

ANA CARLA OLTRAMARI

**ENGENHARIA DO METABOLISMO DE CÉLULAS DE CANELA SASSAFRÁS
(*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer): ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA
CELULAR E DA SÍNTESE DE SAFROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Co-Orientadores: Profa. Dra. Ana Maria Viana
Prof. Dr. Ênio Luiz Pedrotti

FLORIANÓPOLIS, 2002

Oltramari, Ana Carla.

Engenharia do metabolismo de células de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer): Análise da produção de biomassa celular e da síntese de safrol / Ana Carla Oltramari. -- Florianópolis, 2002.

120p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Canela sassafrás. 2. *Ocotea odorifera* 3. Safrol. 4. Cultura de células. 5. Metabolismo secundário

**“Engenharia do Metabolismo de Células de Canela Sassafrás
(*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer): Análise da Produção de
Biomassa Celular e da Síntese de Safrol”**

POR

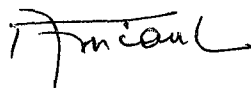
ANA CARLA OLTRAMARI

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

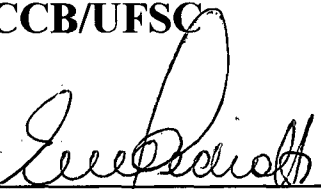
Comissão Examinadora:



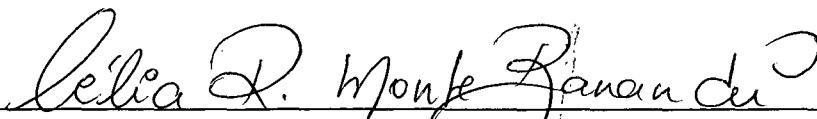
**Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Orientador – FIT/CCA/UFSC**



**Prof.ª Dr.ª Ana Maria Viana
BOT/CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Ênio Luiz Pedrotti
FIT/CCA/UFSC**



**Prof.ª Dr.ª Célia Regina Monte Barardi – MIP/CCB/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

Florianópolis, Fevereiro de 2002.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Marcelo Maraschin, pela orientação e amizade durante todos os anos de trabalho.
- Aos Prof. Ana Maria Viana e Ênio Luiz Pedrotti, pelas sugestões e incentivos.
- Aos colegas de trabalho do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, em especial Renata Passos, Patrícia Sibila Araújo e Josiane M.O. Duarte da Silva pelo auxílio nos trabalhos práticos.
- A minha família, pela paciência e apoio durante os anos de estudo.
- Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Obtenção de metabólitos secundários <i>in vitro</i>	3
2. Otimização da produção de metabólitos secundários.....	5
3. Monitoramento do metabolismo celular por RMN.....	13
CAPÍTULO II – ANÁLISE HISTÓRICA E DE MERCADO DA ATIVIDADE EXTRATIVISTA DA MADEIRA E DO ÓLEO ESSENCIAL DA CANELA SASSAFRAS (<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer) NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	14
1. Introdução.....	15
2. Material e Métodos.....	17
3. Resultados e Discussão.....	18
4. Conclusões.....	23
5. Referências Bibliográficas.....	25
CAPÍTULO III - ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS DA CANELA SASSAFRÁS. I - CULTURA DE EMBRIÕES IMATUROS E ORGANOGÊNESE.....	30
1. Propagação vegetativa : limitações de uso.....	33
2. Estudos de cultivo <i>in vitro</i>	34
3. Considerações Finais.....	40
4. Referências Bibliográficas.....	41

CAPÍTULO IV – ANÁLISE DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE CANELA SASSAFRÁS (<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer) POR ¹ H-RMN.....	42
1. Introdução.....	43
2. Material e Métodos.....	45
3. Resultados e Discussão.....	46
CAPÍTULO V – ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DO METABOLISMO DE CARBONO EM CULTIVOS CELULARES DE CANELA SASSAFRÁS (<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer - <i>Lauraceae</i>).....	58
1. Introdução.....	59
2. Material e Métodos.....	61
3. Resultados e Discussão.....	62
CAPÍTULO VI – ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE CULTURAS CELULARES ESTÁTICAS DE <i>Ocotea odorifera</i> EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM ANA e 6-BAP.....	75
1. Introdução.....	76
2. Material e Métodos.....	78
3. Resultados e Discussão.....	80
CAPÍTULO VII – ANÁLISE DO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE CANELA SASSAFRÁS (<i>OCOTEA ODORIFERA</i> (VELL.) ROHWER) POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	91
1. Introdução.....	92
2. Material e Métodos.....	94
3. Resultados e discussão.....	95
CAPÍTULO VIII – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Amd = Amido

ANA = ácido naftalenoacético

BAP = 6-benzilaminopurina

CG-EM = Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Cin = Cinetina

CS₁ = Oltramari, 1998

Fru = Frutose

Glc = Glucose

Lac = Lactose

MS = Murashige & Skoog, 1962

Picloram = ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico

¹H-RMN = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Suc = Sacarose

WPM = Loyd & McCown, 1980

2,4-D = Ácido 2,4 diclorofenóxiacético

RESUMO

A canela sassafrás é uma espécie lenhosa com ecossistema preferencial na Floresta Ombrófila Densa. A nível industrial, a extração do óleo essencial de sassafrás a partir de sua madeira teve início em meados dos anos 40 no Estado de Santa Catarina, devido ao seu alto teor de safrol. A redução do volume de biomassa, devido à não sustentabilidade do modelo de produção utilizado (extrativismo), foi determinante para que a espécie fosse levada a uma condição crítica de sobrevivência, com implicações significativas para sua exploração comercial. O presente estudo teve como objetivo a seleção e a caracterização de linhagens celulares de canela sassafrás como sistema de produção de safrol. Culturas celulares estáticas, oriundas de tecido foliar, foram inoculadas em meio de cultura suplementado com sacarose, glucose, frutose, amido ou lactose (3 g%). Os resultados demonstraram a existência de somaclones com potenciais de metabolização para os carboidratos em estudo, com um perfil linear de dissimilação de carbono. A análise da metabolização de carbono em extratos celulares por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$), revelou a ocorrência de sinais de $\alpha\text{-D-Glc}$ e $\beta\text{-D-Glc}$, cuja intensidade aumentou segundo um modelo quadrático ao longo do período de cultivo das linhagens celulares, em meio de cultura suplementado com Suc. As linhagens cultivadas em meio contendo Glc apresentaram uma máxima concentração endógena dos anômeros $\alpha\text{-}$ e $\beta\text{-D-Glc}$ 5 dias após o subcultivo. Sinais característicos de lactose não foram observados nos espectros de $^1\text{H-RMN}$, sugerindo a existência de metabolização extracelular deste dissacarídeo, provavelmente por via enzimática ($\beta\text{-galactosidase}$). A análise da cinética de incremento de biomassa das linhagens celulares em meio de cultura suplementado com ANA e BAP foi avaliada pela obtenção do peso fresco e seco e das curvas de dissimilação de carbono. Um perfil de incremento de biomassa segundo um modelo sigmoidal foi obtido quando analisado o incremento de peso fresco dos cultivos. Contrariamente, a variação de peso seco das células comportou-se segundo um modelo quadrático para a maioria dos tratamentos de reguladores de crescimento. O maior incremento de peso fresco (2,72 g) e peso seco (122,75 mg) foi observado em meio de cultura acrescido de 0,5 μM de ANA, indicando uma correlação positiva entre as variáveis utilizadas para análise do crescimento. As curvas de dissimilação revelaram perfis de incremento de biomassa segundo modelos sigmoidal, quadrático e linear, dependendo da composição do meio de cultura. A biossíntese de safrol e outros compostos do metabolismo secundário foi monitorada ao longo das gerações de cultivo das linhagens celulares por CG-EM. A análise dos dados de composição de metabólitos secundários das frações orgânicas dos cultivos celulares mantidos em meio CS_1 , revelou a existência de perfis distintos ao longo das gerações de cultivo. Os dados demonstraram que

a linhagem celular em estudo apresentou-se estável quanto à síntese de safrol. Células mantidas em meio de cultura isento de reguladores de crescimento apresentaram capacidade de síntese de safrol ao longo do período de cultivo.

ABSTRACT

Canela sassafras is a hardwood plant native to Atlantic Rainforest, in South Brazil. Its lignocellulosic biomass extraction was initiated on an industrial scale in the middle 40's in Santa Catarina State, due to the high safrole content. A decrease in the extracted biomass was observed in the early 90's, since the production system used (extractivism) was not sustainable. This factor was decisive to lead the species to a critical survival condition, with serious implications in respect to its commercial exploitation. The present study aimed at selecting and the characterization of *canela sassafras* cell lines, as a production system for safrol. Static cell cultures, originated from leaf tissue, were transferred to culture medium containing sucrose, fructose, starch or lactose (3 g%). The results showed the existence of somaclones with potentials of metabolization for the carbohydrates in study, with an linear profile for carbon dissimilation. The analysis of carbon metabolization in cell extracts for nuclear magnetic resonance spectroscopy of hydrogen ($^1\text{H-RMN}$), revealed typical signals for $\alpha\text{-D-Glc}$ e $\beta\text{-D-Glc}$, whose intensity increased according to a quadratic model during the experimental period, in culture medium supplemented with Suc. The cell lines cultivated in medium containing Glc as single carbon source showed a maximum intracellular concentration of the anomers $\alpha\text{-}$ e $\beta\text{-D-Glc}$ five days after the subcultivation. Typical signals of lactose were not detected in the $^1\text{H-RMN}$ spectra, suggesting the existence of extracellular metabolization of that disaccharide, probably by enzymatic way ($\beta\text{-galactosidase}$). The analysis of the increment of biomass for the cell lines in the culture medium supplemented with NAA and BAP was performed by measuring cell fresh weight, dry weight and the carbon dissimilation curves. The biomass increment followed a sigmoidal and a quadratic model, respectively for cell fresh weight and cell dry weight of cell for the most of the growth regulator treatments. The most increment of fresh weight (2,72 g) and dry weight (122,73 mg) was observed in culture medium supplemented with 0,5 μM NAA, indicating an positive correlation between the variables used for analysis of growth. The dissimilation curves of the cell line showed sigmoidal, quadratic and linear profiles, depending on the composition of the culture medium. The safrol biosynthesis and another composts of secondary metabolism were evaluated over generations of the cell lines by GC-MS. The analysis of the spectra of the organic fractions of the cell line cultured in CS_1 medium demonstrated the existence of distinct chemical profiles along the time course experiment. Furthermore, GC-MS data show that cell line in study was stable as to safrol synthesis along 20 generations and revealed the existence of autotrophic somaclones in respect to cell growth regulatores which were able in synthesizing safrol.

INTRODUÇÃO GERAL

A canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) é uma espécie lenhosa pertencente à família *Lauraceae*. No Brasil, sua distribuição ocorre entre as latitudes 8°45'N [Pernambuco] e 31°12'S [Rio Grande do Sul] e até de 33°52' a 59°09' de longitude oeste (Salomão *et al.*, 1992). No Estado de Santa Catarina, sua ocorrência é maior no ecossistema da Floresta Ombrófila Densa [Floresta Atlântica], especialmente no Vale do Rio Itajaí, sendo menos freqüente na Floresta Ombrófila Mista [Floresta de Araucária] (Reitz, *et al.*, 1978).

A biomassa de raízes, cascas e folhas foi amplamente utilizada pela indústria para extração de óleo essencial, o qual apresenta altos teores de safrol, um composto alilbenzênico de grande importância econômica. Como exemplo disso, esse composto tem sido utilizado como aromatizante nas indústrias de bebidas, cosméticos, alimentos e de medicamentos. A partir do safrol, dois derivados são obtidos: a heliotropina, que é um fixador de aroma, e o butóxido de piperonila, elemento essencial na produção de inseticidas biodegradáveis (Embrapa, 1998). A justificativa para a exploração dessa espécie advém do fato que, em média, 80% da essência de sassafrás ser constituída por safrol. No entanto, outros compostos de interesse das indústrias química e farmacêutica têm sido identificados na fração de óleo essencial dessa espécie.

Uma das principais restrições à propagação vegetativa dessa espécie é o seu grande período de juvenilidade. O tempo necessário para a produção das primeiras sementes é variável entre plantas matrizes e entre regiões, contudo, o início do período reprodutivo ocorre, em média, entre os 25 e 40 anos. Essa característica, na prática, se traduz por uma dificuldade para a produção de mudas, de modo que fique garantido o reflorestamento e/ou repovoamento de áreas de ocorrência dessa espécie, comprometendo sua exequibilidade do ponto de vista tecnológico. Um segundo agravante refere-se à quantidade de material seminífero produzido por planta matriz, a qual é considerada baixa, (~2.000 sementes/ano/planta matriz de 100 anos de idade). Além desse fator, as sementes apresentam dificuldades na germinação e são intensamente atacadas por roedores, insetos e fungos, diminuindo a viabilidade desses propágulos (Pedrotti, comunicação pessoal).

A propagação vegetativa por estaquia apresenta baixa eficiência (Molinari, 1989), enquanto o poder germinativo apresenta resultados aleatórios de 30 a 70 % (Carvalho, 1994). Resultados preliminares de micropropagação dessa espécie a partir de segmentos nodais, demonstraram ser uma alternativa interessante, ainda que se façam necessários estudos mais detalhados, no que se refere à otimização do protocolo de micropropagação (Duarte da Silva *et al.*, 2001).

Tendo em vista estas limitações, técnicas de cultura de células e tecidos vegetais se constituem em ferramentas que podem ser aplicadas à micropropagação em larga escala, bem como no desenvolvimento de linhagens celulares com potencial de produção de compostos bioativos (safrol, e.g.) *in vitro*.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS *IN VITRO*

Nas últimas décadas tem crescido o interesse científico pela cultura de tecidos de plantas e no desenvolvimento de tecnologias destinadas à produção de fitoquímicos.

A obtenção de compostos de interesse farmacêutico e químico via culturas de células e tecidos apresenta-se como alternativa, uma vez que para a maioria dos casos, a tecnologia necessária encontra-se disponível e apresenta viabilidade. Culturas de células *in vitro* têm permitido não apenas a realização de estudos relativos à síntese de compostos, como também o incremento na produção destes, quando comparados com a planta inteira, em condições específicas de cultivo. Independente de condições climáticas, ou circunstâncias políticas, um fluxo constante de produtos de qualidade é assegurado, sem o risco de extinção da espécie de interesse como decorrência de uma ação extrativista exacerbada (Maraschin, 1998).

Exemplos de produção *in vitro* de metabólitos secundários que apresentam níveis de síntese superiores em relação a planta intacta, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Metabólitos secundários produzidos por cultura de tecidos de plantas em concentrações superiores àsquelas encontradas em plantas intactas.

Compostos	Espécies	Teor (g/l)	Razão cultivo/ Planta intacta
Antraquinonas	<i>Gallium aparine</i>	0,43	20
	<i>Morinda citrifolia</i>	2,5	8
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	1,4	2,6
	<i>Thalictrum minus</i>	0,8	1000
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	-	92
Saponinas	<i>Panax ginseng</i>	-	6,7
Jatorrizina	<i>Disocoreophyllum cumminsii</i>	-	100
Ác. Rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	3,6	5
Chiconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	1,5 - 4,0	14
Tripdiolida	<i>Tryterigium wilfordii</i>	0,004	36
Ubiquinona 10	<i>Nicotiana tabacum</i>	-	173
Vomileína	<i>Rauwolfia serpentina</i>	0,057	51

(Fontanel e Tabata, 1987); (Towers e Ellis 1993)

O potencial de alguns sistemas de cultura de plantas na produção de compostos de interesse farmacológico tem sido demonstrado, sendo que muitos desses sistemas podem ser uma alternativa comercial real para a produção de drogas.

Existe pelo menos um sistema comercial (Mitsui Petrochemical Industries, Japão) para a produção de chiconina através da cultura *in vitro* de suspensões celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, a uma taxa de 1,5 g/l, o que representa um índice 15 vezes superior aquele encontrado na planta intacta (Fujita *et al.*, 1981). Todavia, este exemplo ainda configura uma exceção quanto à exploração comercial de metabólitos secundários oriundos de culturas celulares. O patenteamento de processos biotecnológicos de produção de esteviosídeo (*Stevia rebaudiana*), berberina (*Coptis japonica*), reserpina (*Rauwolfia serpentina*) e ágar (algas), via culturas celulares tem sido requerido no Japão. No Reino Unido, a produção de nicotina a partir de culturas de raízes de *Nicotiana tabacum* também encontra-se patenteadada (Staba, 1980). Além dos sucessos e vantagens comerciais, culturas *in vitro* de células vegetais têm gerado significativas contribuições ao entendimento dos processos de biossíntese de compostos de interesse científico e têm firmado seu potencial como fonte de enzimas de significativo valor econômico, tais como papaína, bromelina, ficina e α e β amilases (Hay *et al.*, 1988).

2. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Segundo Verpoorte (1996), para aumentar a produção de metabólitos secundários, distintas estratégias podem ser usadas:

- seleção de linhagens celulares com alta produção;
- manipulação epigenética;
- engenharia metabólica.

2.1 SELEÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

A seleção de células isoladas com alto potencial produtivo, visa reduzir a possibilidade de heterogeneidade nos subcultivos, porém não a elimina (Ohta e Verpoorte, 1992). Este método, quando comparado à seleção de agregados celulares, têm gerado um menor índice de variação somaclonal, ao menos nas primeiras gerações. Stafford (1986) e Evans *et al.* (1987) sugerem que a instabilidade genética observada em linhagens celulares, independente do método de seleção, advém do fato de que o material de origem é intrinsecamente instável. De fato, a instabilidade na produção de metabólitos secundários nas culturas celulares parece ser a regra. Como exceções, uma linhagem estável de *Euphorbia milli* foi selecionada por Yamamoto *et al.* (1982), acumulando antocianinas em concentrações sete vezes superiores àquela encontrada no calo de origem. A manutenção de características agronomicamente importantes em somaclones de tomateiro e cana-de-açúcar foi viabilizada através da propagação vegetativa de genótipos selecionados *in vitro* (Evans *et al.*, 1987).

A exploração da variabilidade genética contida nos somaclones requer instrumentos de identificação bastante precisos para ser mais eficientemente avaliada. Os processos de seleção de linhagens comumente empregados em culturas celulares são de eficiência relativa, devido às ocorrências de falta de uniformidade comportamental. Além disso, essas práticas demandam tempo, trabalho intenso e custo econômico elevado. A referida heterogeneidade de comportamento ocorre porque uma linhagem vem a ser uma população de células que expressa algumas características definidas, ainda que cada célula possa não ser idêntica a outra (Staba, 1980; Maraschin, 1998).

A utilização de linhagens celulares como fonte de metabólitos secundários deve levar em conta, de modo corrente, a possibilidade de que clones de alta produtividade isolados e subcultivados podem, ao longo do tempo, expressar um declínio em seus níveis de produtividade após uma série de repicagens, fazendo-se necessária uma constante resseleção. Contudo, em muitos destes casos, os clones não derivaram de uma célula única (Funk *et al.*, 1987). A clonagem de células baseia-se em dois métodos amplamente usados: a clonagem de células isoladas (*single-cell cloning*) e a clonagem de pequenos agregados celulares (Fontanel e Tabata, 1987).

Devido aos problemas com estabilidade de uma linhagem celular, é necessário desenvolver métodos para estocar linhagens de células selecionadas por períodos prolongados, nesses casos as linhagens podem ser criopreservadas.

2.2. MANIPULAÇÃO EPIGENÉTICA

A manipulação epigenética considera, por exemplo, a otimização do meio de cultura, a manipulação de fatores de ambiente (intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura, CO₂, O₂, e.g.), a influência do nível de diferenciação celular, a adição de inibidores e precursores ao meio de cultura e a elicitación (Verpoorte e Maraschin, 2001).

2.2.1. Otimização do Meio de Cultura

A otimização da composição do meio de cultura se mostra uma estratégia efetiva para a obtenção de incrementos na produtividade de metabólitos secundários.

O meio de cultura pode ser influenciado por diversos fatores e, entre os mais importantes, podem ser considerados: tipos e concentrações de nutrientes minerais e fitorreguladores, concentrações de nitrogênio reduzido e/ou oxidado, fontes de vitaminas, aminoácidos, complexos orgânicos, pH do meio de cultura, condições ambientais externas (luz, fotoperíodo e umidade relativa) e internas (tamanho do frasco, constituição física, volume de meio de cultura e as trocas atmosféricas).

Entretanto, um meio de cultura que ofereça condições ótimas ao incremento de biomassa celular é, via de regra, antagônico à síntese do(s) metabólito(s) de interesse. Para

superar esse problema, tem sido proposto um sistema de cultivo em dois estágios. Nesta abordagem, as células são cultivadas em condições que priorizam o incremento de biomassa durante o primeiro estágio, enquanto no segundo estágio as condições de cultivo favorecem a síntese dos compostos de interesse. Do ponto de vista bioquímico, a geração e o acúmulo de metabólitos secundários, em dado momento da cultura, é função de um balanço que envolve os processos de biossíntese, transformação e degradação destes compostos (Mantell e Smith, 1983).

A) Fitorreguladores

Alguns fitorreguladores agem como fortes indutores do crescimento e multiplicação celular, porém inibem em maior ou menor grau o acúmulo de metabólitos secundários. Como exemplo disto, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), age como repressor do metabolismo secundário em culturas de células de *Catharanthus roseus*, mais especificamente inibindo a síntese de alcalóides indólicos monoterpênicos (Whitmer *et al.*, 1998). Da mesma forma, a utilização de Picloram (Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) como promotor de crescimento em culturas celulares de *Taxus* sp. (Ketchum e Gibson, 1996), atuou de forma negativa, na concentração de 10 µM, sobre a biossíntese de taxol (Furmanowa *et al.*, 1997). Todavia, em muitos casos, a utilização de reguladores de crescimento pode aumentar a síntese de metabólitos secundários, como observado em culturas de *Morinda elliptica*, onde a melhor condição para a produção de biomassa e de antraquinonas foi encontrada em meio de cultura MS suplementado com 0,5 mg/l de ANA e 0,5 mg/l de Cinetina (Abdullah *et al.*, 1988). Culturas de células em suspensão de *Rubia cordifolia*, mantidas em meio de cultura suplementado com 0,6 mg/l de ANA, apresentaram aumento de produção de antraquinonas (Suzuki *et al.*, 1984). De modo similar, em culturas celulares de *Taxus cuspidata* a combinação de AIA (ácido indolacético) e BAP (6-benzilaminopurina) promoveu incrementos na síntese de taxol (Ketchum e Gibson, 1996).

A composição de nutrientes minerais do meio de cultura e os reguladores de crescimento desempenham papéis importantes e similares. Conduzir experimentos para demonstrar que os reguladores de crescimento possuem efeito na produção de metabólitos

secundários, quando o meio de cultura ideal é desconhecido, pode não permitir a otimização dessa avaliação.

