Regeneration in Horseradish Hairy Roots. *Plant Physiol.* 99, 1336 – 1341.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34, 3 – 21.
- Santos, P.A.G., Figueiredo, A.C., Oliveira, M.M., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Deans, S.G. & Scheffer, J.J.C. 2005. Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). *Plant Science* 168, 1089-1096.
- Saxena, G., Banerjee, S., Laiq-ur-Rahman, Verma, P.C., Mallavarapu, G.R., Kumar, S. 2007. Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri-insertion for improved essential oil quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90, 215 – 223.
- Schenk, R.O., Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50, 199 – 204.
- Schrader, J. 2007. *Microbial Flavour Production*. Em: *Book Flavours and Fragrances*. Publisher Springer Berlin Heidelberg, 507-574
- Schrader, J., Etschmann, M.M.W., Sell, D., Hilmer, J.M., Rabenhorst, J. 2004. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. *Biotechnology Letters* 26, 463 – 472.
- Schripsema, J., Meijer, A.H., Iren, F., Hoopen, H.J.G., 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, 1:55 – 64.
- Segebrecht, S. & Schilcher, H. 1988. Ligustilide: Guiding component for preparations of *Levisticum officinale* roots. *Plant Med.* 55, 572-573.
- Seigler, D.S. 1998. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. United States of America.
- Shanks, J.V., Morgan, J. 1999. Plant hairy root culture. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 151 – 155.
- Shen, W.H., Petit, A., Guern, J., Tempé, J. 1988. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3417-3421.
- Shimoda, K., Kondo, Y., Nishida, T., Hamada, H., Nakajima, N., Hamada, H. 2006. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry* 67, 2256 – 2261.

- Shrawat, A.K., Becker, D., Lörz, H. 2007. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 172, 281–290.
- Singer, A.C., Crowley, D.E., Thompson, I.P. 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and Biotransformation. *Trends in Biotechnology* 21, 3.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K. 2007. Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology* 27, 29 – 43.
- Stahl-Biskup, E. 1987. Monoterpene Glycosides, State-of-the-Art. *Flavour and Frangance* 2, 75-82.
- Staniszewskaa, I., Królicka, A., Maliński, E., Łojkowskab, E., Szafranek, J. 2003. Elicitation of secondary metabolites in in vitro cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 565 – 568.
- Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R-J., Chiurazzi, M., Gresshoff, P.M. 1997. High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany* 48, 312:1357 - 1365
- Subotic, A., Budimir, S., Grubisic, D., Momcilovic, I. 2003. Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaurea erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biologia Plantarum* 47, 4: 617-619.
- Szebeni-Galambosi, Z., Galambosi, B. & Holm, Y. 1992. Growth, yield and essential oil of lovage grown in Finland. *J. Essent. Oil Res.* 4, 375-380.
- Takechi, H., Miyazawa, M. 2006. Biotransformation of geraniol by larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of oleo science* 55, 3:143 – 149.
- Tone, S., Taya, M., Kino-oka, M. 1997. Alteration of metabolite formation and morphological properties of hairy roots by environmental stimuli. Em: Hairy roots culture and applications Doran, P.M. ed. Harwood Academic Publishers. Netherlands. 65 - 72.
- Toulemonde, B. & Noleau 1988. Volatile constituents of lovage (*Levisticum officinale* Koch.). Em: Flavor and fragrances: A world perspective. Proceedings of the 10th International congress of essential oils, fragrances and flavors. Lawrence, B.M., Mookherjee, B.D., Willis, B.J. eds., Elsevier. Amsterdam. 641 - 657.
- Trasarti, A.F., Marchi, A.J., Apesteguía, C.R. 2004. Highly selective synthesis of menthols from citral in a one-step process. *Journal of Catalysis* 224, 484 – 488.
- Trulson, A.J., Simpson, R.B., Shahin, E.A. 1986. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. *Theor Appl Genet* 73, 11 – 15.
- 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.

- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. 2003. Bioflavoring and beer refermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 62, 140 –150.
- Verpoorte, R., Memelink, J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Plant biotechnology* 13, 181–187.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J., 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 1, 13–25.
- Verpoorte, R., Heijden, R., Memelink, J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* 9, 323 – 343.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., Memelink, J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* 9, 323 – 343.
- Villena, M.A., Iranzo, J.F.U., Pérez, A.I.B. 2007. Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 420 – 425.
- 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.
- Vurro, M. 2007. Benefits and risks of using fungal toxins in biological control. Em: Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. Vurro, M., Gressel, J. eds. Springer, 53 – 74.
- Weisshaar, B., Jenkins, G. 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology Physiology and metabolism* 1, 251 – 257.
- White, F.F., Taylor, B.H., Huffman, G.A., Gordon, M.P., Nester, E.W. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol.* 164, 1:33–44.
- Wink, M. 1988. Plant breeding – Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 75, 225–233.
- Wink, M. 1997. Em: The plant vacuole, *Advances in Botanical Research Incorporation Advances in Plant Pathology*. Leigh. R.A., Sanders, D., Callow, J.A. eds.
- Wolken, W.A.M., Tramper, J., Werf, M.J., 2002. Toxicity of Terpenes to Spores and Mycelium of *Penicillium digitatum*. *Biotechnology and Bioengineering* 80, 6:685 – 690.
- Wolken, W.A.M., Werf, M.J. 2001. Geraniol biotransformation-pathway in spores of *Penicillium digitatum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 731 – 737.
- Xu, Z.Q., Jia, J.F. 1996. The reduction of chromosome number and the loss of regeneration ability during subculture of hairy root cultures of *Onobrychis viciuefolia* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A, *Plant Science* 120, 107 – 112.

- Yang DC, Choi YE (2000) Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Panax ginseng*. Plant Cell Rep 19, 491 – 496.
- Yazaki, K. 2004. Natural Products and Metabolites. Em: Handbook of Plant Biotechnology. Christou, P., Klee, H. eds.
- Yu, J.-H., Keller<sup>1</sup>, N. 2005. Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. Annu. Rev. Phytopathol 43, 437 – 58.
- Yu, S.G., Hildebrahd<sup>t</sup>, L.A., Elson, C.E., 1995. Geraniol, an Inhibitor of Mevalonate Biosynthesis, Suppresses the Growth of Hepatomas and Melanomas Transplanted to Rats and Mice. American Institute of Nutrition Journal of nutrition, 2763 – 2767.
- Zdravković-Korać, S., Muhovski, Y., Druart, P., Čalić, D., Radojević, L., 2004. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer to *Aesculus hippocastanum* L. and the regeneration of transformed plants. Plant Cell Rep 22, 698–704.
- Zhong, J.-J. 2001. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. Em: Advances in biochemical engineering biotechnology. Zhong, J.-J., Scheper, T. eds. Springer 72, 1 – 24.
- Zhu, W., Lockwood, G.B. 2000. Enhanced biotransformation of terpenes in plant cell suspensions using controlled release polymer. *Biotechnology Letters* 22, 659 – 662.
- Zidorn, C., Johrer, K., Ganzera, M., Schubert B., Sigmund, E.M., Mader, J., Greil, R., Ellmerer, E.P., Stuppner, H. 2005. Polyacetylenes from the Apiaceae Vegetables Carrot, Celery, Fennel, Parsley, and Parsnip and Their Cytotoxic Activities. J. Agric. Food Chem. 53, 2518 – 2523.
- Zschocke, S., Liu, J., Stuppner, H., Bauer, R., 1998. Comparative study of roots of *Angelica sinensis* and related Umbelliferous drugs by Thin Layer chromatography, High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. Phytochemical Analysis 9, 283-290.

[1] [http://www.uni-graz.at/~katzner/engl/Levi\\_off.html](http://www.uni-graz.at/~katzner/engl/Levi_off.html)

[2] <http://www.rootec.com>

[3] <http://www.higromicin.net>

## 6. ANEXO

Tabela 2.1. Composição química do meio SH.

<b>Composição</b>	<b>Concentração (mg.l<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
CaCl <sub>2</sub>	151,00
KNO <sub>3</sub>	2500,00
MgSO <sub>4</sub>	195,05
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	300,00
<b>Micronutrientes</b>	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,10
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,20
FeNaEDTA	19,80
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5,00
KI	1,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,10
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,00
<b>Vitaminas</b>	
Mio-inositol	1000,00
Ácido nicotínico	5,00
Piridoxina HCl	0,50
Tiamina HCl	5,00

Condições de autoclavagem: 120°C durante 25 min

Sacarose: 30 g.ml<sup>-1</sup>

pH: 5,5

Tabela 2.2. Composição química do meio MS

<b>Composição</b>	<b>Concentração (mg.l<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>	
CaCl <sub>2</sub>	332,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00
MgSO <sub>4</sub>	180,54
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00
<b>Micronutrientes</b>	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
KI	0,83
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,90
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60
<b>Vitaminas</b>	
Glicina	2,00
Mio-inositol	100,00
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina HCl	0,50
Tiamina HCl	0,10

Condições de autoclavagem: 120°C durante 25 min

Agar: 8g.l<sup>-1</sup>

pH: 5,5

Sacarose: 30g.l<sup>-1</sup>