B). Fontes de carbono

As células cultivadas *in vitro* são usualmente heterotróficas quanto à capacidade de síntese de promotores de crescimento, em níveis adequados à manutenção do processo. Da mesma forma, a maioria das culturas expressam esta característica no que concerne à produção de compostos orgânicos via fotossíntese. Por esta razão, se faz necessária a adição de carboidratos ao meio de cultura como fonte de carbono e energia (Maraschin, 1988).

Diversos estudos têm demonstrado que a substituição da fonte de carbono no meio de cultura pode se constituir em estímulo à síntese de metabólitos secundários de interesse. As culturas celulares, têm sido mantidas usualmente em meio contendo sacarose ou glucose, em concentrações que variam entre 2 a 5 g%. Um grande número de fontes de carbono tem sido testado quanto à habilidade em sustentar o crescimento de cultura de células vegetais. Os estudos revelam uma grande variação destes compostos quanto à sua fonte, estrutura, propriedades e peso molecular (Stepan-Sarkissian e Fowler, 1986; Schripsema *et al.*, 1991).

Segundo Schripsema *et al.* (1991) os meios de indução da síntese de alcalóides indólicos terpenoídicos são caracterizados por alta concentração de açúcares. Produtividades crescentes de biomassa e de antraquinonas foram encontradas por Wijnsma (1986) em culturas de *Cinchona ledgeriana* com o aumento da concentração de sacarose de 5 g% para 8 g%, contudo, estas respostas foram condicionadas a aumentos de teores de N₂ do meio de cultura. De forma semelhante, Smith *et al.* (1987) observaram incrementos de biomassa e de produção de catarantina com lactose como fonte de carboidrato em suspensões celulares de *Catharanthus roseus*, em comparação à sacarose. Para *Taxus cuspidata*, a produção do composto terpenoídico taxol foi maximizada quando usada a combinação de sacarose e frutose no meio de cultura (Ketchum e Gibson, 1996). A biossíntese de berberina (Sato e Yamada, 1984) foi induzida de forma mais pronunciada pela ação de sacarose em relação à glucose. Em ginseng (*Panax ginseng*), células

cultivadas em meio suplementados com sacarose, glucose e frutose, em concentrações variando de 1 a 11 g%, demonstraram que a sacarose (3 a 5 g%) proporcionou as melhores taxas de crescimento (Wu e Ho, 1999). Entretanto, a glucose e a frutose podem ser utilizadas como fonte alternativa de carbono, visto que nem sempre o maior incremento celular condiz com o maior acúmulo de metabólitos secundários.

Os resultados referentes a fonte de carbono encontrados na literatura são bastante variáveis, sendo a habilidade uma fonte de carbono em viabilizar o crescimento celular função de sua concentração no meio de cultura, do tecido vegetal e idade da cultura (Schripsema *et al.*, 1991 e Maraschin, 1998).

2.2.2. Adição de precursores

Em diversos cultivos celulares a produção de metabólitos secundários pode ser positivamente afetada pela adição de intermediários da via biossintética. Segundo Maraschin e Verpoorte (2001), três aspectos básicos devem ser considerados quando se busca a otimização da produtividade de metabólitos secundários nos cultivos *in vitro*: a) a concentração do substrato (toxicidez, por exemplo); b) o metabólito de interesse é (ou não) o produto final da via biossintética; c) a capacidade de armazenamento celular do composto.

A adição de precursor(es) pode induzir o aumento do composto bioativo de interesse desde que ocorra a disponibilidade de substratos adequados no meio da reação. Como exemplo disto, culturas de células de *Catharanthus roseus* suplementadas com secologanina mostraram elevação nos teores de strictosidina, o precursor comum na biossíntese de alcalóides indólicos monoterpenoídicos (Sierra *et al.*, 1991). Entretanto, muitas vezes o metabólito não é o produto final da via biossintética e nesse caso a taxa de seu catabolismo pode ser inefetiva à adição de precursor(es) (Maraschin e Verpoorte, 1999)

2.2.3. Diferenciação celular

A biossíntese de metabólitos secundários em plantas e cultivos de células e tecidos é, freqüentemente, um processo dependente da presença de tecidos diferenciados, ou de células especializadas, isto é, com algum grau de diferenciação ainda que a nível subcelular. Este aspecto pode ser compreendido mais facilmente quando são consideradas determinadas vias biossintéticas que ocorrem em organelas celulares específicas, como, por exemplo, a produção de monoterpenos, os quais em algumas etapas de biossíntese ocorrem nos plastídeos (Verpoorte *et al.*, 1997).

Em culturas celulares vegetais, a diferenciação geralmente ocorre no final do ciclo de crescimento (fase estacionária), coincidindo geralmente com a maior produção de metabólitos secundários. Culturas de células agregadas podem produzir metabólitos que não são encontrados em células em suspensão, tal como observado em *Chinchona ledgeriana*, onde a produção de alcalóides quinolínicos ocorreu apenas em estruturas globulares compactas (Hoekstra *et al.*, 1990).

Por causa da relação entre metabólitos secundários com diferenciação morfológica, a cultura de células diferenciadas é interessante. Culturas de embriões, raízes e ramos tem sido obtidas de várias espécies, as quais produzem metabólitos secundários similares aos encontrados na planta a campo (Verpoorte, 1990).

Os óleos essenciais não são freqüentemente sintetizados em culturas de células não diferenciadas, entretanto a acumulação de alguns óleos tem sido correlacionada com distintas morfologias das culturas (Tabela 3).

Tabela 3 – Óleos essenciais produzidos em cultura de tecidos de plantas.

Espécies	Composto (s)	Morfologia da cultura
<i>Mentha piperita</i>	Geraniol, linolol (precursores iniciais)	Calos
<i>Mentha piperita</i>	Mentona, mentol (produtos finais)	Calos
<i>Origanum vulgare</i>	Monoterpenóides	Ramos regenerados de calos
<i>Ilavandua angustifolia</i>	Monoterpenóides	Ramos regenerados de calos
<i>Eucaliptus citriodora</i>	Monoterpenóides incluindo citronelol	Raízes
<i>Pimpinella anisum</i>	Anetol	Células em suspensão na presença da fase lipofílica
<i>Matricaria chamomilla</i>	Sesquiterpenos inclusive bisabolol	α - Calos contendo idioblastos (células com óleo) ou células em suspensão na presença da fase lipofílica
<i>Pelargonium spp.</i>	Monoterpenos incluindo menthona, limoneno	Calos contendo glândulas de óleo; cultura de ramos

(Stafford e Warren, 1991)

2.2.4. Elicitação

A elicitação de compostos ocorre quando a célula é submetida a estresses ambientais, sendo que dois tipos de elicitores são conhecidos: bióticos e abióticos. Os elicitores bióticos são compostos que são capazes de induzir uma resposta de defesa contra infecções, e em particular a produção de fitoalexinas (Verpoorte *et al.*, 1999). Os elicitores de origem abiótica (íons de metais pesados, por exemplo), também tem sido usados nesse contexto.

Fitoalexinas são definidas como compostos com baixo peso molecular com atividade antimicrobiana que são formadas e acumuladas em células de plantas depois da infecção. As culturas de células são obtidas por indução de calos a partir de caule, folha ou raiz. Entretanto, cada tipo de cultivo de células pode fornecer uma forma de fitoalexina, esse princípio tem sido aplicado em estudos sobre a biossíntese de fitoalexina, bem como para aumentar a produtividade de metabólitos secundários (Eilert, 1987).

Segundo Verpoorte *et al.*, (1999), a indução de fitoalexinas é restrita a certas vias, cada espécie possui uma classe de compostos específicos que são induzidos após a elicitação, que está ausente na planta sadia. Muitos compostos de interesse produzidos em plantas não são sensíveis a indução por elicitores, entretanto a produção de compostos importantes como a quinina, morfina e a vimblastina não são afetadas por elicitação.

O elicitor pode ser preparado utilizando-se paredes de células de microrganismos, podendo ser estes patogênicos. Também, podem ser utilizadas enzimas como a pectinase e a celulase, que determinam a formação de fragmentos de parede celular, as quais atuam como elicitores. Os elicitores podem ser peptídeos, oligossacarídeos, glicopeptídeos ou lipídeos (Verpoorte *et al.*, 1999). A eficiência do elicitor depende de vários fatores, devendo levar em consideração: o agente de elicitação, a ação e indução na(s) via(s) biossintética(s), a concentração, o momento de adição do elicitor e o período de contato com as células (Maraschin e Verpoorte, 1999).

2.3. ENGENHARIA METABÓLICA

Nos últimos anos, distintos métodos têm sido desenvolvidos para a transformação de plantas e células de plantas. A transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* tem sido usadas com sucesso na introdução de genes em um grande número de espécies. Métodos como a microinjeção e eletroporação e a biobalísticas são ferramentas da engenharia genética que possibilitam a transformação de plantas que se apresentam recalcitrantes a transformação via *Agrobacterium*.

A infecção de raízes com *A. rhizogenes*, resulta na formação de tumores nas raízes, também chamadas de “hairy roots”, essas raízes produzem metabólitos secundários com perfis semelhantes aos encontrados na planta (Verpoorte *et al.*, 2000).

Segundo Verpoorte (1990), distintas estratégias podem ser utilizadas para aumentar a produção de metabólitos secundários, tais como:

- aumentar o fluxo de uma via metabólica;
- bloquear vias competitivas;
- bloquear uma parte da via metabólica;
- bloquear o catabolismo;
- melhorar o estoque de metabólitos secundários na célula;
- aumentar a excreção do metabólito;
- alterar uma via metabólica resultando na formação de um novo produto de uma planta em particular ou cultura de células.

A engenharia metabólica objetiva o incremento do fluxo de carbono em direção ao produto final de interesse. A engenharia do metabolismo tem como pressuposto básico o conhecimento de todos os passos constituintes da via biossintética do metabólito de interesse, aspecto que limita a aplicação desta abordagem, visto que, a maioria destas vias são conhecidas apenas a nível de seus intermediários. Como conhecimento da via biossintética a nível de intermediários, o passo seguinte é a identificação das enzimas envolvidas e a determinação de quais destas apresentam função regulatória. Além disso, é importante considerar outros aspectos do processo de síntese, como a arquitetura da via biossintética, a existência de etapas regulatórias, o transporte do produto final e a compartimentalização (Maraschin e Verpoorte, 1999).

3. MONITORAMENTO DO METABOLISMO CELULAR POR RMN

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma forma de espectrometria baseada na absorção de energia, na faixa da radiofrequência por núcleos atômicos (e.g., ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , ^{39}K , etc) que possuem um momento magnético (i.e. momento de dipolo magnético, spin nuclear \neq zero e quadrupolo elétrico), quando submetidos a um campo magnético estacionário (Roberts e Jardetzky, 1981; Freitas e Bonagamba, 1999). Esta técnica tem sido usada em experimentos com a finalidade de estudar diferentes biofluidos tais como urina, plasma sanguíneo, biliar, fluido seminal e fluido cefalorraquidiano, bem como extratos de tecidos animais e vegetais, visando a obtenção de informações de aspectos metabólicos (Schripsema *et al.*, 1991).

O uso da RMN apresenta grande potencial para o estudo de processos metabólicos em cultura de células de plantas e na detecção e monitoramento de diferentes compostos. Como exemplo disto, estudos de variação do pH no citoplasma e vacúolo de células de raízes de milho têm sido feita por ^{31}P -RMN (Roberts *et al.*, 1980). Em outra abordagem, foi realizada a quantificação de carboidratos por ^1H -RMN, em nível intra e extra-celular, em culturas celulares de *Tabernaemontana divaricata* (Schripsema *et al.*, 1991), *Mandevilla velutina* (Araújo *et al.*, 2001) e *Vitis vinifera* (Moreira *et al.*, 2000). A análise da ocorrência de diferentes aminoácidos em extrato aquoso de cultura de células de *Catharanthus* e *Tabernaemontana* tem sido monitorada por ^1H -RMN (Schripsema e Verpoorte, 1991).

Nos últimos anos, a importância da RMN, para todas as classes de pesquisa tem crescido rapidamente, devido ao desenvolvimento da instrumentação e de *softwares* de gerenciamento e análise, sendo que este sistema permite a análise de pequenas quantidades de compostos puros, com grande precisão em escala de miligramas ou microgramas. Adicionalmente, a RMN apresenta-se como uma técnica robusta e que envolve um menor consumo de tempo na realização das análises, requerendo pouco ou nenhum pré-tratamento das amostras, notadamente em estudos *in vivo* e em estado sólido.

CAPÍTULO II

ANÁLISE HISTÓRICA E DE MERCADO DA ATIVIDADE EXTRATIVISTA DA MADEIRA E DO ÓLEO ESSENCIAL DA CANELA SASSAFRAS (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) NO ESTADO DE SANTA CATARINA¹.

Oltramari, AC²; Duarte da Silva, JMO³; Pedrotti, EL³; Maraschin, M³

RESUMO - A canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer - *Lauraceae*) é uma espécie lenhosa com ecossistema preferencial na Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica). Em nível industrial, a extração do óleo essencial de sassafrás, a partir de sua madeira, teve início em meados dos anos 40 no Estado de SC, devido ao seu alto teor de safrol. Esta atividade apresentou um grande crescimento no Estado durante a Segunda Guerra Mundial, com 150 fábricas instaladas, contribuindo para a geração de renda e empregos. A redução do volume de biomassa explorado teve início na década de 90, devido à não sustentabilidade do modelo de produção utilizado (extrativismo), o qual foi determinante para que a espécie fosse levada a uma condição crítica de sobrevivência, com implicações significativas para a sua exploração comercial. O preço do óleo de sassafrás no mercado externo apresentou variação significativa, ao longo do período estudado (1942-1998), e os dados indicaram um crescente aumento do preço de safrol no mercado externo, uma provável consequência da escassez do produto no mercado, decorrente do sistema extrativista de produção, também utilizado nos principais países produtores. A série histórica de dados de comercialização e preços dos produtos sugere a necessidade de readequação do setor, notadamente através da adoção

¹ Publicado na *Revista Árvore*, 26: 99-106, 2002.

² Estudante de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC; ³ Centro de Ciências Agrárias Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal-CCA/UFSC, Rua Ademar Gonzaga 1346, Itacorubi - Caixa Postal 476 - CEP 88049-900

de novas tecnologias que permitam a produção do óleo de sassafrás sob um sistema de manejo sustentado.

Palavras – chave: canela sassafrás, *Ocotea odorifera*, safrol, óleo essencial, extrativismo.

CANELA SASSAFRAS (Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer): HISTORICAL AND MARKET ANALYSIS OF THE EXTRACTIVIST ACTIVITY OF LIGNOCELULOSIC BIOMASS AND ESSENTIAL OIL IN SANTA CATARINA STATE¹.

ABSTRACT – Canela sassafrás (Ocotea odorifera (Vell.) Rohwer) is a hardwood plant native to Atlantic Rainforest, in South Brazil. Its lignocellulosic biomass extraction was initiated on an industrial scale in the middle 40's in Santa Catarina State, due to the high safrole content. A meaningful increase of this economic activity was observed in that State during the Second World War, with 150 operating factories, which afforded a large number of employment and incoming. A decrease in the extracted biomass was observed in the early 90's, since the production system used (extractivism) was not sustainable. This factor was decisive to lead the species to a critical survival condition, with serious implications in respect to its commercial exploitation. It was found a significant difference for the price of the sassafras oil, as well as for safrole price in the external market, along the period 1942 - 1998. As main reason for that the scarcity of that biomass was assumed, due to the extractivism system also used in the producer countries. The data of the historical analysis on commercialization and prices point to the need for the re-adequacy of this productive sector, mainly through the adoption of newer technologies which make feasible the sassafras oil production under a sustainable system.

Key words: canela sassafras, Ocotea odorifera, safrole, essential oil, extractivism.

1. INTRODUÇÃO

A canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) é uma espécie lenhosa perene, pertencente à família *Lauraceae*, atingindo 20 a 25 m de altura na fase adulta,

com 50 a 70 cm de diâmetro na altura do peito (REITZ et al., 1978). Apresenta copa densa, flores hermafroditas e alternância de floração, a qual raramente corresponde à uma abundante frutificação. No Brasil, sua distribuição é verificada entre as latitudes 8°45' [Pernambuco] e 31°12'S [Rio Grande do Sul] e de 33°52' a 59°09' de longitude oeste (SALOMÃO et al., 1992), sendo encontrada em regiões cuja altitude varia de 10 a 1200 m, com temperaturas médias anuais variando de 12°C a 23°C (CARVALHO, 1994).

No Estado de Santa Catarina, sua ocorrência é maior no ecossistema da Floresta Ombrófila Densa [Floresta Atlântica], especialmente no Vale do Rio Itajaí, sendo menos freqüente na Floresta Ombrófila Mista [Floresta de Araucária]. No início da década de 40, aproximadamente 1/3 das espécies lenhosas constituintes da Floresta Atlântica catarinense era representada por esta espécie (REITZ et al., 1978). Tentativas de reflorestamento em campo aberto não alcançaram êxito, devido principalmente ao fato de ser uma espécie que se regenera naturalmente em floresta secundária tardia a clímax, onde há elevada umidade e sombreamento. Seu crescimento é muito lento, sendo estimada uma rotação mínima de 42 anos para a extração do óleo de sassafrás, seu principal produto (CARVALHO, 1994).

A madeira de canela sassafrás foi muito empregada na indústria moveleira, naval e na construção civil (REITZ et al., 1978). No artesanato catarinense, a madeira foi muito usada na confecção de barris e garrafas para armazenar aguardente. Na industrial, as raízes, cascas e folhas foram amplamente utilizadas para a extração de óleo essencial, o qual apresenta altos teores de safrol, um composto alilbenzênico de grande importância econômica. A partir do safrol, dois derivados são obtidos, a heliotropina, que é um fixador de aroma, e o butóxido de piperonila, elemento essencial na produção de inseticidas biodegradáveis (EMBRAPA, 1998). O teor de óleo essencial extraído da canela sassafrás encontra-se numa concentração de aproximadamente 1%, no sul do Brasil, e 0,65% no sul de Minas Gerais (CARVALHO, 1994).

Na medicina popular os extratos alcoólicos de tecidos de raiz, casca, caule e folhas são usados como sudoríficos, anti-reumáticos e diuréticos (FUTURO *et al.*, 1998). Todavia, a comprovação científica destas atividades farmacológicas requer estudos mais intensivos e de maior profundidade, principalmente considerando a comprovada ação carcinogênica do safrol (TAYAMA, 1996, TAN et al., 1998; TAN et al., 1999).

Métodos convencionais de propagação via semente não têm apresentado resultados satisfatórios, devido ao grande período de tempo necessário para iniciar o período reprodutivo [em média de 25 a 40 anos]. Além disto, a quantidade de material seminífero produzido por planta é considerada baixa, podendo alcançar 2.000 sementes/ano/planta matriz com 100 anos de idade, valor bastante reduzido quando comparado a outras espécies lenhosas que podem produzir mais de um milhão de sementes/planta matriz (eucalipto, e.g.). Além deste fator, as sementes apresentam dificuldades na germinação em função da oxidação do óleo e são intensamente atacadas por roedores, insetos e fungos (PEDROTTI, 1998 – comunicação pessoal). Em função do exposto, constata-se que a espécie *Ocotea odorifera* apresenta dificuldades para ser cultivada em larga escala, devido às suas características reprodutivas e ao longo ciclo de crescimento. Aliado a isto, o sistema de exploração utilizado, baseado exclusivamente no extrativismo, concorreu para que tal espécie fosse levada a uma condição crítica de sobrevivência em seu ecossistema nativo, com implicações significativas no que se refere à sua exploração comercial.

O presente estudo objetivou realizar um levantamento de dados concernentes à atividade extrativista e de mercado da biomassa lignocelulósica e do óleo essencial de canela sassafrás no Estado de Santa Catarina, ao longo de uma série histórica de 56 anos (1942-1998).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos anos de 1998 e 1999, mediante levantamento de dados histórico da indústria de extração de óleo de sassafrás em Santa Catarina, exploração da madeira e valor de mercado destes produtos, ao longo de uma série histórica de 56 anos (1942-1998). Para tal, foram compilados dados de literatura e aqueles disponibilizados por órgãos governamentais e privados conforme descrito a seguir:

- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA);

- Federação das Indústrias do Estado de Santa Catarina (FIESC), através do CNI (Sistema de Estatística de Comércio Exterior) e sistema ALICE (Importações Efetivas Dados Preliminares Consulta por Mercadoria - Secretaria do Comércio Exterior/SECEX) do Departamento de Operações de Comércio Exterior (DECEX);
- Sistema de Controle de Exportações de Produtos Florestais (SISCOEX) do Estado do Paraná.

Após a coleta, os dados foram agrupados segundo três categorias: 1) dados históricos, 2) de exploração e 3) de mercado, de modo a permitir uma análise mais detalhada de cada uma destas categorias. Foram analisados os parâmetros quantidade e preços médios de óleo essencial, volume de madeira explorada, variação de preços de safrol no mercado externo, quantidade total de óleo exportado e países importadores desta matéria-prima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Histórico da indústria de extração de óleo de sassafrás em Santa Catarina

A extração em escala industrial do óleo de sassafrás, a partir da biomassa lignocelulósica de *Ocotea odorifera*, teve seu início no Brasil em meados dos anos 40, mais especificamente na localidade de Ribeirão do Tigre, município de Rio do Sul (SC), pelo industrial Otto Grimm. O óleo extraído por destilação a vapor era comercializado no mercado externo com o nome de "essência de sassafrás brasileiro". A justificativa para a exploração desta espécie advém do fato de que 80% do óleo essencial de sassafrás é constituído por safrol (SILVA, 1987). Antes da entrada deste produto no mercado, o abastecimento dava-se a partir do óleo de sassafrás americano, extraído das raízes da planta denominada Lauraca, a qual apresenta menor rendimento em safrol, comparativamente à espécie brasileira (REXTER & DOBLER, 1992).

Com o grande êxito do óleo no mercado, a única indústria existente naquele período não supria a demanda existente, fato que permitiu a instalação de novas indústrias no Estado, chegando a 150 fábricas durante o período da Segunda Guerra Mundial (SILVA, 1987; DUARTE DA SILVA, 1989). De fato, neste período, a

indústria brasileira de extração deste óleo sofreu um grande impulso devido principalmente à grande demanda do mercado norte-americano. Tal fato gerou a necessidade de um sistema de controle de qualidade da matéria-prima, de modo que o produto passou a ser classificado em dois grupos: a) *óleo de primeira qualidade*, restrito ao óleo de sassafrás americano, usado para a indústria de produtos alimentícios e farmacêuticos; b) *óleo de segunda qualidade*, considerado no mercado norte-americano o óleo produzido no Brasil e utilizado na fabricação de inseticidas, fungicidas, perfumes e sabões (REXTER & DOBLER, 1992). Como exemplo disto, em 1942, encontravam-se instaladas 31 empresas de produção de óleo de sassafrás nos municípios de Blumenau, Rio do Sul, Camboriú, Grão-Pará, Itajaí, e Jaraguá do Sul, sendo que 2/3 do total estava sediado no município de Rio do Sul. Entre os anos de 1944 a 1947, coincidindo com o final da Segunda Guerra Mundial, não há registros oficiais precisos do número de fábricas existentes no Estado, porém os dados de literatura indicaram que fábricas localizadas em Blumenau, Camboriú, Grão Pará, Itajaí, Jaraguá do Sul foram fechadas, enquanto novas fábricas foram abertas nos municípios de Bom Retiro, Brusque, Concórdia, Ibirama, Indaial, Itaiópolis, Rodeio e Timbó. No início de 1948, os registros indicaram a existência de 35 fábricas somente no município de Rio do Sul; porém, em julho do mesmo ano, este número foi reduzido para 31. Possivelmente, tal fato ocorreu devido à falta de matéria prima ocasionada pela intensa extração de biomassa, aliada ao não repovoamento das áreas devastadas de canela sassafrás. Em 1970, se encontravam no Estado 18 fábricas distribuídas em 11 comunidades: Ibirama [4 fábricas], Benedito Novo [3 fábricas] e Taió [3 fábricas] (REXTER & DOBLER, 1992). Atualmente, duas fábricas são encontradas no Estado, uma no município de Canoinhas e outra no município de Ibirama.

Exploração da madeira e óleo de canela sassafrás

Santa Catarina foi, durante várias décadas, o maior exportador de óleo de sassafrás do Brasil. Contudo, poucos dados de órgãos governamentais foram encontrados referentes à quantidade de biomassa de canela sassafrás explorada nas décadas de 40 a 80, de modo que apenas estimativas podem ser feitas a partir dos registros da literatura. Os dados referenciam informações de exportação de óleo de sassafrás fornecidos pelo órgão federal gestor do comércio exterior (CACEX – Carteira de Comércio Exterior), o qual foi extinto em 1992. Como consequência, grande parte

dos dados de exportação de óleo de sassafrás tornou-se inacessível, devido à dispersão e/ou extravio dos registros estatísticos, principalmente porque o banco de dados que se localizava no Estado de Santa Catarina foi transferido para o Rio de Janeiro. De fato, esta situação foi encontrada repetidas vezes junto aos órgãos governamentais responsáveis pela coleta e monitoramento dos dados de produção e comercialização da biomassa de canela sassafrás no Estado de Santa Catarina e no Brasil, dificultando sobremaneira a obtenção de resultados mais precisos e consistentes.

Com base em estimativas realizadas através de dados da quantidade de óleo de sassafrás exportado, referenciados por SILVA (1987), um volume aproximado de 926.424,85 m³ de madeira foi extraído no Estado de SC, a partir do qual 7.411.399,00 Kg de óleo de sassafrás foram obtidos, em um período de 10 anos de exploração, conforme descrito no Quadro 1.

Devido à necessidade de confirmação da quantidade de madeira explorada no Estado catarinense, os dados concernentes ao volume de madeira extraída, área e município onde sucedeu a exploração foram obtidos a partir de um levantamento realizado junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Através da análise do banco de dados daquele órgão, pôde-se constatar que somente a partir de 1982 começou a ser notificada a exploração desta espécie. Possivelmente, uma das justificativas para o início dos registros naquela época tenha sido o grande volume de madeira que estava sendo comercializado e a preocupação com a extinção da espécie. O registro da quantidade de madeira de canela sassafrás explorada era realizado através de guias de autorização para desmatamento. Todavia, em muitos casos, sua madeira foi classificada como sendo madeira de lei e de qualidade, juntamente com outras espécies, fato que impossibilitou a determinação do valor exato da quantidade explorada.

Os registros de corte de canela sassafrás no Estado, para o período 1981 - 1989, indicam que foram extraídos 209.571,43 m³ de madeira, em uma área correspondente a 12.890,23 ha, sendo que a média explorada foi de 17,912 m³ de madeira/hectare (Quadro 2). Estes dados indicam que a quantidade explorada de madeira que foi registrada junto ao IBAMA em 1984 e 1987 é muito inferior aquela retirada, conforme dados descritos por SILVA (1987) (Quadro 1).

Os dados indicaram que a madeira extraída era proveniente, em sua maioria, da região do Alto Vale do Itajaí, conforme levantamento realizado no IBAMA/SC, com destaque para os municípios de Ibirama, Rio Rosinha, Rio do Sul, Botuverá, Gaspar,

Atalanta, Angelina, Rio do Campo, Benedito Novo, Indaial, Presidente Nereu, Agrônômica, Itajaí, Blumenau, Trombudo Central, Brusque, Agrolândia Major Vieira, Apiúna, Irinópolis, Corupá, Timbó, Vidal Ramos, Leoberto Leal. Além destes, a canela sassafrás foi explorada em outras regiões do Estado tais como Curitiba, Itaiópolis, Porto União, Monte Carlo, Canoinhas e Mafra, porém com menor intensidade.

Somente em 1992 o governo brasileiro decretou, através da Secretaria do Meio Ambiente - IBAMA, a Portaria N° 06 – N (15 de Janeiro de 1992, Art.1°) que incluiu na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção a *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez.), inserindo-a na categoria: *em perigo*. Porém, a partir de 1996, a Portaria inter-institucional n° 01, de 04/06/96, editada pelo IBAMA, Governo do Estado de Santa Catarina, e da Fundação do Meio Ambiente (FATMA) - D.O.U. de 30/06/96, no Art.1°- legalizou a exploração de florestas nativas, nas áreas cobertas por vegetação primária ou secundária nos estágios avançado e médio de regeneração no Estado de Santa Catarina. A referida portaria viabilizou a exploração da madeira de canela sassafrás, sob a forma de corte seletivo mediante manejo florestal sustentável.

Considerando os resultados obtidos por REXTER & DOBLER (1992), em estudo realizado com dados obtidos na CACEX em 1992, foi observada uma queda contínua de exportação de óleo de sassafrás no período de 1987 a 1991, fato decorrente da escassez de matéria-prima em Santa Catarina. Em 1984, foram exportados 1.302.362 Kg de óleo, com redução para 255.073 Kg em 1991, o que corresponde a uma queda de 5 vezes ao longo de 4 anos (Figura 1). Naquele período (1987 a 1991), os principais compradores do óleo de sassafrás brasileiro foram os EUA, o Japão e a Itália. Entretanto, pequenas quantidades de óleo também foram importados pela Espanha, Reino Unido, França, Israel e antiga União Soviética (Quadro 3). A quantidade importada de óleo de sassafrás está, possivelmente, relacionada com o potencial da indústria de química fina de cada país.

Valor de Mercado

Durante os anos de 1942 a 1947, verificou-se uma considerável flutuação na produção de óleo de sassafrás em Santa Catarina devido à Segunda Guerra Mundial. O mercado norte-americano, principal comprador do óleo catarinense, encontrava-se impossibilitado de importá-lo do oriente, fato que determinou um aumento da pressão de demanda daquela matéria-prima. Ao final daquele período, observou-se um

decréscimo na produção e no volume exportado pelo Estado para aquele país, provavelmente, devido ao retorno ao mercado de alguns países diretamente envolvidos na guerra, como o Japão, um grande fornecedor do óleo de cânfora - preparado sintético (REXTER & DOBLER (1992)).

No contexto econômico, o preço do óleo de sassafrás produzido em Santa Catarina apresentou uma variação significativa, quando se comparam os preços praticados nos anos 60 e 70 com os valores do final dos anos 80 e início dos anos 90, conforme demonstrado no Quadro 4. Contudo, dados mais recentes têm indicado um crescente aumento do preço de safrol ao longo dos últimos anos no mercado externo, conforme demonstrado no Quadro 5. Esta tendência pode estar relacionada à escassez do produto no mercado, devido principalmente ao fato do sistema de produção basear-se no extrativismo nos principais países produtores (China e Vietnã).

A partir da proibição do corte da canela sassafrás, o Brasil passou da condição de país exportador de óleo de sassafrás a importador desta matéria, conforme mostram os dados obtidos junto à Federação das Indústrias do Estado de Santa Catarina (FIESC – CNI/sistema ALICE/DECEX). Entretanto, uma pequena quantidade de óleo de sassafrás proveniente do Estado de Santa Catarina e do Paraná ainda é exportada através do Porto Paranaguá - PR, segundo registro do Sistema de Controle de Exportações de Produtos Florestais (SISCOEX), órgão que foi implantado no ano de 1995. Os registros demonstraram que naquele ano foram exportadas 37,62 toneladas de óleo essencial com um preço de US\$ 6,65/Kg, enquanto no período de 1996-97, não foram registradas atividades de exportação de óleo de sassafrás brasileiro. Para o primeiro semestre de 1998, foram exportadas 14,96 toneladas, com um preço de US\$ 5,60/Kg (Quadro 6). Análises mais detalhadas de dados de exportação obtidos junto ao Porto de Paranaguá e relativos a momentos anteriores à implantação do SISCOEX, não foram possíveis, devido à dispersão e/ou extravio dos registros estatísticos pelos órgãos oficiais.

Durante muitos anos, a extração de óleo de sassafrás contribuiu fortemente para geração de renda e empregos nos municípios produtores catarinenses. Contudo, devido à escassez de matéria-prima, decorrente de um sistema exploratório desprovido de sustentabilidade, e à concorrência externa, notadamente por parte de alguns países asiáticos, esta atividade não mais apresenta significância no sistema produtivo do Estado.

Atualmente, o óleo de sassafrás é importado da China e do Vietnã que o obtêm de *Cinnamomum camphora* (Lauraceae). Todavia, existe a possibilidade de o governo

chinês proibir sua exploração, devido ao risco de extinção daquela espécie (EMBRAPA, 1998). Em função do exposto, o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa em áreas básicas e de cunho tecnológico, buscando desenvolver formas alternativas de produção de safrol, segundo um modelo sustentável, poderá vir a ser uma solução que viabilize o abastecimento de mercados, a obtenção de lucros e a reconquista de um segmento do mercado externo.

Perspectivas

Mediante a situação atual de distribuição desta espécie no Estado, a conservação do germoplasma de canela sassafrás dependerá de ações que envolvam propagação, conservação *in situ* e *ex situ*, caracterização genética de indivíduos de diferentes populações, bem como o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas de conservação através da propagação *in vitro* e criopreservação.

Estudos que envolvam a propagação de germoplasma através da cultura de tecidos, são um importante pré-requisito para a conservação, visto que os métodos convencionais de propagação, via semente não têm apresentado resultados satisfatórios, de modo a garantir seu reflorestamento, devido ao grande período de tempo necessário para iniciar o período reprodutivo e de corte, conforme descrito anteriormente.

4. CONCLUSÕES

- A exploração da canela sassafrás foi realizada durante mais de 40 anos de forma irrestrita. Este fato, aliado ao pouco conhecimento do manejo desta espécie e ao preço atrativo do óleo essencial e do safrol no mercado internacional, foram os principais agentes causadores de um extrativismo exacerbado no Estado de Santa Catarina, colocando esta espécie em perigo de extinção;
- A política inadequada da produção para o setor colaborou para o surgimento de problemas sociais e econômicos, dado ao fechamento de indústrias na região do Vale do Itajaí, além de levar o país à condição de importador do óleo de sassafrás;

- Os dados oficiais de exportação do óleo de sassafrás de Santa Catarina foram, em certo nível, dispersos e/ou extraviados, sugerindo desinteresse dos órgãos governamentais em formar banco de dados com informações precisas e confiáveis;
- A série histórica de dados de comercialização e preços dos produtos sugere a necessidade de readequação do setor, notadamente através da adoção de novas tecnologias que permitam a produção sob um sistema de manejo sustentado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL-IBAMA. Portaria n.006/92-N, 15 de Janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Jan. 1992.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras recomendações: Silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas Florestais. Colombo: EMBRAPA - CNPF; Brasília - SPI, 1994, 640p.
- DUARTE DA SILVA, T. **Estabelecimento de métodos para a micropropagação da canela sassafrás (*Ocotea odorifera*)**. Florianópolis: UFSC, 1989. 37p. Relatório de estágio (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1989.
- EMBRAPA. **Embrapa identifica pimenta que produz safrol**. Boletim semanal de divulgação científica. Ano VI, novembro/1998, 4p.
- FUTURO, D.O.; FIGUEIREDO, M. R. Lignanas e neolignanas de *Lauraceae*: Diversidade química e potencial de biodiversidade. In: XV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Águas de Lidóia. *Resumos*, p.165, 1998.
- REITZ, R., KLEIN, R.M., REIS, A. **Projeto madeira de Santa Catarina. *Sellowia***, Itajaí, 1978, 320p.
- REXTER, U., DOBLER, G. **Untersuchungen über die Baumart canela sassafrás (*Ocotea pretiosa* Mez.)**. Weihenstephan: Fachhochschule Weihenstephan, 1992. 276p. M.Sc. Thesis (Fachbereich Forstwirtschaft) - Fachhochschule Weihenstephan, 1992.
- SALOMÃO, A. N., BRANDÃO, J.E.M., SILVA, J.A. Distribuição geográfica de seis espécies florestais como subsídio para a escolha de conservação "*in situ*". In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p. 1237-1240. Publicado na Revista do Instituto Florestal, v.4, parte 4, edição especial, 1992.
- SILVA, J.L.N. **Estudo sintético de derivados do óleo de sassafrás**, Florianópolis: UFSC, 1987. 53p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1987.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L. C., REITER, R.J., PLUMMER, B. F., HARDIES, L. J., WEINTRAUB, S. T., SHEPERD, A. M. M. A novel melatonin metabolite,

- cyclic 3-hydroxymelatonin: A biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 253, n. 3, p. 614-620, Dec. 1998.
- TAN, D.X., MANCHESTER, L. C., REITER, R.J., PLUMMER, B. F. Cyclic 3-hydroxymelatonin: A melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol. Signals Receptors*, v. 8, n. (1-2), p. 70-74, Jan-Apr. 1999.
- TAYAMA, S. Cytogenetic effects of piperonyl butoxide and safrole in CHO-K1 cells. *Mut. Res. - Gen. Toxicol.*, v.368, n.3-4, p.249-260, 1996.

Quadro 1. Quantidade de óleo essencial (Kg) extraído de canela sassafrás em Santa Catarina e exportado nos períodos 1942-47, agosto de 1969 a 1970, 1984 e 1987 e estimativa da quantidade média de madeira (m^3) necessária para a extração do óleo.

Table 1. Quantity of essential oil (Kg) extracted from canela sassafras in Santa Catarina State and exported during 1942-47, August, 1969 - 1970, 1984, and 1987 and estimation of the mean quantity of wood (m^3) necessary for the extraction of this oil.

Ano	Óleo de sassafrás* (Kg)	Estimativa do volume de madeira explorada (m^3)
1942	124.260	15.532,5
1943	210.575	26.321,8
1944	591.947	73.993,4
1945	530.667	66.333,4
1946	367.665	45.958,1
1947	330.923	41.365,4
1969-70	1799.000	224.875,0
1984	2.154.000	269.250,0
1987	1.302.362	162.795,25
Total	7.411.399	926.424,85

* Em média, o rendimento de óleo de sassafrás a partir de $1 m^3$ de madeira corresponde a 8 Kg de óleo essencial (REXTER & DOBLER, 1992).

Quadro 2. Quantidade de madeira explorada registrada (m^3), total da área explorada (ha) e volume médio explorado de madeira (m^3/ha) de canela sassafrás, durante o período de 1982 a 1989*.

Table 2. Quantity of exploited and recorded wood (m^3), total exploited area (ha) and mean volume of canela sassafras wood exploited (m^3/ha), during 1982 to 1989.

Ano	Total de madeira explorada (m^3)	Total da área explorada (ha)	Média do volume de madeira explorada (m^3/ha)
1982	2.922,89	124,17	23,539
1983	9.963,40	1.821,84	5,468
1984	35.725,43	2.157,87	16,555
1985	51.803,44	2.812,10	18,421
1986	32.691,49	1.713,53	19,078
1987	47.478,56	2.747,77	17,280
1988	19.173,85	1.136,91	16,864
1989	9.812,37	376,04	26,093
Total	209.571,43	12.890,23	17,912

* Fonte : registros de autorizações de desmatamento efetuados no Estado de Santa Catarina pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Florianópolis - 1997.

Quadro 3. Participação relativa (%) de países importadores de óleo essencial de canela sassafrás nos anos de 1987 a 1991, segundo REXTER & DOBLER (1992).

Table 3. Relative participation of importer countries of canela sassafras' essential oil for the period 1987 to 1991, according to REXTER & DOBLER (1992).

<i>Países</i>	<i>Participação relativa de importação (%)</i>				
	<i>1987</i>	<i>1988</i>	<i>1989</i>	<i>1990</i>	<i>1991</i>
Japão	46	18	30,8	63	56
EUA	27,7	43,4	23,8	6	10
Itália	22,6	31,2	44,6	30	34
Espanha	1,9	-	-	-	-
Reino Unido	1,2	-	-	-	-
Israel	-	5	-	-	-
França/Espanha	-	2,4	-	-	-
Outros	0,6	-	0,8	1	-

Quadro 4. Preços médios (US\$/Kg) de óleo essencial extraído da canela sassafrás e exportado, ao longo do período 1960 - 1991 (REXTER & DOBLER, 1992).

Table 4. Mean prices (US\$/Kg) of the essential oil extracted from canela sassafras biomass and exported along the period 1960-1991 (REXTER & DOBLER, 1992).

<i>Ano</i>	<i>Preços Médios (US\$)</i>
1960	1,90
1970	1,00
1987	5,60
1989	3,43
1990	3,23
1991	6,35

Quadro 5. Dados da variação de preços (US\$/Kg) de safrol no mercado externo no período 1993-98.

Table 5. Variation of prices (US\$/Kg) of safrole in the external market along the years 1992 to 1998.

<i>Ano</i>	<i>Preço Médio (US\$/Kg)</i>
1993*	4,77
1994*	2,82
1995*	2,49
1996**	6,00
1997***	23,13
1998***	14,00

*Dados fornecidos pelo CNI (Sistema de Estatística de Comércio Exterior).

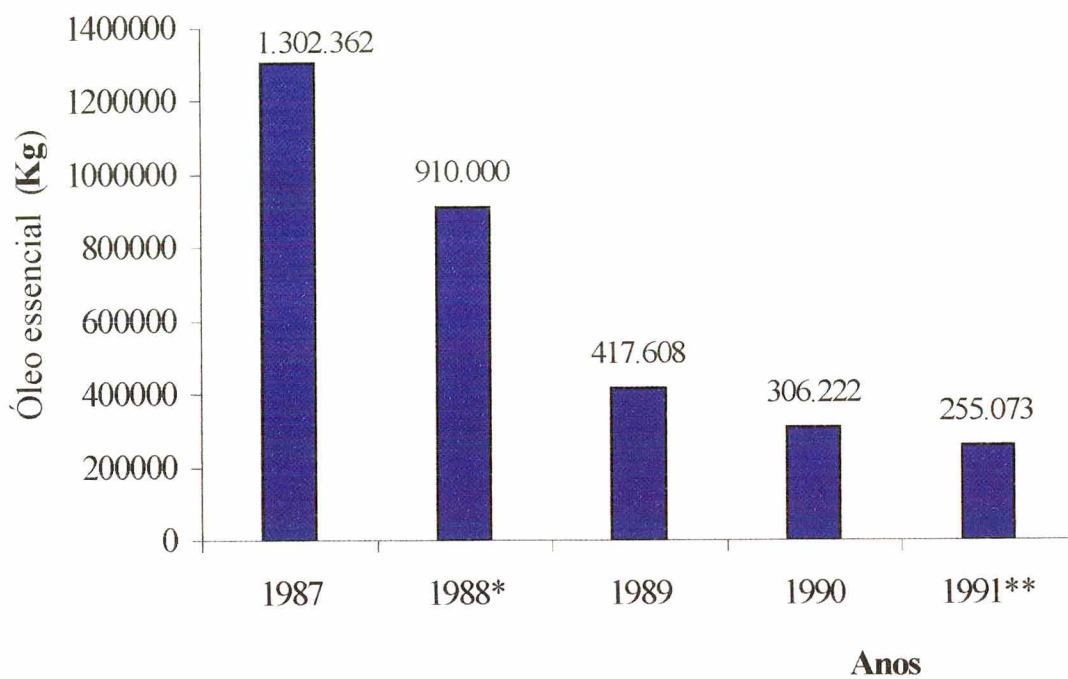
**Dados obtidos pelo Orient Resources Company.

***Dados fornecidos através do sistema ALICE (Importações Efetivas Dados Preliminares Consulta por Mercadoria) da SECEX (Secretaria do Comércio Exterior) - DECEX (Departamento de Operações de Comércio Exterior) - SERPRO (Serviço Federal de Processamento de Dados).

Quadro 6. Dados de exportação de óleo de sassafrás (ton.), através do Porto de Paranaguá, segundo registros do Posto de Controle e Fiscalização de Despachos Aduaneiros (Sistema de Controle de Exportações de Produtos Florestais – SISCOEX) do Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal - IBAMA, a partir de 1995.

Table 6. Amounts of sassafras oil exported (ton.) through Paranagua Harbor, after 1995, according to the records of the Control and Inspection Station of Boundary Dispatch (Control System for Forest Product Exportation - SISCOEX) of the Environmental and Legal Amazon Ministry.

<i>Data de exportação</i>	<i>País importador</i>	<i>Preço (US\$) (Kg)</i>	<i>Quantidade (toneladas)</i>	<i>Valor (US\$)</i>
27/01/95	Japão	6,00	5,50	33.000,00
19/05/95	Japão	5,20	32,12	167.024,00
28/01/98	EUA	6,65	14,96	99.484,00



* Janeiro a Setembro de 1988

** Janeiro a Novembro de 1991

Figura 1. Dados de exportação do óleo essencial de canela sassafrás obtidos junto à CACEX - 1992, segundo REXTER & DOBLER (1992).

Figure 1. Exportation data of the canela sassafras oil, from CACEX office - 1992, according to REXTER & DOBLER (1992).

CAPÍTULO III

ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS DA CANELA SASSAFRÁS. I - CULTURA DE EMBRIÕES IMATUROS E ORGANOGÊNESE¹

Duarte da Silva, JMO²; Oltramari, AC³; Maraschin, M⁴; Pedrotti, EL⁴.

² Acadêmica do Curso de Agronomia, Bolsista PIBIC/CNPq - CCA/Universidade Federal de Santa Catarina;

³ Acadêmica do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia - CCB/Universidade Federal de Santa Catarina;

⁴ Professor Adjunto - Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, CCA/Universidade Federal de Santa Catarina.
E-mail: m2@cca.ufsc.br

A canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) é uma espécie lenhosa pertencente à família *Lauraceae*. De hábito arbóreo perene, atinge 20 a 25 m de altura, com 50 a 70 cm de diâmetro na altura do peito (Reitz *et al.*, 1978). Apresenta copa densa, flores hermafroditas e floração intensa, a qual raramente corresponde à uma abundante frutificação (Fig. 1) No Brasil, sua distribuição é verificada entre as latitudes 8°45'N [Pernambuco] e 31°12'S [Rio Grande do Sul] e de 33°52' a 59°09' de longitude oeste (Salomão *et al.*, 1992). Se encontra em altitudes que variam de 10 a 1200 m, com temperaturas médias anuais variando de 12°C a 23°C (Carvalho, 1994).

No Estado de Santa Catarina, sua ocorrência é maior no ecossistema de Floresta Ombrófila Densa [Floresta Atlântica], especialmente no Vale do Rio Itajaí, sendo menos frequente na Floresta Ombrófila Mista [Floresta de Araucária]. No início da década de 40, aproximadamente 1/3 da biomassa de espécies lenhosas constituintes da Floresta Atlântica catarinense era representada por esta espécie (Reitz *et al.*, 1978).

A madeira de canela sassafrás foi muito empregada nas indústrias moveleira, naval e de construção civil (Reitz *et al.*, 1978). No artesanato catarinense, a madeira foi bastante usada na confecção de barris e garrafas para armazenar água ardente. Extratos alcoólicos de tecidos de raiz, casca, caule e folhas são usados como sudoríficos, anti-reumáticos e diuréticos pela medicina popular (Futuro *et al.*, 1998). Todavia, a comprovação científica destas atividades farmacológicas,

¹ Publicado na Revista *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*, 20: 44-48, 2001.

bem como os aspectos toxicológicos intrínsecos requerem estudos mais detalhados, devido à presença de safrol na fração de óleos essenciais de sassafrás, o qual é sabidamente um potente agente mutagênico e carcinogênico.

A exploração de biomassa de canela sassafrás visando a obtenção de óleo essencial rico em safrol ocorreu segundo um modelo extrativista durante várias décadas, levando a espécie ao risco de extinção. A nível industrial, a biomassa de raízes, casca e folhas foi amplamente utilizada para a extração de óleo essencial, o qual apresenta altos teores de safrol (Fig. 2), um composto alilbenzênico de grande importância econômica. Como exemplo disto, este composto tem sido utilizado como aromatizante nas indústrias de bebidas, cosméticos, alimentos e de medicamentos. A partir do safrol, dois derivados são obtidos, a heliotropina, que é um fixador de aroma, e o butóxido de piperonila, elemento essencial na produção de inseticidas biodegradáveis (Embrapa, 1998). A justificativa para a exploração desta espécie advém do fato de que, em média, 80% da essência de sassafrás é constituída por safrol. No entanto, outros compostos de interesse das indústrias química e farmacêutica tem sido identificados na fração óleo essencial desta espécie (Tabela 1).

Até a década de 60, o Brasil era o maior exportador mundial de óleo de sassafrás, sendo que esta atividade entrou em declínio em função do esgotamento das reservas naturais de biomassa de *O. odorifera*, principalmente em áreas de Mata Atlântica, no Sul do Brasil. Em 1992, o governo incluiu a canela sassafrás na lista de espécies ameaçadas de extinção e estabeleceu uma série de restrições que impediram o extrativismo legal desta árvore, resultando na queda significativa do volume de exportações brasileiras deste óleo (Ibama, 1992). Em função do exposto, estudos buscando formas alternativas de produção de safrol têm sido realizados com diversas espécies (*Sassafras officinale*, *Cinnamomum* spp, *Magnolia kobus*, *Boronia saffrolifera*, *Laurelia serrata*, *Daphnandra aromatica* e *Piper hispidinervium* Silva, 1987; Pescador *et al.*, 2000), que poderão ser manejadas através de um sistema sustentado de produção e com altos rendimentos, viabilizando desta forma o abastecimento do mercado sem prejuízos ecológicos. De fato, consoante às características intrínsecas de cada espécie e ao sistema de produção adotado, vantagens e desvantagens podem ser mencionadas, quando se objetiva a produção do óleo de sassafrás e, mais especificamente, de safrol em escala industrial. O presente trabalho discute aspectos e resultados de estudos de propagação vegetativa, micropropagação e de cultura de embriões de *Ocotea odorifera*. Tal abordagem é considerada como pressuposto básico para análises do potencial de utilização destas técnicas como ferramentas em processos de conservação e multiplicação massal de germoplasmas de interesse, bem como para a produção de metabólitos secundários em sistemas *in vitro*.

Tabela 1. Composição percentual de metabólitos secundários na fração de óleo essencial de canela sassafrás (*Ocotea odorifera*)*.

Metabólitos secundários	Conteúdo (%)
Safrol	92,9
Pineno	0,7
Eugenol	0,6
Furfural	0,17
Cineol	0,21
n-Valeraldeído	0,001
Benzaldeído	0,03
Sesquiterpenos	5,1

* Adaptado de Silva (1987).

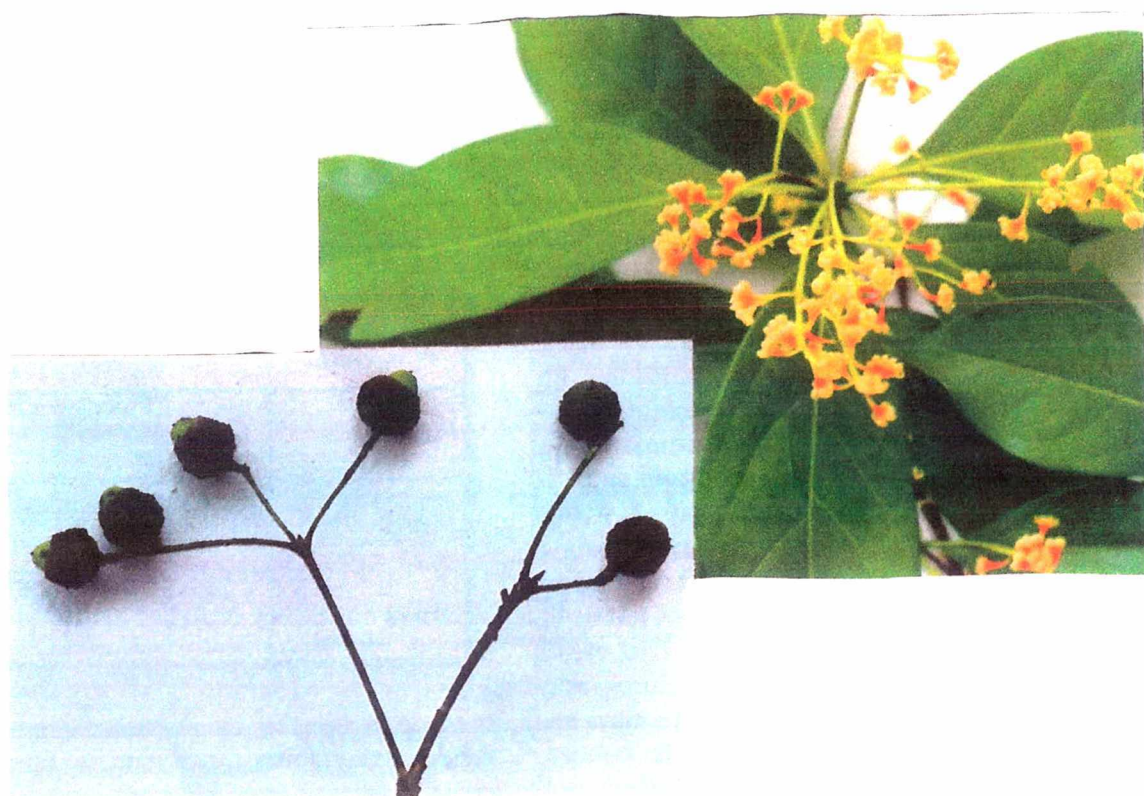


Figura 1. Inflorescências e frutos de canela sassafrás colhidos de planta matriz, com aproximadamente 30 anos de idade, nativa da Floresta Ombrófila Densa (Floresta Atlântica – Município de Taió, Vale do Itajaí – Santa Catarina).

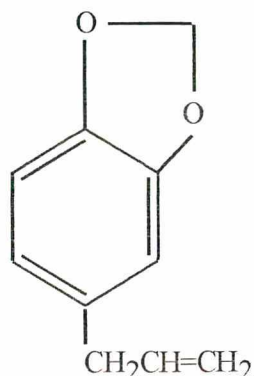


Figura 2. Safrol [4 alil 1,2 metileno dioxibenzeno], o composto majoritário do óleo essencial de canela sassafrás.

1 – Propagação vegetativa : limitações de uso

Uma das principais restrições à propagação vegetativa da canela sassafrás é o seu grande período de juvenilidade. O tempo necessário para a produção das primeiras sementes é variável entre plantas matrizes e regiões, contudo, o início do período reprodutivo ocorre, em média, entre os 25 e 40 anos. Esta característica, na prática, se traduz por uma dificuldade à obtenção de mudas, de modo a garantir o reflorestamento e/ou repovoamento de áreas de ocorrência desta espécie, comprometendo sua exequibilidade do ponto de vista tecnológico. Um segundo agravante refere-se à quantidade de material seminífero produzido por planta matriz, a qual é considerada baixa, (~ 2.000 sementes/ano/planta matriz de 100 anos de idade), comparativamente a outras espécies, como o eucalipto por exemplo, que produz mais de um milhão de sementes por planta matriz. Além deste fator, as sementes apresentam dificuldades na germinação e são intensamente atacadas por roedores, insetos e fungos, sendo baixa a viabilidade deste material (Pedrotti, comunicação pessoal).

Várias tentativas de reflorestamento em campo aberto não alcançaram êxito, devido principalmente ao fato de ser uma espécie que se regenera naturalmente em floresta secundária tardia a clímax, onde há elevada umidade e sombreamento. Seu crescimento é muito lento, sendo estimada uma rotação mínima de 42 anos para a extração do óleo de sassafrás (Carvalho, 1994).

Em função do exposto, o desenvolvimento de protocolos de propagação de canela sassafrás que permitam a obtenção de altos rendimentos (nº mudas/unidade de tempo) assume importância quando se buscam tecnologias adequadas aos processos de reflorestamento e/ou repovoamento de áreas com esta espécie. Entre as diversas técnicas de propagação existentes, a cultura de tecidos

vegetais tem mostrado excelentes resultados com várias espécies vegetais, sendo que o conjunto destas técnicas utiliza meios de cultura adequados e condições ambientais padronizadas, possibilitando a obtenção de elevadas taxas de regeneração de plantas e a propagação massal de clones superiores. Tal abordagem apresenta, além do aspecto de produção da biomassa (óleo essencial e safrol), de indiscutível importância econômica e social (Oltamari *et al.*, no prelo), um componente de importância ecológica bastante significativo, decorrente da condição de ameaça de extinção da espécie em tela.

2 - Estudos de cultivo *in vitro*

2.1 - Germinação de embriões imaturos

As primeiras observações relativas à taxa de germinação de sementes de canela sassafrás sugeriram a existência de um período de dormência, ou latência, imediatamente após a colheita dos frutos, juntamente com a ocorrência de um rápido processo de deterioração do material seminífero. Em decorrência disto, a germinação asséptica de embriões imaturos desta espécie parece ser uma estratégia de interesse na resolução deste problema. Deste modo, experimentos visando checar esta possibilidade foram realizados utilizando frutos contendo embriões imaturos, colhidos de plantas matrizes nativas do Vale do Itajaí (Taió – SC) e incubados a 4°C, por 15 e 30 dias, na ausência de luz. Ao término destes períodos, os embriões imaturos foram excisados (~ 5,0 mm comprimento) e transferidos para meio de cultura MS/2, contendo a metade da concentração salina proposta por Murashighe & Skoog (1962), e suplementado com 4 µM de 6-benzilaminopurina (6-BAP). Para efeito de controle, embriões imaturos não submetidos ao tratamento térmico foram inoculados no meio de cultura, imediatamente após sua colheita.

Os resultados indicaram que a termoterapia a 4°C não afetou o percentual de germinação de embriões de *Ocotea odorifera* de modo significativo, sendo que a maioria dos embriões germinou, independente da duração do período de refrigeração (Tabela 2). Contudo, uma velocidade maior de germinação foi observada, sendo este comportamento diretamente proporcional à duração do período de tratamento térmico, o que sugere a existência de uma relação entre estas duas variáveis. Os dados obtidos indicam a ocorrência de uma fase de dormência dos embriões imediatamente após a colheita, considerando o efeito redutor do período de germinação causado pelo tratamento térmico. A dormência é definida como a incapacidade do embrião germinar quando submetido a condições desfavoráveis decorrentes da ação de agentes abióticos (luz, temperatura, O₂ e água, por exemplo), sendo que múltiplos fatores podem atuar como modificadores do estado de dormência de

embriões de uma mesma variedade, i.e., o habitat, a idade e a localização dos frutos na planta mãe. É sabido que a exposição de meristemas e embriões vegetais a baixas temperaturas (i.e., 4°C), ao longo de um determinado período de tempo, pode levar à superação da condição de dormência/latência destas estruturas, na medida em que a degradação e/ou imobilização de compostos inibidores de crescimento, i.e. brotação e germinação, é favorecida. Além disto, os mecanismos de regulação da dormência em tecidos seminíferos funcionam de maneira altamente integrada, onde as diversas estruturas das sementes respondem diferentemente aos agentes ambientais de indução, manutenção e remoção da dormência. A dormência dos embriões poderá ser caracterizada, então, através da percentagem de germinação e do número de plântulas produzidas.

Os dados demonstram, portanto, a existência de compostos com ação inibitória de crescimento nos tecidos seminíferos de *O. odorifera*. Neste sentido, sugere-se que produtos oriundos da degradação de componentes da fração de óleos essenciais poderão estar envolvidos no processo inibitório da germinação, principalmente quando se leva em conta o alto grau de oxidação das estruturas embrionárias e demais tecidos, logo após à colheita dos frutos. Estudos neste sentido encontram-se em andamento, enfocando a ação de enzimas (polifenol oxidases, e.g.) possivelmente envolvidas em vias de biossíntese/degradação de metabólitos secundários com atividade sobre a resposta germinativa.

Tabela 2. Percentagem de germinação de embriões imaturos de *Ocotea odorifera*, em função do período de refrigeração (4°C) em meio de cultura MS/2 suplementado com 4 µM de 6-BAP.

Período de refrigeração	PERÍODO DE CULTURA (dias)						Embriões não germinados
	20	40	50	60	80	100	
0 dias	-	-	25	40	55	70	5
15 dias	-	50	55	60	65	65	5
30 dias	55	75	85	85	85	85	-

2.2 – Análise do crescimento de plântulas

As plântulas de *O. odorifera* resultantes da germinação asséptica foram monitoradas quanto ao seu crescimento, através de leituras periódicas da altura (cm). Os dados (Fig.

3) indicaram que o tratamento térmico influenciou o crescimento das plântulas, sendo que aquelas mantidas a 4°C por 30 dias alcançaram uma altura média superior e em menor período de tempo, comparando-se com os demais períodos de refrigeração. Resultados semelhantes foram obtidos para o parâmetro crescimento longitudinal de raízes.

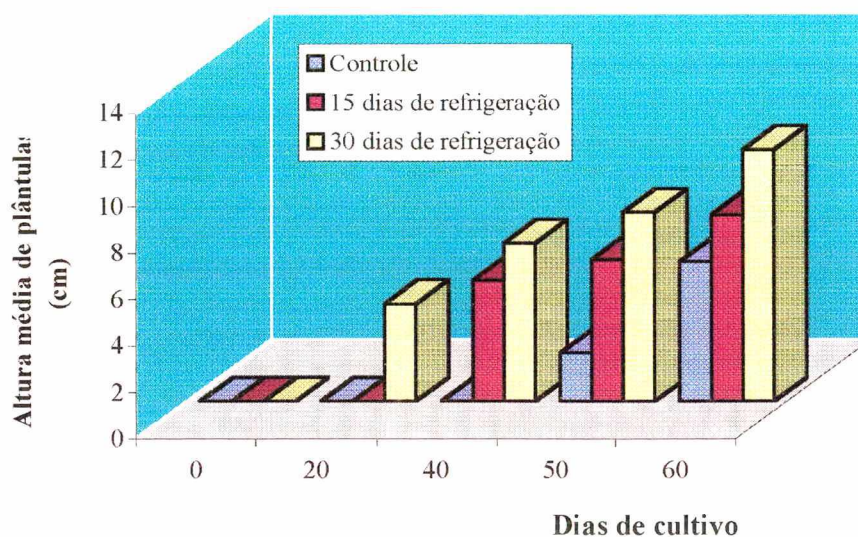


Figura 3. Altura média (cm) de plântulas de canela sassafrás germinadas *in vitro*, em meio MS/2 acrescido de 6-BAP (4 μ M), em função dos períodos de refrigeração (0, 15 e 30 dias).

Tomados em conjunto, os dados sugerem que o tratamento térmico a 4°C por 30 dias permitiu a obtenção de um maior número de plântulas por unidade de tempo e com um maior crescimento de parte aérea e sistema radicular, otimizando o processo de produção de mudas da espécie em tela. Estes resultados assumem importância na medida em que a propagação de canela sassafrás ocorre através das sementes, porém os valores de germinação e sobrevivência de plântulas usualmente observados a campo são baixos, pois as mesmas são intensamente atacadas por insetos e fungos, antes e após a sua maturação fisiológica. Da mesma forma, o alto teor de óleo encontrado nos tecidos do fruto e da semente possibilita a rápida deterioração destes materiais, corroborando para a redução do índice de germinação. Os métodos convencionais de propagação vegetativa (enraizamento de estacas, e.g.) não têm apresentado resultados satisfatórios e, em função disto, o desenvolvimento de métodos não convencionais de propagação, através da cultura de tecidos vegetais por exemplo, parece ser uma alternativa viável, na medida em que possibilita a obtenção de taxas de multiplicação maiores, permitindo a propagação massal da espécie com valores de

rendimento mais interessantes, especialmente quando se objetiva a reposição e preservação da espécie em seu ecossistema.

Um segundo componente de interesse em estudos de micropropagação vem a ser a seleção de plantas matrizes que apresentem um perfil fenotípico superior. Neste contexto, buscou-se avaliar o efeito da fonte de explantes sob a taxa de crescimento de plântulas de canela sassafrás *in vitro*. Para tal, três plantas matrizes com idade mínima superior a 25 anos - clones II, III e VII – e nativas da Floresta Atlântica do Sul do Brasil (Vale do Itajaí, município de Taió-SC) foram selecionadas e seus frutos coletados simultaneamente no mês de fevereiro/1999. Os embriões imaturos, em número de quinze unidades/clone, foram excisados, inoculados em meio de cultura MS/2 suplementado com 4 μM de 6-benzilaminopurina e mantidos a $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 85-90% U.R e intensidade luminosa de $4\mu\text{M}$ fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ao longo de 90 dias de cultivo. Ao término do experimento, os valores médios de altura máxima de plântulas para os clones foram determinados, revelando a existência de comportamentos distintos de crescimento, segundo a origem dos explantes (Fig. 4). Os dados indicaram que as plântulas oriundas do clone II e VII apresentaram taxas médias de crescimento superiores ao clone III em 7,5 e 3,9 ordens de magnitude, respectivamente, com base na altura máxima média de parte aérea. De forma similar, o número médio de gemas/plântula/clone situou-se entre 7 e 9, sendo superior nestes dois clones em relação ao clone III. Estes dados são indicadores de um efeito significativo da fonte de explante sobre a resposta morfogenética, na medida em que os clones II e VII demonstraram um comportamento superior no que concerne ao seu potencial como fontes de explantes para micropropagação *in vitro* de *O. odorifera*. As diferenças encontradas reforçam a necessidade do aprofundamento dos estudos de propagação desta espécie. Presentemente, um total de 12 germoplasmas desta espécie, oriundos do Vale do Itajaí - SC, têm sido mantidos sob cultivo *in vitro* (Laboratório de Morfogenese e Bioquímica Vegetal - CCA /Universidade Federal de Santa Catarina), com o intuito de aprofundar os estudos neste contexto, bem como avaliar o potencial biossintético de safrol destes materiais.

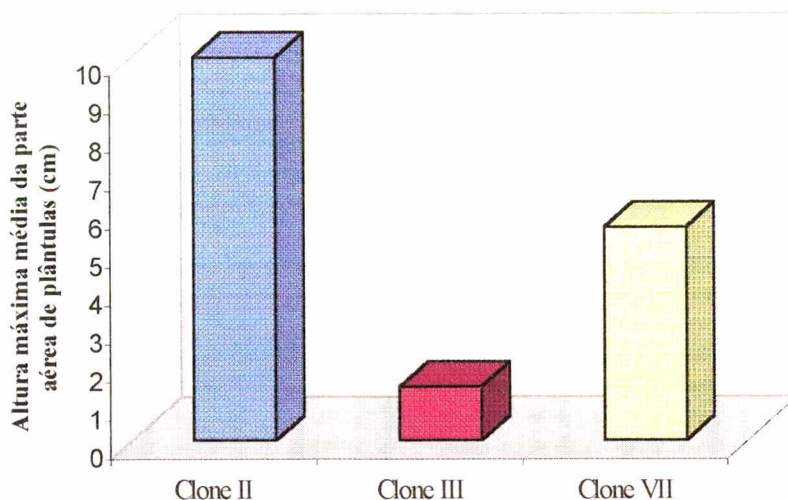


Figura 4. Altura máxima média da parte aérea de plântulas de canela sassafrás aos 90 dias de cultivo, obtidas a partir da germinação *in vitro* de embriões imaturos em meio MS/2 suplementado com 4 μM de 6-BAP, segundo o clone de origem.

2.3 – Organogênese

Uma segunda estratégia para a multiplicação *in vitro* de canela sassafrás tem considerado a análise da expressão do potencial de organogênese de explantes, a saber: segmentos nodais, segmentos cotiledonares e segmentos de raiz, provenientes de plântulas germinadas *in vitro*. Neste estudo, os efeitos da suplementação do meio de cultura MS/2 com 6-BAP e de exposição dos cultivos à luz foram avaliados mensalmente, considerando-se o percentual de neoformação de gemas nos diversos explantes, ao longo de um período de 150 dias.

Os maiores valores de neoformação de gemas a partir de segmentos nodais foram obtidos utilizando 6-BAP na concentração de 4 μM , enquanto a concentração de 17,6 μM causou a redução da expressão deste fenômeno, notadamente após 90 dias de cultivo (Fig. 5). A manutenção dos cultivos na ausência de luz no período inicial de cultivo (0 a 90 dias) constituiu-se em condição inibitória de processos oxidativos dos tecidos dos explantes. A subsequente exposição das culturas à luz (90 a 150 dias, 40 μM fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), por sua vez, foi estimulatória da formação de calos, além de aumentar a frequência de ocorrência de oxidação dos tecidos, independentemente da concentração de 6-BAP no meio de cultura (Fig. 6).

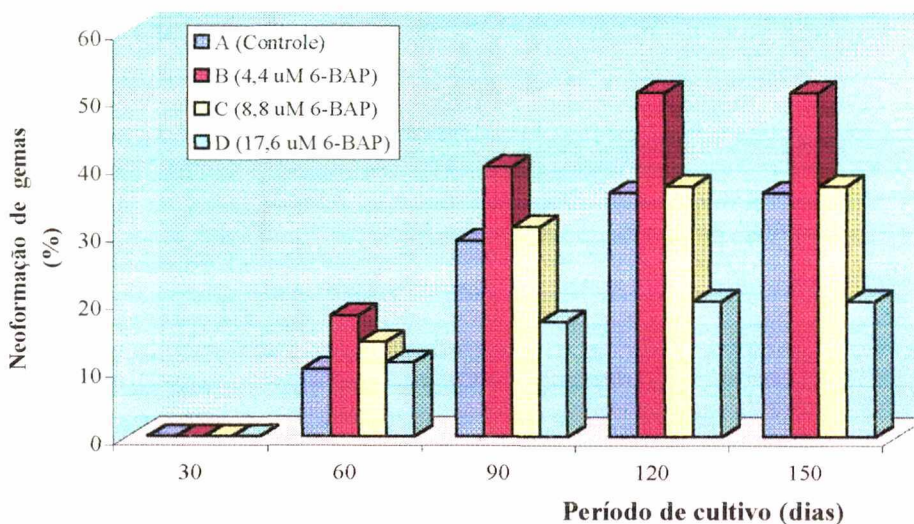


Figura 5. Percentagem de neoformação de gemas em segmentos nodais de canela sassafrás em meio MS, adicionado de 2,5 μM de AIB, 0,577 μM de GA_3 e 6-BAP nas concentrações de 0,0 μM (A - controle), 4,4 μM (B), 8,8 μM (C) e 17,6 μM (D), durante o período de 150 dias de cultivo. Durante o período inicial de cultivo (0 a 90 dias), os explantes foram mantidos na ausência de luz e posteriormente (90 a 150 dias) expostos à luz ($40\mu\text{M}$ fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

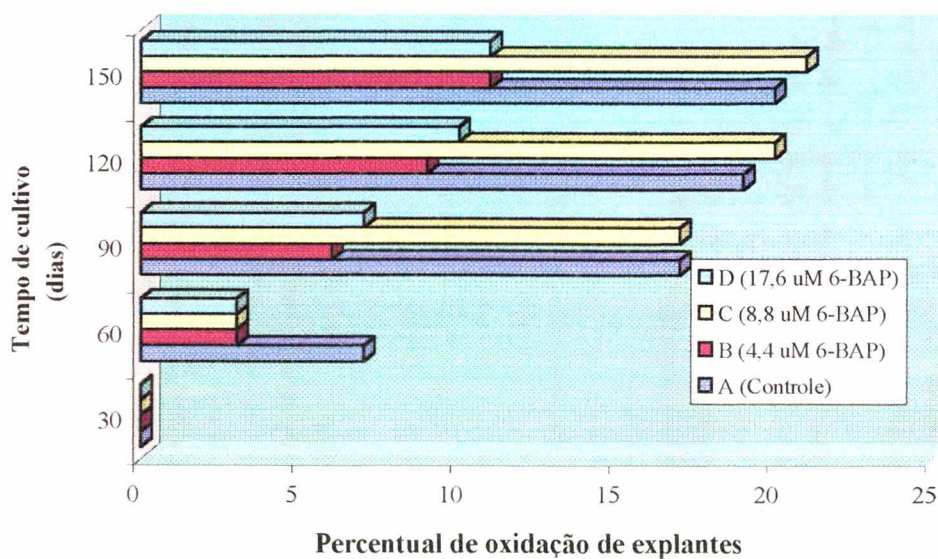


Figura 6. Percentagem de oxidação de segmentos nodais de canela sassafrás em meio de cultura MS, adicionado de 2,5 μM de AIB, 0,577 μM de GA_3 e 6-BAP nas concentrações de 0,0 μM (A - controle), 4,4 μM (B), 8,8 μM (C) e 17,6 μM (D), durante o período de 150 dias de cultivo. Durante o período inicial de cultivo (0 a 90 dias), os explantes foram mantidos na ausência de luz e posteriormente (90 a 150 dias) expostos à luz ($40\mu\text{M}$ fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

A neoformação de gemas a partir de cotilédones não foi detectada, mas sim a neoformação de raízes, principalmente para o tratamento com 4,4 μ M de 6-BAP (Fig. 7). Por sua vez, os segmentos de raízes não apresentaram neoformação de gemas, tendo sido observado somente um alongamento das raízes laterais aos 30 dias de cultivo. Estes explantes apresentaram um aspecto vitrificado (hiperhidricidade), havendo a formação de calos de coloração branca.

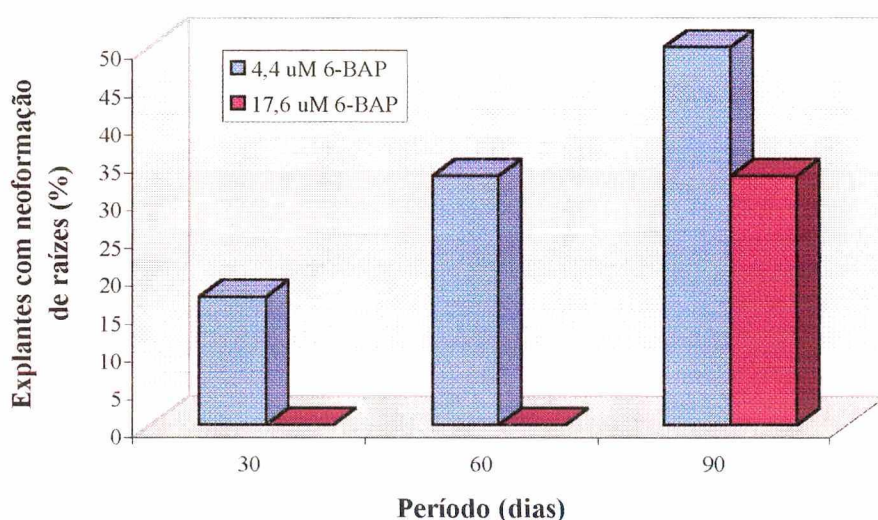


Figura 7. Percentagem de neoformação de raízes a partir de segmentos cotiledonares de *O. odorifera* em meio MS suplementado com 6-BAP, nas concentrações de 4,4 μ M e 17,6 μ M e 2737 μ M de L-glutamina.

3 - Considerações Finais

A estratégia de utilização de técnicas biotecnológicas tem se mostrado viável no estudo de fenômenos morfogênicos de *Ocotea odorifera*, permitindo o resgate de material seminífero através do cultivo *in vitro* de embriões imaturos, com aumentos substanciais na taxa de sobrevivência deste material em relação ao observado a campo. Adicionalmente, a micropropagação da espécie a partir de segmentos nodais é uma alternativa de interesse, ainda que estudos mais detalhados se façam necessários, notadamente no que se refere à otimização do protocolo buscando reduzir o período de residência dos cultivos. Por último, a adoção deste tipo de tecnologia assume importância em programas de seleção e manutenção de germoplasmas de canela

sassafrás, bem com para a produção de mudas em larga escala para efeitos de repovoamento e/ou reflorestamento de áreas com esta espécie.

4 - Referências Bibliográficas

- BRASIL-IBAMA. Portaria n.006/92-N, 15 de Janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, Jan. 1992.
- Carvalho, PER. **Espécies florestais brasileiras recomendações: Silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas Florestais. Colombo: EMBRAPA - CNPF; Brasília - SPI, 640p. 1994.
- Duarte da Silva, T. **Estabelecimento de métodos para a micropropagação da canela sassafrás (*Ocotea odorifera*)**. Florianópolis: UFSC, 1989. 37p. Relatório de estágio (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1989.
- BRASIL-EMBRAPA. **Embrapa identifica pimenta que produz safrol**. Boletim semanal de divulgação científica. Ano VI, novembro/1998, 4p.
- Futuro, DO; Figueiredo, MR. **Lignanas e neolignanas de *Lauraceae*: Diversidade química e potencial de biodiversidade**. In: XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lidóia. *Resumos*, p.165, 1998.
- Murashige, T; Skoog, D. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiol Plant.*, 15: 473-497, 1962.
- Oltramari, AC; Duarte da Silva, JMO; Pedrotti, EL; Maraschin, M. **Análise histórica e de mercado da atividade extrativista da madeira e do óleo essencial da canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) no Estado de Santa Catarina**. *Revista Árvore* (no prelo).
- Pescador, R; Araujo, PS; Maas, CH; Rebelo, RA; Giotto, CR; Wendhausen Jr., R; Largura, G; Tavares, LBB. **Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta Longa**. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*, n. 15; pp. 18-23, 2000.
- Reitz, R; Klein, RM; Reis, A. **Projeto madeira de Santa Catarina**. *Sellowia*, Itajai, 320p. 1978.
- Rexter, U; Dobler, G. **Untersuchungen über die Baumart canela sassafrás (*Ocotea pretiosa* Mez.)**. Weihenstephan: Fachhochschule Weihenstephan, 1992. 276p. M.Sc. Thesis (Fachbereich Forstwirtschaft) - Fachhochschule Weihenstephan, 1992.
- Salomão, NA; Brandão, JEM; Silva, JA. **Distribuição geográfica de seis espécies florestais como subsídio para a escolha de conservação "in situ"**. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p. 1237-1240. Publicado na Revista do Instituto Florestal, v.4, parte 4, edição especial, 1992.
- Silva, JLN. **Estudo sintético de derivados do óleo de sassafrás**, Florianópolis: UFSC, 1987. 53p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1987.

CAPÍTULO IV

ANÁLISE DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM CULTURA DE CÉLULAS DE CANELA SASSAFRÁS (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) POR $^1\text{H-RMN}^1$

Ana Carla Oltramari², Josiane M.O.D. da Silva², Patrícia S. Araujo²; Renata dos Passos², Ênio L. Pedrotti², Ana Maria Viana³, Robert Verpoorte⁴, Miguel S.B. Caro⁵, Marcelo Maraschin²

²Lab. Morfogênese e Bioquímica Vegetal - Centro de Ciências Agrárias/UFSC; ³Centro de Ciências Biológicas/UFSC; ⁴Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Pharmacognosy Division, Gorlaeus Lab., Leiden University/The Netherlands; ⁵Central de Análises, Depto de Química/UFSC.

RESUMO - A análise da metabolização de carboidratos em extratos celulares de *Ocotea odorifera* foi estudada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$). As culturas de células foram mantidas em meio WPM, suplementado com sacarose, glucose ou lactose (3g%), durante trinta dias. Extratos aquosos de amostras de biomassa celular foram obtidos em intervalos regulares, liofilizados e ressuspensos em D_2O para quantificação dos carboidratos por $^1\text{H-RMN}$. A análise dos espectros de $^1\text{H-NMR}$ dos extratos aquosos dos cultivos celulares suplementados com sacarose revelou a ocorrência de sinais característicos de $\alpha\text{-D-Glc}$ e $\beta\text{-D-Glc}$, cuja intensidade aumentou segundo um modelo quadrático ao longo do período de cultivo. As células cultivadas em meio contendo glucose apresentaram uma máxima concentração endógena dos anômeros $\alpha\text{-}$ e $\beta\text{-D-Glc}$ 5 dias após o subcultivo. Após este período, os valores de concentrações mantiveram-se estáveis até o final do período de cultivo. Sinais característicos de lactose não foram observados nos espectros de $^1\text{H-RMN}$, sugerindo a existência de metabolização extracelular deste dissacarídeo, provavelmente por via enzimática ($\beta\text{-galactosidase}$). A máxima concentração endógena de $\alpha\text{-Glc}$, $\beta\text{-Glc}$ e D-Gal foi observada no 15º dia após o subcultivo. Os resultados evidenciam a existência de um equilíbrio intracelular de anômeros de D-Glc , independentemente da fonte de carbono utilizada.

Palavras-chave: *Ocotea odorifera*, culturas celulares, metabolismo de carbono, espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$, canela sassafrás.

¹ Capítulo a ser submetido à revista Phytochemical analysis.

1. INTRODUÇÃO

A canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) - *Lauraceae*.) é uma espécie lenhosa sob risco de extinção, devido à intensa exploração de sua biomassa lignocelulósica para a extração de óleo essencial rico em safrol. A partir deste composto alilbenzênico são obtidos a heliotropina, um fixador de aromas e o butóxido de piperonila, composto utilizado na produção de inseticidas biodegradáveis (EMBRAPA, 1998). Devido às limitações desta espécie no que concerne ao seu cultivo em sistema agroflorestal, a produção de safrol via cultura de células e tecidos vegetais apresenta-se como uma alternativa de interesse para a obtenção deste metabólito.

A expressão da informação genética relacionada à formação de metabólitos secundários somente é observada quando as células vegetais são providas de condições adequadas ao seu desenvolvimento, notadamente no que se refere aos processos de diferenciação. No contexto epigenético, entre os fatores que influenciam a produtividade da cultura destaca-se a composição do meio de cultura, a luz (λ e fotoperíodo), a temperatura (Zhang *et al.*, 1998), o tipo de biorreator e a composição atmosférica ([CO₂], [O₂], e.g) nos frascos de cultivo (Schlatmann, 1995; Maraschin e Verpoorte, 1999). Diversos estudos têm demonstrado que a substituição da fonte de carbono no meio de cultura gera, em alguma extensão, estímulos à síntese de metabólitos secundários de interesse (Ketchum e Gibson, 1996; Maraschin, 1998; Wu e Ho, 1999). Como exemplo disto, aumentos na síntese de metabólitos de interesse farmacológico tais como taxol - *Taxus canadensis* e *T. baccata* - velutinol A - *Mandevilla velutina* - e ajmalicina - *Catharanthus roseus* - (Ketchum e Gibson, 1996; Hirasuna *et al.*, 1996; Maraschin, 1998; Araujo, 2001; Schlatmann, 1995).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma forma de espectrometria baseada na absorção de energia na faixa da radiofrequência por núcleos atômicos (e.g., ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ³¹P, ³⁹K, etc) que possuem um momento magnético (i.e. momento de dipolo magnético, spin nuclear \neq zero e quadrupolo elétrico), quando submetidos a um campo magnético estacionário (Roberts e Jardetzky, 1981; Freitas e Bonagamba, 1999). A utilização desta técnica tem crescido nas últimas cinco décadas, envolvendo estudos de determinação estrutural de novos compostos, análise da composição de diversos biofluidos

(urina, plasma sanguíneo, bÍlis, fluído seminal e fluído cerebrospinal), bebidas e alimentos (Maraschin *et al.*, 2001; Sachi, 2001), bem como de extratos de tecidos animais e vegetais, visando a obtenção de informações de aspectos metabólicos (Schripsema *et al.*, 1991). De fato, os progressos alcançados no desenvolvimento de equipamentos de alta resolução e programas de gerenciamento (*softwares*) têm permitido a obtenção de avanços significativos nas áreas de bioquímica animal e vegetal, como por exemplo a caracterização de produtos naturais em matrizes biológicas complexas, tais como extratos vegetais crus (Wolfender *et al.*, 2001). As diversas abordagens experimentais da RMN e o acoplamento direto desta técnica à cromatografia líquida e/ou espectrometria de massa, têm permitido a análise de pequenas quantidades de compostos puros com grande precisão, em escalas de miligramas ou microgramas (Lacey *et al.*, 1999; Wolfender *et al.*, 2001).

De forma mais específica, o uso da RMN apresenta grande potencial para o estudo de processos metabólicos em cultura de células de plantas e na detecção e monitoramento de diferentes compostos. Como exemplo disto, estudos da variação do pH citoplasmático e vacuolar de células de raízes de milho têm sido realizados por ^{31}P -RMN (Roberts *et al.*, 1980), além da investigação de reações de biossíntese e interconversão de fenilpropanóides \leftrightarrow fenilpropenóides, em culturas de raízes de *Anigozanthos preissii*, utilizando-se precursores isotópicos e ^{13}C -NMR (Schmitt e Schneider, 2001). Em outra abordagem, a ^1H -RMN tem demonstrado sua viabilidade como método de quantificação de carboidratos intra e extra-celulares e de identificação de aminoácidos em extratos aquosos de células de *Catharanthus roseus* e *Tabernaemontana divaricata* (Schripsema *et al.*, 1991; Schripsema e Verpoorte, 1991). De forma similar, análises da cinética de metabolização de fontes de carbono por ^1H -RMN, em sistemas de cultivos celulares estáticos e em biorreatores (*air-lift*) de *Mandevilla velutina*, têm sugerido a existência de diferenças significativas de taxas de catabolismo entre os dois sistemas de cultivo (Araujo *et al.*, 2001). Esta abordagem é de interesse em estudos de viabilidade técnica do sistema de cultivo celular (bioprocesso) em larga escala (Akalezi *et al.*, 1999), notadamente pelas vantagens metodológicas que a RMN oferece.

O presente trabalho enfoca o estudo cinético do metabolismo de carbono em culturas celulares estáticas de canela sassafrás por ^1H -RMN.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células em meio semi-sólido

Os cultivos celulares em meio semi-sólido foram iniciados utilizando-se como explantes de segmentos de limbo foliar ($\sim 50 \text{ mm}^2$) de plântulas de *O. odorifera* cultivadas *in vitro*, conforme previamente descrito (Duarte da Silva *et al.*, 2001). Amostras de 1,5 g de biomassa celular, oriundas de culturas estoques (Oltamari, 1998), foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980), acrescido de Picloram (10 μM), Cinetina (1 μM), vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951) e ágar (0,6g%). Sacarose (**Suc**), glucose (**Glc**) e lactose (**Lac**) foram utilizadas isoladamente na suplementação do meio de cultura, em concentração de 3g%. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, previamente à autoclavagem. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e 85% de umidade relativa (UR), durante 30 dias.

Preparação dos extratos de células para análise por ^1H -RMN

Para efeito de análise de metabolização das fontes de carbono, amostras de 1,5 g de células (peso fresco) por tratamento foram coletadas em intervalos regulares (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a inoculação), armazenadas a -20°C e liofilizadas. Os liofilizados foram ressuspensos em 15 ml de água destilada/deionizada para obtenção do extrato aquoso em homogeneizador Turrax. As amostras foram centrifugadas (5 Krpm/10 min), coletando-se 5 ml do sobrenadante/tratamento para liofilização. Imediatamente após a liofilização, os frascos contendo as amostras foram selados e armazenados a -20°C para posterior análise do conteúdo de carboidratos por ^1H -RMN.

Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio (^1H -RMN)

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 700 μL de D_2O e centrifugadas, coletando-se 550 μL de cada amostra para análise do conteúdo dos carboidratos de

interesse. Os espectros de ^1H -RMN foram obtidos em equipamento Bruker WM300, operando na frequência de ressonância de próton de 300 MHz, com os seguintes parâmetros: $J_2 = 0,6$ ms, tempo de relaxação de 1s, pulso de irradiação de 90° , 54 varreduras, tempo de aquisição de 0,6 s, temperatura de 28°C e ácido trimetil-silil-propiónico ($\delta_{\text{TSP}}: 0,00$) como padrão interno. Os dados foram processados em estação de trabalho Silicon Graphics (Aspect 2000 Data System).

Quantificação de carboidratos

A quantificação dos carboidratos a partir dos espectros de (^1H -RMN) foi efetuada medindo-se a altura dos picos específicos (intensidade de sinal) para cada composto, em relação ao valor de altura do pico do padrão interno [ácido trimetil-silil-propiónico, 3 mg/10 ml - $\delta = 0$ ppm - Schripsema, 1991). Os sinais referenciais usados para a detecção e quantificação dos carboidratos em estudos foram determinados a partir dos espectros dos compostos padrões (1 mg/ml D_2O , pH = 5,5), sendo $\delta_{\alpha\text{-D-glucose}}: 5,24 - \text{H1}$; $\delta_{\beta\text{-D-glucose}}: 4,62 - \text{H1}$; $\delta_{\text{sacarose}}: 5,40$; $\delta_{\text{D-galactose}}: 4,44 - \text{H3}$ e $\delta_{\text{TSP}}: 0,00$ (padrão interno).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos espectros de ^1H -NMR dos extratos aquosos dos cultivos celulares de *O. odorifera* suplementados com Suc (3g%) revelou a ocorrência de sinais característicos de $\alpha\text{-D-Glc}$ e $\beta\text{-D-Glc}$, cuja intensidade aumentou segundo um modelo quadrático ($r^2 = 0,87$ e $0,95$, respectivamente - *software* Origin 5.0) ao longo do período de cultivo. Além disto, a existência de um equilíbrio intracelular entre os anômeros α - e $\beta\text{-D-Glc}$ foi observada, com um predomínio deste último ao longo de todo o período experimental. (Fig. 1). Em um espectro de ^1H -RMN, a intensidade de um dado sinal é proporcional à concentração do nuclídeo envolvido. Tal aspecto permite a determinação direta da concentração de um composto em amostras de células, tecidos e meios de cultura, uma vez que o sinal referencial pode ser considerado como um marcador a nível atômico

inequívoco do composto alvo. Tal abordagem tem permitido a comparação direta da concentração de compostos totalmente distintos, bem como a detecção de metabólitos secundários vegetais de interesse farmacológico em matrizes biológicas complexas por 1D ^1H -RMN (Schripsema e Verpoorte, 1991; Maraschin *et al.*, 2001, Wolfender *et al.*, 2001).

A linhagem celular em estudo parece não absorver **Suc**, uma vez que não foram detectados sinais deste dissacarídeo no meio intracelular, sugerindo sua metabolização a nível extracelular e/ou apoplástico, possivelmente por via enzimática, i.e. *invertase*, esse fato pode estar relacionado com o menor custo energético da célula para metabolizar esse dissacarídeo. A metabolização extracelular deste carboidrato tem sido relatada em diversas espécies vegetais - batata e espinafre, e.g., em estudos de caracterização de sistemas transportadores de **Suc** a nível de membrana plasmática, utilizando sistemas complementares - *Saccharomyces cerevisiae*, e.g. (Riesmeir *et al.*, 1992 e 1993; Kühn *et al.*, 1999). Nesta levedura, dois sistemas de transporte de **Suc**, *StSUT1* e *SoSUT1*, têm sido caracterizados em estudos utilizando ^{14}C -**Suc** como marcador isotópico. Os resultados evidenciaram a dependência direta do fenômeno de transporte das condições de pH fisiológico e a afinidade do sistema transportador - K_m de 1,5 mM e 1 mM de **Suc** para *SoSUT1* e *StSUT1*, respectivamente. Adicionalmente, a presença de maltose (K_m de 5 mM para *SoSUT1* e 10 mM para *StSUT1*) ou de protonóforos (2,4-DNP, e.g.) é inibitória do transporte deste dissacarídeo (Riesmeir *et al.*, 1992 e 1993).

Estudos mais detalhados do processo de transporte de carboidratos usando marcadores isotópicos têm subseqüentemente permitido a determinação de propriedades cinéticas, pH ótimo, efeito de inibidores sensitivos e substratos específicos de vários produtos dos genes *SUT*. Até o momento, todos os transportadores de sacarose de plantas identificados são dependentes de energia e sensíveis a protonóforos, indicando que eles funcionam como simporters de próton.

A sacarose pode especificamente controlar a expressão de um grande número de genes (Lalonde *et al.*, 1999), como exemplos de genes regulados, o gene *ATB2* relacionando ao metabolismo de leucina em *Arabidopsis* e o promotor *RolC* em *Agrobacterium* (Smeekens e Rook, 1997; Yokohama *et al.*, 1997). No primeiro caso, tem sido demonstrado que a suplementações exógenos de **Suc** em concentrações superiores à 25 mM conduzem á repressão da transcrição do gene *ATB2* (Rook *et al.*, 1998). Em beterraba

açucareira, elevadas concentrações de açúcar conduzem a repressão da atividade de transporte da **Suc**, correlacionando com a redução na constante estável dos níveis de mRNA de *BvSUT1* (Chiou e Bush, 1998). O K_m do sistema transportador para a **Suc** tem sido em alguns casos, em torno de 1mM (Reismeier *et al.*, 1993; Lemoine *et al.*, 1996). Resultados similares foram obtidos em transportadores de sacarose *SUC1* e *SUC2* de *Arabidopsis* (Lalonde *et al.*, 1999). A elevada concentração de **SUC** no meio de cultura em estudo ($\cong 20,5$ mM), pode ter sido um fator inibidor da ação do transportador nas culturas de células em estudo, já que esse dissacarídeo não foi detectado no meio intracelular.

Análises posteriores de bibliotecas genômicas e de cDNA heterólogos, utilizando os genes transportadores de **Suc** isolados de *S. cerevisiae* como sondas, identificaram uma série de genes de transporte em diversas espécies vegetais, como por exemplo: *LeSUT1*, *LeSUT2* e *LeSUT4* - *Lycopersicon esculentum*, *NtSUT1* e *NtSUT3* - *Nicotiana tabacum*, *BvSUT1* - *Beta vulgaris* e *PmSUC1* e *PmSUC2* - *Plantago major* (Bürkle *et al.*, 1998, Gahrtz *et al.*, 1994, Kühn *et al.*, 1999). Alguns destes transportadores apresentam padrões de expressão e de regulação bastante específicos, dependentes do tecido (foliar, pólen, óvulo, cotilédones) e do estágio fenológico e da atividade de ATPase, por exemplo (Kühn *et al.*, 1999). Contudo, a maioria dos estudos neste contexto tem usado estruturas diferenciadas como modelo experimental, sendo que abordagens semelhantes em sistemas de culturas de células vegetais são carentes. Este aspecto pode limitar, em alguma extensão, a realização de análises comparativas e a aplicabilidade de seus resultados, principalmente considerando as diferenças de ambiente celular existentes entre os sistemas não diferenciados (culturas celulares) em relação aos diferenciados (tecidos e órgãos).

As células cultivadas em meio contendo **Glc** (3g%) como fonte única de carbono apresentaram uma máxima concentração endógena dos anômeros α - e β -**D-Glc** aos 5 dias, coincidindo com a fase exponencial de crescimento (Oltamari, 1998). Após este período, os valores de concentração mantiveram-se estáveis até o final do período de cultivo (Fig. 2). De forma similar ao tratamento com **Suc**, o equilíbrio entre α -**D-Glc**/ β -**D-Glc** foi observado nos cultivos, com predomínio do anômero β -**D-Glc**. Resultados prévios (Oltamari *et al.*, 2000) demonstraram que a concentração endógena de **Glc** aumentou segundo um modelo linear ($r^2 = 0,82$) para as culturas em meio controle (**Suc**, 3g%). Além disso, as linhagens celulares cultivadas em presença de **Glc** (3g%) mostraram uma cinética

de metabolização superior ao controle em duas ordens de magnitude e máxima concentração endógena aos 5 dias, confirmando os dados observados no presente estudo. Considerando-se que o isolamento dos explantes foliares de *O. odorifera* e a indução à calogênese ocorreram diretamente em meio suplementado com **Suc** 3g% (Oltramari, 1998), além do fato de que os experimentos foram conduzidos com populações em sua primeira geração de cultivo em meio contendo **Glc** (3g%) como fonte única de carbono, os resultados evidenciaram a rápida capacidade de adaptação e metabolização deste monossacarídeo das culturas celulares de canela sassafrás. Estes resultados são similares aqueles obtidos por Schripsema (1991) em cultivos de células de *Tabernaemontana divaricata*, onde foi observado por espectrometria de ¹H-RMN a metabolização preferencialmente de **Glc**, comparativamente aos demais carboidratos, com reflexos sobre a produção de alcalóides indólicos terpenoídicos de interesse farmacológico. Mais recentemente, estudos do metabolismo de carbono em sistema de cultivo em dois estágios de células de *Mandevilla velutina* por ¹H-RMN revelaram a rápida capacidade de metabolização de **Lac** (3g% - meio de produção) de somaclones, quando subcultivados a partir do meio de crescimento suplementado com **Suc** - 3g% (Araujo *et al.*, 2001). Esta estratégia de cultivo tem propiciado o aumento dos níveis de produção do triterpeno pregnânico velutinol *A* nos cultivos celulares daquela espécie, conforme observado previamente (Maraschin, 1998; Araujo, 2001). Em abordagem semelhante, a análise cinética da fermentação etanólica foi realizada por espectrometria de ¹H-RMN, em cultivos bacterianos e de leveduras, demonstrando a viabilidade de utilização desta técnica espectrométrica em estudos do metabolismo primário e secundário (Kim *et al.*, 1999).

A análise dos espectros de ¹H-RMN dos extratos aquosos celulares mostrou a não ocorrência de sinais característicos de **Lac**, sugerindo a existência de metabolização extracelular deste dissacarídeo, provavelmente por via enzimática (β -galactosidase). Resultados semelhantes foram obtidos com culturas de células de *Mandevilla velutina*, em um sistema de cultivo em dois estágios, suplementando-se os meios de crescimento e produção com **Suc** (3g%) e **Lac** (3g%), respectivamente (Araujo *et al.*, 2001). Adicionalmente, é inferida a existência de via(s) de absorção dos produtos de hidrólise enzimática da **Lac**, fato evidenciado pela detecção de sinais característicos de **Glc** (α -**D-Glc** e β -**D-Glc**) e de **D-Gal**, em relação aos seus padrões. Aumentos do conteúdo

intracelular de **D-Gal** foram observados na fase inicial de crescimento (5^o dia de cultivo) e, de forma similar ao observado para os cultivos em meio suplementado com **Glc**, este resultado evidencia uma rápida adaptação do metabolismo celular à suplementação do meio de cultura com **Lac**. Este fato é de interesse, em função da absorção não preferencial deste dissacarídeo pelas células vegetais, sendo, portanto, pouco utilizado em cultivos *in vitro*. Os espectros de ¹H-RMN revelaram que a máxima concentração endógena de **α-Glc**, **β-Glc** e **D-Gal** foi alcançada aos 15 dias após o subcultivo (Fig. 3), coincidindo com a fase exponencial de crescimento celular (Oltamari *et al.*, 2000; Oltamari *et al.*, 2001). Além disto, os valores de concentrações de **α-D-Glc** e **β-D-Glc** apresentaram pequena variação ao longo do período de cultivo, situando-se um pouco acima dos valores basais (t_{zero}) observados. Estes dados sugerem que a concentração de **Lac** (3g%) no meio de cultura foi suficiente para suprir as necessidades metabólicas dos cultivos celulares ao longo do período experimental.

A existência de um perfil cinético semelhante à metabolização de **α-D-Glc** e **β-D-Glc** foi observado nas culturas de células de *O. odorifera*. Células mantidas em presença de **Glc** (3%) como fonte única de carbono apresentaram concentrações intracelulares de **α-** e **β-D-Glc** superiores ao longo do período de cultura, comparativamente aos demais tratamentos (Figs. 4 e 5). Entretanto, ao término do experimento (30 dias de cultivo), as concentrações intracelulares de **α-** e **β-D-Glc** nos cultivos mantidos em meios suplementados com **Glc** (3g%) ou **Suc** (3g%) foram equivalentes. Os resultados evidenciaram um perfil de metabolização de **Glc** semelhante ao obtido em suspensões celulares de *Tabernaemontana divaricata* (Schripsema, 1991). Tal aspecto é de interesse, visto que taxas metabólicas distintas são usualmente observadas em culturas de células em meio semi-sólido e em suspensões celulares (Maraschin, 1998). Por outro lado, tomados em conjunto, os dados corroboram a existência de um equilíbrio intracelular de anômeros de **D-Glc**, independentemente da fonte de carbono utilizada nos cultivos *in vitro* de canela sassafrás.

A análise subsequente dos espectros de ¹H-RMN dos extratos aquosos dos cultivos celulares suplementados com **Glc** e **Lac**, através de uma matriz de correlação dos sinais de deslocamentos químicos (*software Statistica 4.2A* – Figs. 6 – 8), revelou a ocorrência de pequenas variações qualitativas de produtos do metabolismo celular ao longo do período

experimental ($r_{\text{Glc}} \cong 0,99$ e $r_{\text{Lac}} \cong 0,98$ - $p < 0,05$). A similaridade dos perfis espectroscópicos de ^1H -RMN observada para estes tratamentos evidencia a capacidade adaptativa celular à metabolização destes carboidratos e às condições osmóticas do meio de cultura, no caso específico da suplementação com **Glc**. No caso específico do tratamento com **Lac**, foram detectados sinais típicos na região de compostos fenólicos ($\delta = 3,9 - 4,0$) para as amostras coletadas no momento da inoculação (t_{zero}), fato não observado nas amostragens subsequentes. Este aspecto decorre, provavelmente, do efeito de estresse celular causado pela escassez de nutrientes no meio de cultura utilizado na geração anterior. Após este período, os dados indicaram que a composição do meio intracelular não sofreu alterações significativas para o tratamento em estudo. Por sua vez, a matriz de correlação dos espectros de ^1H -RMN dos cultivos celulares suplementados com **Suc** revelou a existência de variações mais expressivas de composição do meio intracelular ($r_{\text{Suc}} \cong 0,86$), notadamente para o período inicial de crescimento celular ($t_0 \rightarrow t_5$), em relação ao perfil cinético de metabolismo observado para os tratamentos com **Glc** e **Lac**. Estes dados indicam a ocorrência de perturbações mais acentuadas no metabolismo celular quando da utilização deste dissacarídeo. Todavia, após o quinto dia de cultivo, os valores de deslocamentos químicos dos espectros de ^1H -RMN apresentaram um coeficiente de correlação significativo ($r \cong 0,99$ - $p < 0,05$), sugerindo que o perfil de composição intracelular apresentou uma tendência de estabilização. A detecção de perfis de composição intracelular distintos em momentos imediatamente subsequentes ao subcultivo provavelmente está relacionada à adaptação do metabolismo celular às maiores concentrações de nutrientes do meio de cultura. Tal assertiva considera os efeitos da exaustão gradativa do meio de cultura sobre a composição intracelular ao longo do período de cultivo.

A utilização de matrizes de correlação de sinais de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C tem permitido a análise comparativa da composição de matrizes biológicas complexas, tais como extratos celulares de linhagens transformadas geneticamente de tomateiros (Noteborn *et al.*, 2001) e de produtos biotecnológicos, i.e. vinhos e sucos de uva (Passos *et al.*, 2000; Maraschin *et al.*, 2001). Além disto, esta abordagem experimental possibilita o estabelecimento de padrões de comportamento metabólico intra e extracelulares, os quais

são de interesse, por exemplo, no estudos do efeito de agentes estressantes do metabolismo secundário vegetal (elicitores).

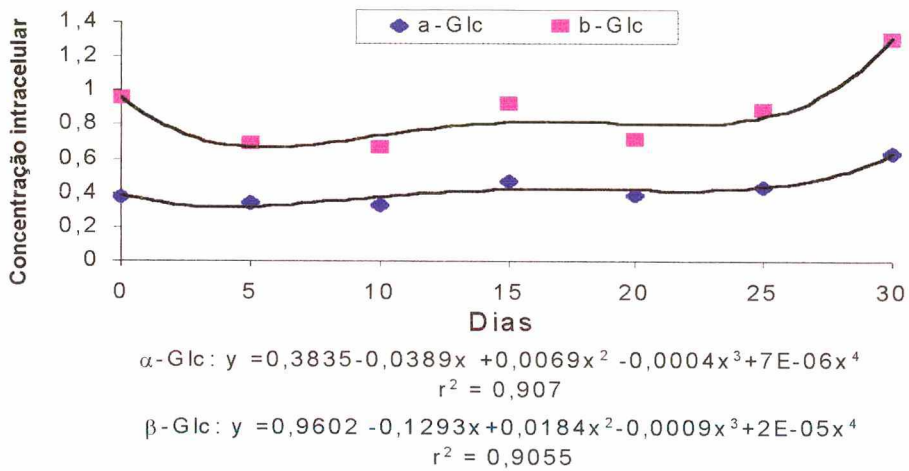


Figura 1. Concentração relativa intracelular de **D-Glc** em culturas de células de canela sassafrás, em meio de cultura WPM, suplementado com Picloram (10 μM) e Cin (1 μM), contendo **Suc** (3%) como fonte única de carbono. Os valores de concentração intracelular relativa de $\alpha\text{-D-Glc}$ ($\delta = 5,24 \text{ H-1}$) e $\beta\text{-D-Glc}$ ($\delta = 4,62 \text{ H-1}$) foram calculados em relação à altura do sinal do padrão interno – TSP, $\delta = 0,00 - \text{H1}$.

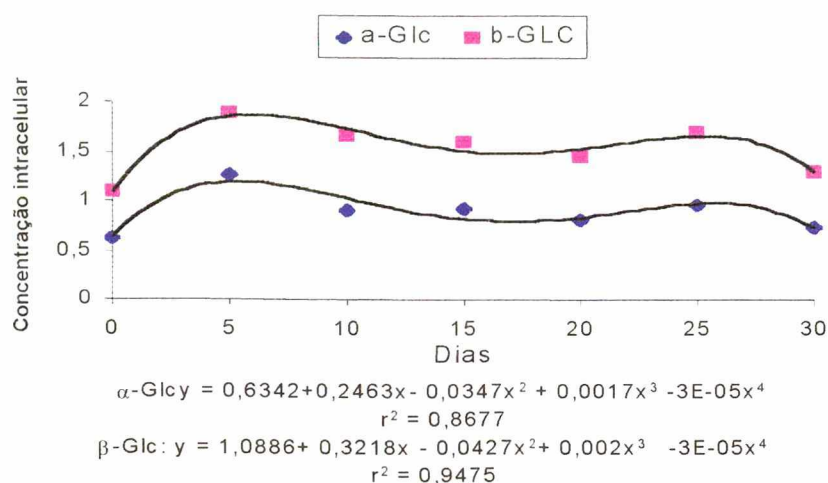


Figura 2. Concentração relativa intracelular de **Glc** em culturas de células de canela sassafrás, em meio de cultura WPM, suplementado com Picloram (10 μM) e Cin (1 μM), contendo **Glc** (3%) como fonte única de carbono. Os valores de concentração relativa de $\alpha\text{-D-Glc}$ ($\delta = 5,24$ H-1) e $\beta\text{-D-Glc}$ ($\delta = 4,62$ H-1) foram calculados em relação à altura do sinal do padrão interno – TSP, $\delta = 0,00$ – H1.

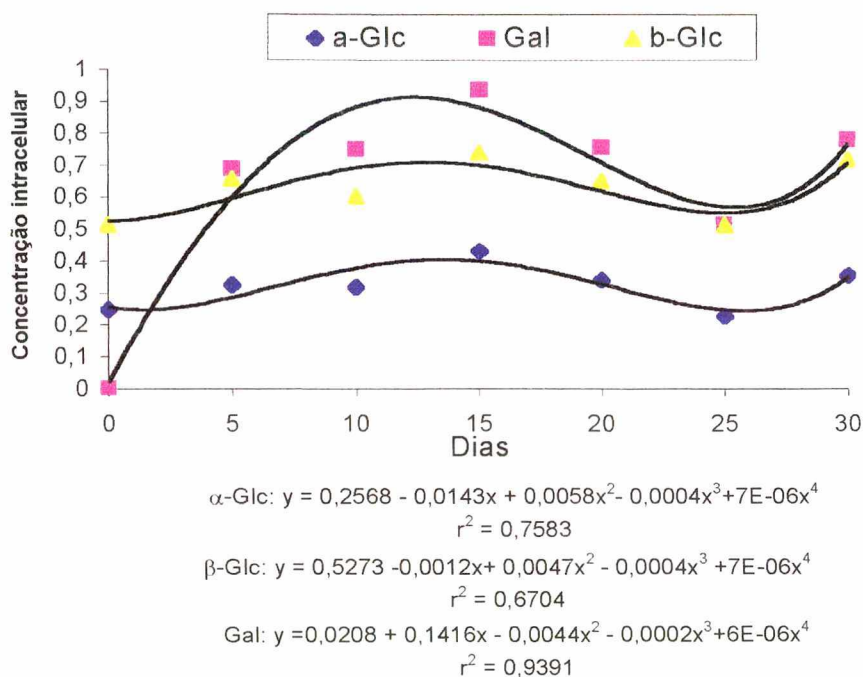


Figura 3. Concentração intracelular relativa de **Glc** e **Gal** em culturas de células de canela sassafrás, em meio de cultura WPM, suplementado com Picloram (10 μM) e Cin (1 μM), contendo **Lac** (3%). Os valores de concentração relativa de $\alpha\text{-Glc}$ ($\delta = 5,24$ H-1), $\beta\text{-Glc}$ ($\delta = 4,62$ H-1) e **D-Gal** ($\delta = 4,44$ H-1) foram calculados em relação à altura do sinal do padrão interno – TSP, $\delta = 0,00$ – H1.

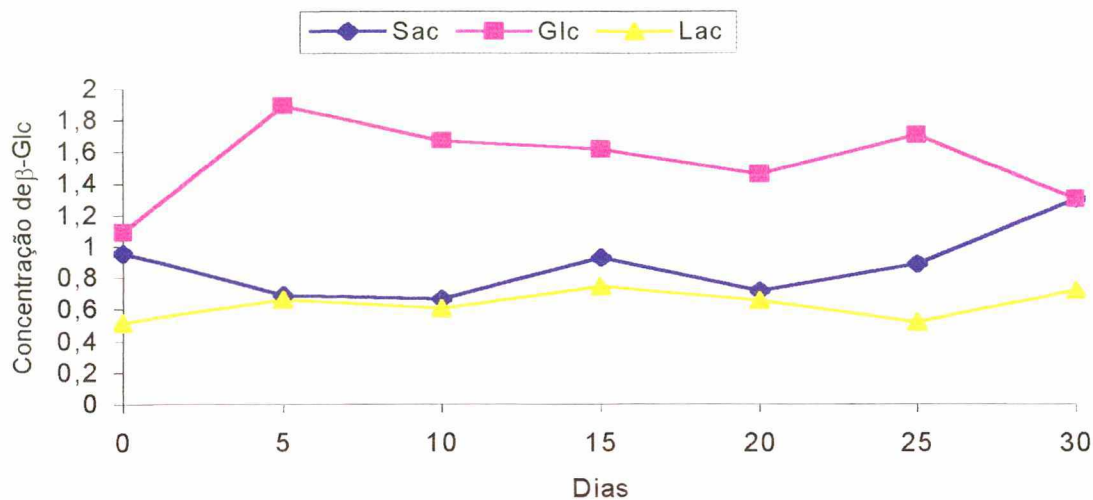


Figura 4. Variação da concentração relativa intracelular de α -Glc em culturas de células de canela sassafrás, em meio de cultura acrescido de **Suc** (3%), **Glc** (3%) e **Lac** (3%), como fonte única de carbono, durante 30 dias de cultura. O valor da concentração relativa de α -D-Glc ($\delta = 5,24$ H-1) foi calculado em relação à altura do sinal do padrão interno – TSP, $\delta = 0,00$ – H1.

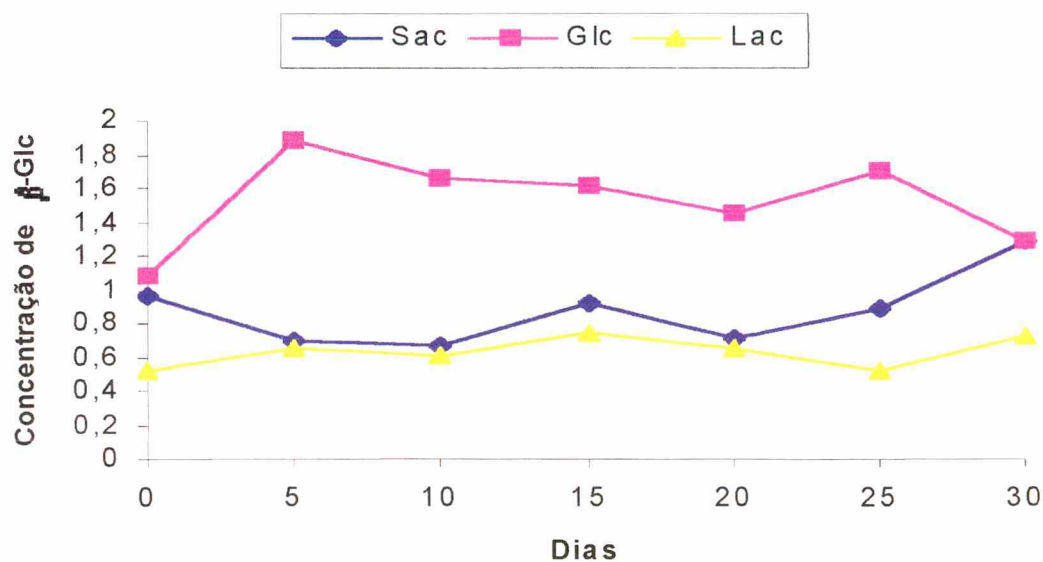
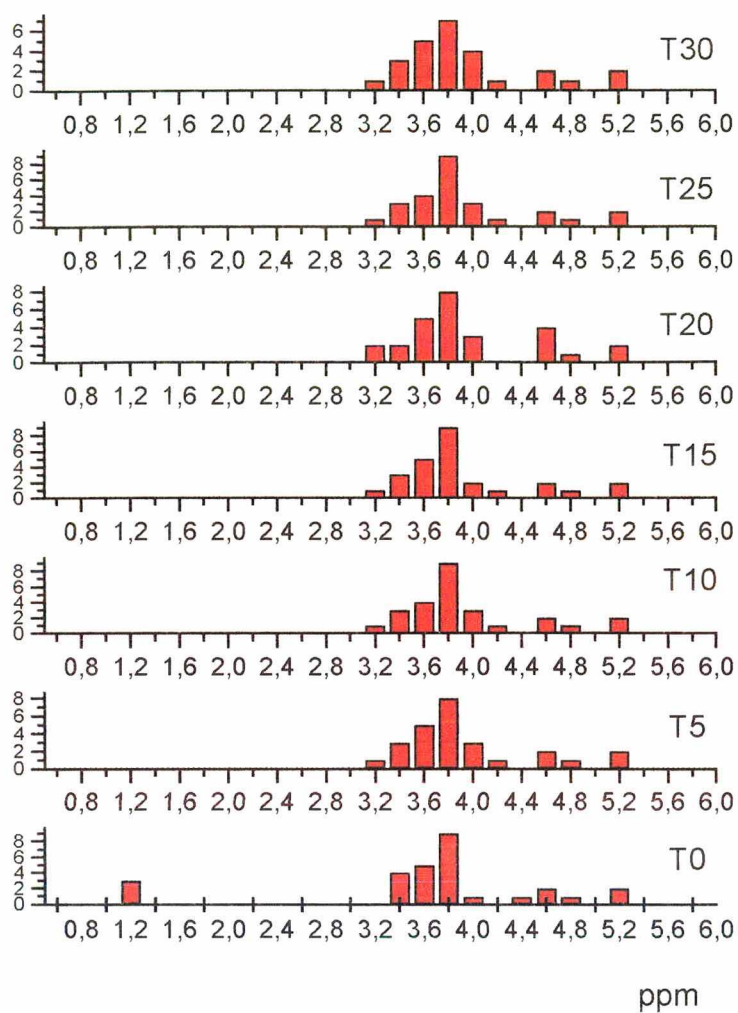


Figura 5. Variação da concentração relativa intracelular de β -Glc em culturas de células de canela sassafrás, em meio de cultura acrescido de **Suc** (3%), **Glc** (3%) e **Lac** (3%), como fonte única de carbono, durante 30 dias de cultura. O valor da concentração relativa de β -D-Glc ($\delta = 4,62$ H-1) foi calculado em relação à altura do sinal do padrão interno – TSP, $\delta = 0,00$ – H1.



*Ex.: T0 = 0 dias de cultura

Figura 6. Histograma demonstrando as similaridades e diferenças químicas obtidas através da análise de correlação de sinais químicos de compostos obtidos por ^1H -RMN, em diferentes tempos de amostragem de células de canela sassafrás, cultivadas em meio de cultura acrescido de **Suc** (3%), no decorrer de 30 dias.

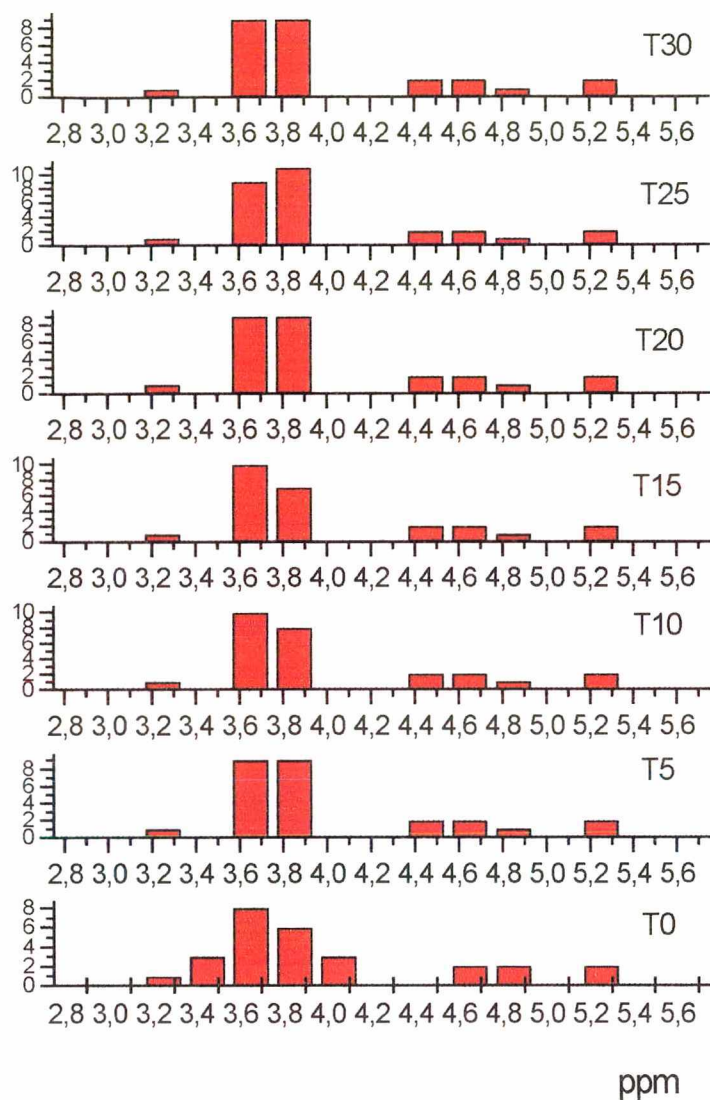


Figura 7. Histograma demonstrando as similaridades e diferenças químicas obtidas através da correlação de análises realizadas por ^1H -RMN, em diferentes tempos de amostragem de células de canela sassafrás, cultivadas em meio de cultura acrescido de Lac (3%), no decorrer de 30 dias.

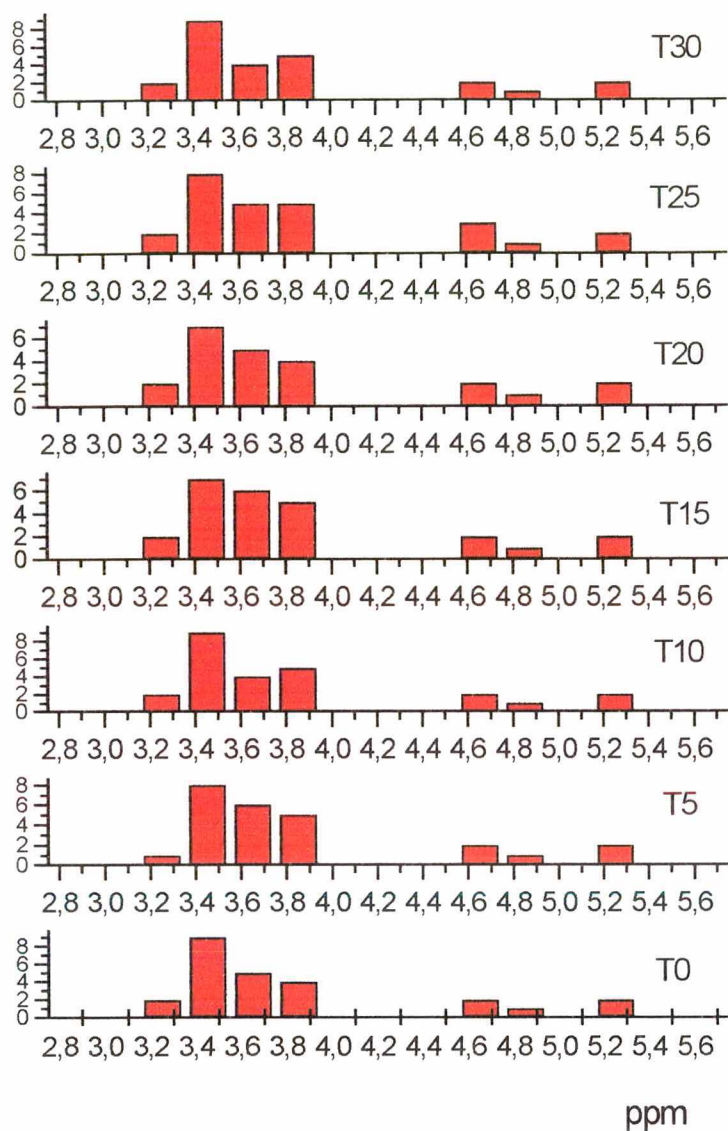


Figura 8. Histograma demonstrando as similaridades e diferenças químicas obtidas através da correlação de análises realizadas por ^1H -RMN, em diferentes tempos de amostragem de células de canela sassafrás, cultivadas em meio de cultura acrescido de **Glc** (3%), no decorrer de 30 dias.

CAPÍTULO V

ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DO METABOLISMO DE CARBONO EM CULTIVOS CELULARES DE CANELA SASSAFRÁS (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer - *Lauraceae*)¹

Ana Carla Oltramari², Ana Maria Viana³, Ênio L. Pedrotti², Marcelo Maraschin²

²Lab. Morfogênese e Bioquímica Vegetal - Centro de Ciências Agrárias/UFSC; ³Centro de Ciências Biológicas/UFSC.

RESUMO – Culturas celulares em meio semi-sólido de *Ocotea odorifera*, oriundas de tecido foliar, foram inoculadas em meio de cultura *CS₁* suplementado com sacarose, glucose, frutose, amido ou lactose (3 g%). A identificação de linhagens com capacidade de metabolização dos carboidratos foi realizada através da avaliação visual diária dos cultivos e da análise do crescimento celular, determinando-se as curvas de dissimilação de carbono dos somaclones. A seleção de linhagens celulares de canela sassafrás demonstrou a existência de somaclones com potenciais de metabolização para os carboidratos em estudo. As curvas de dissimilação de carbono das linhagens celulares apresentaram um padrão linear e ausência de fase estacionária, independente da fonte de carbono utilizada na suplementação do meio de cultura. Os maiores valores de perda de peso por dissimilação foram obtidos para os cultivos em meios suplementados com glucose, amido e lactose, sendo superiores ao controle (sacarose) em 1,6, 1,9 e 1,3 ordem de magnitude, respectivamente. A dissimilação de frutose foi inferior ao controle, porém a diferença observada não se mostrou estatisticamente significativa.

Palavras-chave: *Ocotea odorifera*, safrol, cultura de células, canela sassafrás, dissimilação de carbono.

¹ Capítulo a ser submetido à Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal

1. INTRODUÇÃO

A canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) é uma espécie lenhosa pertencente à família *Lauraceae*, de hábito arbóreo perene, atingindo 20 a 25 m de altura. A exploração de biomassa de canela sassafrás visando a obtenção de óleo essencial ocorreu segundo um modelo extrativista, ao longo de aproximadamente 40 anos (1940 - 1980), levando a espécie ao risco de extinção. Na industrial, a biomassa de raízes, cascas e folhas foi amplamente utilizada para a extração de óleo essencial, o qual apresenta altos teores de safrol, um composto alil-benzênico de grande importância econômica para as indústrias química e farmacêutica. A partir do safrol, dois derivados são obtidos: a heliotropina, que é um fixador de aroma, e o butóxido de piperonila, elemento utilizado na produção de inseticidas biodegradáveis (Embrapa, 1998).

Ao longo das últimas décadas, uma série de estudos têm demonstrado a possibilidade de obtenção de metabólitos secundários vegetais com aplicações nas indústrias farmacêutica, química, de cosméticos e alimentar, através do cultivo de células e tecidos (Verpoorte e Maraschin, 2001). Esta abordagem mostra-se atrativa quando, por exemplo, a produção do composto por síntese ou semi-síntese química não é viável, ou é tecnicamente problemática, ou ainda quando da necessidade de um longo período de cultivo da espécie de interesse, tal como observado para *Taxus brevifolia*. Esta espécie tem sido utilizada como fonte de biomassa para extração de Taxol® (Bristol-Myers Squibb), um potente anti-tumoral de uso clínico corrente. No entanto, para a obtenção de 1 Kg de Taxol®, aproximadamente 1000 Kg de cascas de *T. brevifolia*, com 100 anos de idade ou mais, são requeridos (Kieran *et al.*, 1997). Assim, e de forma similar à canela sassafrás, a obtenção de biomassa em quantidades adequadas ao processamento em escala industrial é fator limitante do processo produtivo devido ao longo período de cultivo necessário. Nesses casos, a produção dos compostos de interesse por via biotecnológica poderá ser a alternativa de escolha, desde que os cultivos celulares apresentem produtividade adequada (Verpoorte *et al.*, 1997).

O cultivo de células vegetais como sistema produtor de metabólitos secundários tem mostrado sua viabilidade do ponto de vista tecnológico e, em alguns casos, também do ponto de vista econômico em escala comercial, como no caso da produção de chiconina, berberina e ginsenosídeos, a partir do cultivo de células de *Lithospermum erythrorhizon*, *Coptis japonica* e *Panax ginseng*, respectivamente (Fujita, 1988). No entanto, a produção biotecnológica de compostos bioativos somente poderá competir com os processos agrícolas convencionais se os cultivos celulares apresentarem maior produtividade e a qualidade do produto final for superior. A análise da produtividade dos cultivos celulares encontra-se relacionada, entre outros fatores, à taxa de produção de biomassa e de biossíntese do(s) metabólito(s) de interesse na unidade de tempo (Schlatmann, 1995). Assim, a análise do incremento de biomassa celular ao longo do período de cultivo constitui-se em aspecto básico na avaliação da produtividade dos sistemas *in vitro*. De modo geral, os estudos neste contexto consideram a determinação das curvas de crescimento dos cultivos celulares vegetais por diferentes métodos, os quais podem ser de natureza destrutiva ou que preservam o material amostral. Como exemplos do primeiro caso, o padrão de crescimento celular *in vitro* pode ser obtido considerando-se as variáveis peso fresco e/ou peso seco de células, volume de células sedimentadas e densidade celular (n° células/ml de meio de cultura). No entanto, a não possibilidade de análises subsequentes do mesmo material amostral se constitui em aspecto negativo destes métodos, podendo contribuir para o aumento do erro experimental, notadamente em estudos de natureza bioquímica. A superação desta limitação poderá ser alcançada com a utilização de metodologias não destrutivas, tais como a determinação das curvas de dissimilação de carbono dos cultivos *in vitro*.

De outra forma, a biossíntese *in vitro* de compostos bioativos de interesse é afetada por fatores epigenéticos, como por exemplo a fonte de carbono utilizada no meio de cultura (Schlatmann, 1995; Maraschin, 1998). Tal aspecto decorre do fato de que as células cultivadas *in vitro* são usualmente heterotróficas quanto à capacidade de síntese de uma série de compostos via fotossíntese, em níveis adequados à manutenção dos processos de desenvolvimento. Por esta razão, se faz necessária a adição de carboidratos ao meio de cultura como fonte de carbono e energia (Maraschin e Verpoorte, 1999). As culturas celulares, estáticas ou em suspensão, têm sido mantidas usualmente em meio contendo

sacarose ou glucose, em concentrações que variam entre 2 a 5 g%. Contudo, diversas fontes de carbono têm sido testadas quanto à sua habilidade em manter o crescimento de culturas celulares vegetais e em estudos de otimização da síntese de metabólitos secundários *in vitro* (Schripsema, 1991; Schlatmann, 1995; Maraschin, 1998; Araujo, 2001). Esta última abordagem está associada ao fato de que alguns carboidratos utilizados podem atuar como agentes estressantes do crescimento celular, levando à incrementos da biossíntese e/ou acúmulo de compostos bioativos de interesse (Verpoorte, 1990; Maraschin, 1998). De modo geral, é possível observar na literatura uma grande amplitude de respostas de crescimento e produção de metabólitos secundários segundo a fonte, a estrutura, as propriedades, o peso molecular, a concentração e a eficiência do aparato enzimático para a metabolização e/ou absorção do carboidrato (Fowler e Stepan-Sarkissian, 1985; Schripsema *et al.*, 1991; Maraschin, 1988, Kim *et al.*, 1995).

Estudos de engenharia do metabolismo vegetal demonstram a existência, em diversos casos, de uma relação oposta entre crescimento celular e síntese de metabólitos secundários (Zenk *et al.*, 1977; Mantell e Smith, 1983; Oksman-Caldentey *et al.*, 1994), sugerindo a importância da análise destas variáveis de forma concomitante. Em conexão com estudos de biossíntese de safrol *in vitro*, o presente trabalho tem como objetivo selecionar linhagens celulares de *O. odorifera* com capacidade de metabolização de glucose, frutose, amido e lactose e caracterizar a cinética de incremento de biomassa celular nestes cultivos, através da determinação das curvas de dissimilação de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Cultivos celulares e fontes de carbono

Culturas celulares, oriundas de tecido foliar de *O. odorifera*, foram estabelecidas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de picloram (10 μ M), cinetina (1 μ M), vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), sacarose (3 g% - p/v) e ágar (0,6 g% - p/v), conforme previamente descrito (Oltramari, 1998 - *Meio de cultura CS₁*). A partir

destes cultivos, amostras de células (2,0 g – peso fresco) foram coletadas 30 dias após a repicagem e inoculadas em placas de Petri (\varnothing médio dos agregados celulares = 5 mm) contendo 20 mL de meio de cultura CS_I , suplementado com distintas fontes de carbono (3 g% - p/v), a saber: **Suc, Glc, Fru, Amd e Lac**. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, previamente à autoclavagem, e os cultivos foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 85% de umidade relativa, durante 30 dias. A identificação de linhagens com capacidade de metabolização dos carboidratos em estudo foi realizada através de avaliação visual diária dos cultivos, seguida da análise do crescimento celular.

Análise do crescimento celular

O crescimento das linhagens celulares foi avaliado através da determinação das curvas de dissimilação de carbono, conforme descrito previamente (Schripsema, 1991). Para cada tratamento (fonte de carbono) foram utilizadas 5 placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura CS_I e 2 g de biomassa celular/placa. Como controle, foram usadas 2 placas de Petri idênticas, contendo apenas o meio de cultura (20 mL - CS_I). Imediatamente após a inoculação, as placas foram fechadas com as tampas de vidro, vedadas com Parafilme® e pesadas em intervalos de 24 horas, em balança KERN 430-21 (amplitude: 50g – precisão: 1 mg). Para obtenção das curvas de dissimilação de carbono, os dados de perda de peso diária dos cultivos foram analisados com o auxílio do programa *Wegen*, desenvolvido na divisão de Farmacognosia da Universidade de Leiden (Leiden, Holanda). Ao final do período experimental, os dados de peso fresco (g) dos cultivos celulares foram coletados em balança KERN 430-21 (amplitude: 50g – precisão: 1 mg) e correlacionados aos valores de dissimilação total, utilizando-se o programa *Statistica* 4.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção de linhagens celulares de canela sassafrás demonstrou a existência de somaclones com potenciais de metabolização dos carboidratos em estudo, em níveis distintos segundo a fonte de carbono utilizada no meio de cultura. O monitoramento das

culturas celulares através de análise visual não indicou a existência de fenômenos de oxidação e/ou necrose, ao longo de 30 dias de cultivo. A capacidade de proliferação celular destas linhagens tem se mostrado estável ao longo de um período de 18 meses, com um número de 20 subcultivos.

A incapacidade de um açúcar suportar o crescimento das células geralmente está relacionada à ausência de um aparato enzimático necessário à sua metabolização, ou à sua absorção (Limberg *et al.*, 1979, Fowler e Stepan-Sarkissian, 1985). A seleção clonal, a partir de variantes hábeis em metabolizar outras fontes de carbono que não a sacarose, tem sido uma estratégia utilizada com sucesso em cultivos *in vitro* de *Saccharum* sp. para galactose (Maretzki e Thom, 1978) e *Glycine max* cv. Mandarin para maltose (Limberg *et al.*, 1979). No primeiro caso, a habilidade em metabolizar galactose está associada à expressão de UDP-galactose-4-epimerase nas populações adaptadas, enquanto as linhagens selecionadas de soja apresentaram uma taxa maior de absorção de maltose em relação ao controle (sacarose).

Análises do crescimento *in vitro* de células vegetais através de curvas de dissimilação permitem avaliar a relação entre consumo de açúcares (fontes de carbono) e o crescimento celular, já que somente uma parte do açúcar disponibilizado às células é convertido em biomassa, sendo o restante dissimilado para suprir os requerimentos energéticos celulares. Os açúcares são dissimilados pela célula no processo respiratório, havendo o consumo de O₂ e produção de CO₂ e H₂O. Neste processo, uma quantidade equimolar de O₂ é trocada por CO₂, resultando em uma perda de peso do frasco de cultura (Schripsema, 1991). Esta perda de peso dos cultivos celulares pode ser medida e, por correção da perda de água devido à evaporação, pode-se elaborar as curvas de dissimilação. Este método caracteriza-se por ser não destrutivo, podendo ser aplicado para a avaliação do crescimento de culturas celulares utilizando-se um único frasco como material amostral (Schripsema, 1991; Maraschin, 1998, Maraschin e Verpoorte, 1999).

As curvas de dissimilação de carbono das linhagens celulares apresentaram um padrão de crescimento linear (Figura 1a-e), conforme demonstrado pela análise de regressão ($r^2 = 0,99$), independente do carboidrato utilizado na suplementação do meio de cultura. Além disto, ao longo do período experimental, as linhagens celulares não alcançaram a fase estacionária de crescimento. Normalmente, a cinética de dissimilação de carbono nos

cultivos celulares vegetais é caracterizada por um padrão sigmoidal, com uma clara definição dos momentos de ocorrência das fases inicial, exponencial e estacionária de crescimento, conforme observado em suspensões celulares de *Tabernaemontana divaricata*, *Catharanthus roseus* e *Mandevilla velutina*, em meios de cultura suplementados com distintas fontes de carbono (Schripsema, 1991; Maraschin, 1998). Linhagens de células de *M. velutina* em meio semi-sólido (ágar 0,7 g%) apresentaram um comportamento sigmoidal ($r^2 = 0,99$) de dissimilação de sacarose, porém com duração das fases inicial (6 dias) e exponencial (24 dias) superior em relação às suspensões celulares, indicando que a constituição física do meio de cultura, i.e. líquido ou semi-sólido, parece ser um fator determinante da cinética de metabolização de carbono (Maraschin, 1998; Araujo, 2001). Além disto, os resultados evidenciaram um consumo energético por unidade de tempo nitidamente inferior aquele encontrado em culturas em suspensão (Maraschin, 1998). O menor índice de crescimento relativo dos cultivos em meio semi-sólido em relação às suspensões celulares caracteriza este sistema como sendo eficiente na manutenção de germoplasmas *in vitro* (Withers, 1983), mas de menor interesse quando se objetiva a produção de metabólitos secundários. Tal afirmação encontra respaldo no fato de que, como regra geral, o acúmulo de metabólitos se dá mais intensamente ao término da fase exponencial e/ou início da fase estacionária (Verpoorte, 1990). De fato, menores valores de transferência de massa em sistemas de cultivos celulares estáticos são esperados em relação às suspensões celulares, devido, por exemplo, ao efeito da viscosidade dos agentes geleificantes (ágar ou Phytigel®, e.g) sobre aquela variável. Em função disto, a metabolização de carbono pelas culturas celulares de *O. odorifera* em meio semi-sólido é menor, conforme observado através da análise do conteúdo intracelular e extracelular de sacarose, frutose e glucose por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) (Oltamari *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que a menor taxa de metabolização de carbono nos cultivos celulares estáticos de canela sassafrás pode explicar, de certa forma, a não ocorrência da fase estacionária, uma vez que o meio de cultura provavelmente não se encontra exaurido da fonte de carbono, após 30 dias da inoculação. De forma contrária, uma rápida metabolização de glucose foi observada em cultivos celulares de *M. velutina* em meio líquido (biorreatores e frascos), com total depleção ao 15^o dia após a inoculação (Araujo *et al.*, 2001). A seleção de linhagens com menores taxas de crescimento, devido ao

maior custo energético para absorção de carboidratos do meio de cultura, pode ser interessante quando se objetiva a síntese de compostos, visto que muitos metabólitos secundários são produzidos sob situações de estresse da planta e/ou dos cultivos *in vitro* (Maraschin, 1998).

Os valores de perda de peso total por dissimilação das linhagens celulares (Figura 2) indicam a existência de comportamentos distintos de metabolização das fontes de carbono. Para efeitos de análise comparativa, os cultivos celulares em meio de cultura suplementado com sacarose foram utilizados como controle (*testemunha relativa*). A sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada nas culturas de células e tecidos vegetais, provavelmente devido à sua maior capacidade de sustentação do crescimento celular em relação aos demais carboidratos. Uma abordagem concernente às suas propriedades estruturais especula o fato de que sua utilização preferencial no metabolismo se deve à sua característica não redutora, especialmente em análises comparativas tendo a maltose como referencial redutor (Fowler e Stepan-Sarkissian, 1985). Os resultados obtidos com este dissacarídeo devem ser analisados de forma crítica, uma vez que sua maior metabolização *in vitro* está relacionada aos seus produtos de hidrólise (α -D-Glc e β -D-Fru), quando da autoclavagem dos meios de cultura (Stepan-Sarkissian e Fowler, 1986; Maraschin e Verpoorte - dados não publicados).

As linhagens celulares cultivadas em meios suplementados com **Glc**, **Amd** e **Lac** apresentaram valores de perda de peso por dissimilação significativamente ($p < 0,05$; *t*-student) superiores ao controle (**Suc**) em 1,6, 1,9 e 1,3 ordem de magnitude, respectivamente. De outra forma, uma menor perda de peso por dissimilação de **Fru** foi observada em linhagens selecionadas para aquela fonte de carbono, ainda que esta diferença em relação aos cultivos em **Suc** não tenha sido estatisticamente significativa.

Os dados de dissimilação de **Glc** dos cultivos celulares de canela sassafrás corroboram os resultados de estudos de metabolização deste monossacarídeo por $^1\text{H-RMN}$, os quais demonstraram a existência de um perfil diferenciado nas linhagens celulares em relação ao controle (**Suc**). A análise dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ das linhagens celulares revelou uma cinética de metabolização de **Glc** superior ao controle em duas ordens de magnitude e máxima concentração endógena aos 5 dias de cultivo (Oltramari *et al*, 2000). Adicionalmente, um perfil de metabolização de **Glc** semelhante ao de suspensões celulares

de *Tabernaemontana divaricata* foi observado (Schripsema, 1991). No entanto, linhagens celulares de *M. velutina* apresentaram uma taxa média de dissimilação de **Glc** de 30,9% em relação ao controle (**Suc** – 3 g%). De forma similar, Schripsema (1991) obteve 50,2% do crescimento celular em culturas de *Tabernaemontana divaricata* mantidas em meio com 6% de **Glc**, em relação aos cultivos suplementados com **Suc** (3 g%), enquanto reduções significativas no acúmulo de biomassa em culturas de raízes transformadas de *Hyoscyamus muticus* strain foram relatadas por Oksman-Caldentey *et al.* (1994), em meio líquido contendo glucose em concentrações de 0,5% a 6%. A glucose é, em geral, mais rapidamente metabolizada que outras fontes de carbono, podendo tornar-se um fator limitante de crescimento (Mantell e Smith, 1983 e Stepan-Sarkissian e Fowler, 1986). A análise conjunta destes dados reforça a necessidade de estudos específicos no que se refere à capacidade de metabolização de carboidratos dos cultivos celulares e dos efeitos das fontes de carbono sobre o crescimento celular e a síntese/acúmulo de metabólitos secundários de interesse.

Os maiores valores de perda de peso por dissimilação das linhagens de células cultivadas em meio de cultura suplementado com **Amd** podem estar relacionados ao alto custo energético destinado à metabolização deste polissacarídeo a nível extracelular. A hidrólise de **Amd** em culturas de células e tecidos vegetais tem sido investigada em diversos trabalhos e os resultados demonstram que as α -amilases são as principais enzimas responsáveis pela degradação deste polímero (Wink, 1994). Como exemplo disto, análises de zimogramas de culturas celulares de *Mandevilla velutina* demonstraram a capacidade de metabolização extracelular de **Amd** (3 g%), ainda que um menor acúmulo de biomassa tenha sido observado em relação ao meio utilizado como controle (**Suc** – 3 g%), sugerindo que a degradação enzimática de **Amd**, e/ou a absorção de seus produtos de hidrólise (glucose, maltose e oligos), possam ser fatores limitantes do crescimento celular, uma vez que o meio de cultura não foi totalmente exaurido da fonte de carbono ao término dos experimentos (Araujo, 2001). Os solutos podem adentrar ao citoplasma através dos processos de difusão ou transporte ativo. Assim, a internalização celular dos açúcares adicionados ao meio de cultura será dependente da concentração destes, considerando o balanço osmótico entre a célula e o meio de cultura, e da atividade de enzimas que atuam no processo de hidrólise (invertase, amilases, por exemplo) e transporte (permeases, por

exemplo) destes compostos (Moore, 1995; Kotyk, 1997). Tendo-se como referencial os dados de peso fresco dos cultivos de células de canela sassafrás (Figura 3), uma maior habilidade de metabolização deste polissacarídeo em relação às culturas celulares de *M. velutina* (Araujo, 2001) foi observada. Análises da ocorrência de **Amd** no meio de cultura indicaram que as linhagens celulares não consumiram toda a fonte de carbono, após 30 dias de cultivo (dados não mostrados), sugerindo que a concentração utilizada (3 g%) mostrou-se adequada para suprir os requerimentos do metabolismo celular. Além disto, as linhagens celulares mostraram-se hiperhídricas e a ocorrência de distúrbios celulares oriundos da diferença de osmolaridade do meio de cultura não foram observados em relação ao meio controle.

Os dados de dissimilação total dos cultivos suplementados com **Lac** sugerem uma rápida resposta adaptativa do metabolismo celular a este dissacarídeo, já que este tipo de açúcar não é preferencialmente absorvido por células vegetais - menor taxa de assimilação em relação à sacarose, sendo pouco utilizado em cultivos *in vitro*. De forma similar ao observado para as linhagens celulares controle (**Suc**), os somaclones de *O. odorifera* parecem metabolizar **Lac** a nível extracelular, conforme previamente observado em estudos destes cultivos por ¹H-RMN. Análises dos espectros de ¹H-RMN indicaram a existência de metabolização extracelular deste dissacarídeo, provavelmente por via enzimática (β -galactosidase), devido à ocorrência de sinais característicos de α -D-Glc e β -D-Glc, ($\delta_{\alpha\text{-D-glucose}}$: 5.24 – H1, $\delta_{\beta\text{-D-glucose}}$: 4.62 - H1) e de **D-Gal** ($\delta_{\text{D-galactose}}$: 4.44 – H3; δ_{TSP} : 0.00 - padrão interno) no meio de cultura (Oltramari *et al.*, 2001). De outra forma, sinais relativos à **Lac** não foram identificados nos espectros de ¹H-RMN dos extratos aquosos celulares, indicando a não existência de mecanismos ativos de absorção e transporte deste dissacarídeo, ao longo do período experimental. Análises subsequentes da cinética de metabolização e transporte dos produtos de hidrólise da **Lac** reforçaram a hipótese de ocorrência de metabolização extracelular (Oltramari *et al.*, 2001). Resultados similares de metabolização de **Lac** foram observados em linhagens celulares de *Mandevilla velutina*, porém, neste caso, as linhagens celulares apresentaram-se hiperhídricas, fato não observado nos cultivos de canela sassafrás (Araujo, 2001).

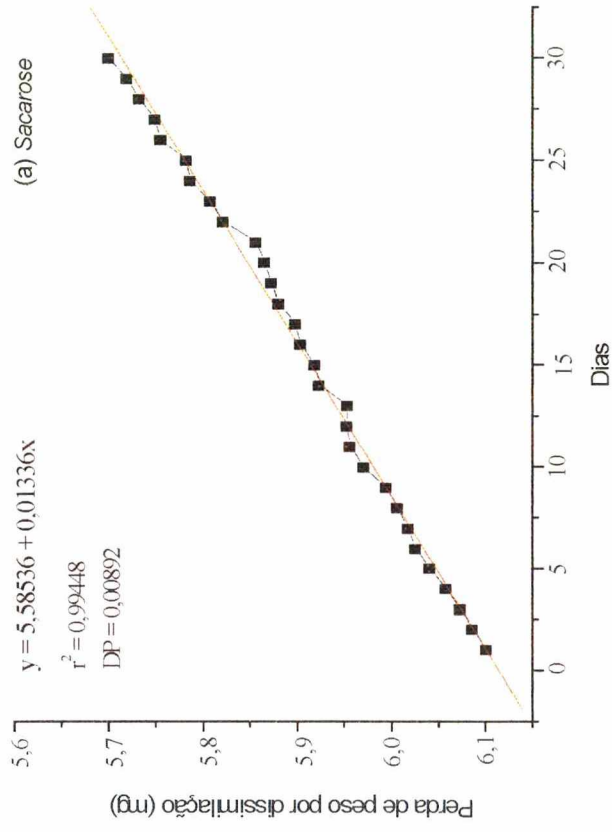
As linhagens celulares apresentaram uma capacidade de dissimilação de **Fru** semelhante àquela observada para a **Suc**, entretanto o acúmulo de biomassa com base no

peso fresco foi 23% superior ao controle (Figura 3). A frutose tem demonstrado capacidade de suportar o crescimento celular de diversas espécies tais como *Morinda citrifolia* (Zenk *et al.*, 1975), *Pinus taeda* (Vuke e Mott, 1987) e *Ajuga pyramidalis* (Madhavi *et al.*, 1996), contrariamente ao observado com *Catharanthus roseus* (Smith *et al.*, 1987) e *Cephalotaxus harringtonia* (Westgate *et al.*, 1991). A utilização deste monossacarídeo na concentração de 5 g% ou superior, teve efeitos negativos sobre o crescimento celular em culturas de *Panax ginseng*. A redução da concentração para 3 g% permitiu a obtenção de incrementos de biomassa celular semelhantes ao controle - **Suc** - 3 g% (Wu e Ho, 1999). Em outra abordagem, estudos de seleção de linhagens de *M. velutina* revelaram a existência de somaclones com taxas de dissimilação de **Fru** diferindo em 1,4 ordem de magnitude, evidenciando as diferenças de potencial de metabolização desta cetose entre as populações celulares (Araujo, 2001).

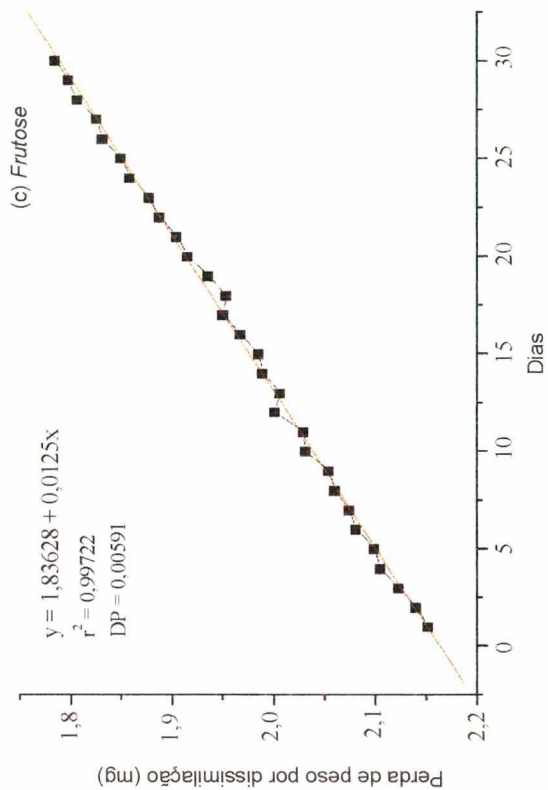
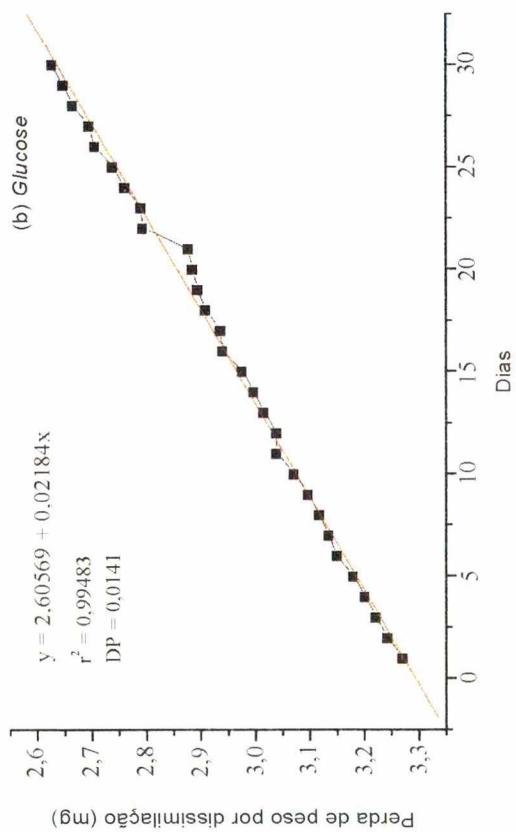
A análise de correlação para peso fresco e dissimilação de carbono das culturas celulares apresentou um coeficiente linear (r) médio de 0,69 ($p < 0,05$) (Figura 4). Assumindo-se como limite mínimo de significância um valor de $r \geq 0,75$, observa-se que a inter-relação das variáveis em estudo não é significativa. Por outro lado, culturas de células em suspensão de *Mandevilla velutina* apresentaram um coeficiente de correlação linear significativo ($r = 0,84$) para as variáveis em estudo (Maraschin, 1998). Estes dados sugerem que o método de correlação é uma abordagem de estudo que requer a análise específica de dados, sendo a interpretação e a aplicabilidade dos resultados restrita ao modelo experimental. Assim, a ocorrência de fatores de variação (espécies e sistema de cultivo, por exemplo) poderá ser uma fonte significativa de erro em análises comparativas de sistemas de cultivo celulares *in vitro*, comprometendo a fidedignidade dos resultados.

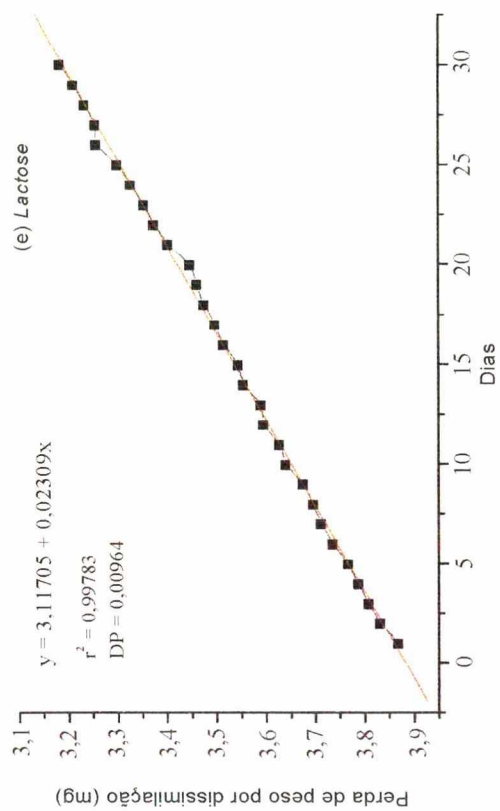
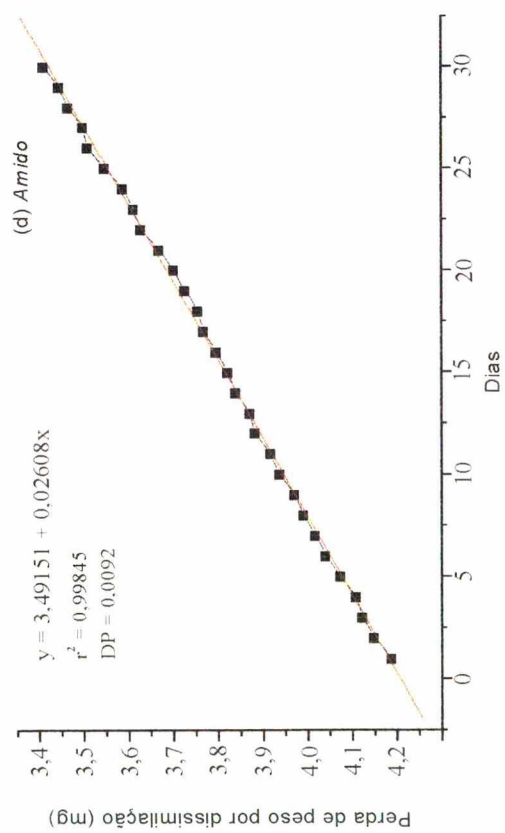
A existência de uma discrepância de 31% entre os métodos de avaliação do crescimento celular nos cultivos estáticos de canela sassafrás pode ser devido ao efeito da hidratação celular, a qual é muitas vezes fonte de significativa de variação e erro em análises que consideram o peso fresco como referência, o que faz necessário comparar os resultados com outras estratégias de avaliação. Por outro lado, a determinação das curvas de dissimilação pode apresentar como fonte de erro na avaliação do crescimento das culturas celulares o tipo de tampa do frasco da cultura. A não oclusão do frasco de cultivo permite a ocorrência de trocas gasosas, levando a alteração da composição química da

atmosfera interna e a variação da massa do sistema de cultivo. Este fato é fonte significativa de erro, comprometendo a viabilidade experimental do método, porém é facilmente detectado durante a análise dos dados de perda de peso por dissimilação da(s) fonte(s) de carbono.



Figuras 1a-e. Curvas de dissimilação de carbono de linhagens celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura **CS_I** (Oltamari, 1998), durante 30 dias de cultura, suplementado com **a)** sacarose, **b)** glucose, **c)** frutose, **d)** amido e **e)** lactose como fonte única de carbono (3g%).





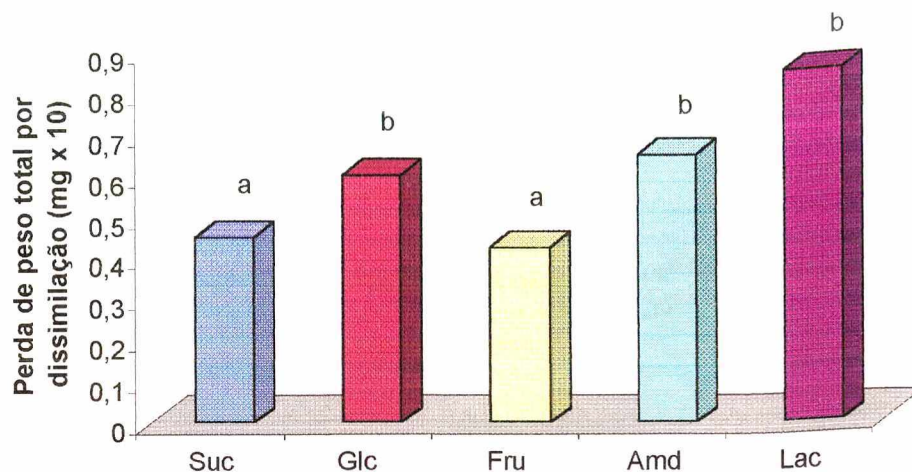


Figura 2 – Perda de peso total por dissimilação de células de *O. odorifera*, cultivadas em meio de cultura semi-sólido, acrescido de distintas fontes de carbono: sacarose (Suc), glucose (Glc), frutose (Fru), amido (Amd) ou lactose (Lac) (3 g%). Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$).

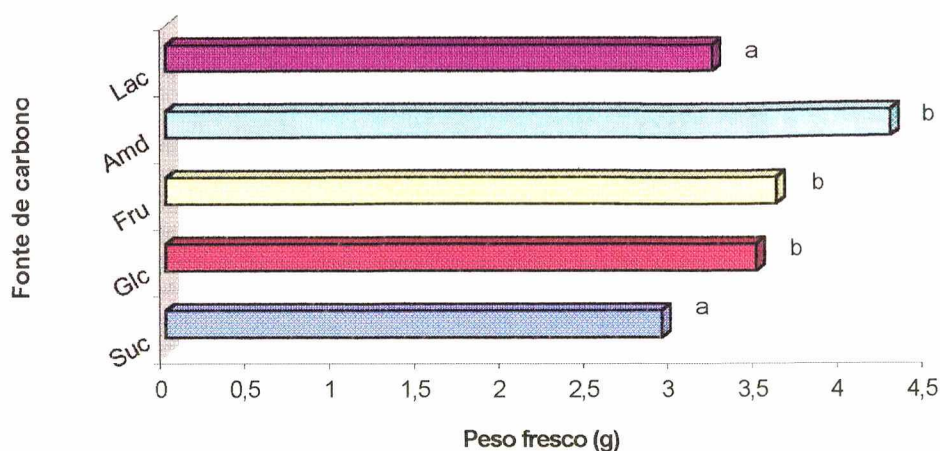


Figura 3 – Biomassa de células de *O. odorifera*, cultivadas em meio de cultura semi-sólido suplementado com sacarose (Suc), glucose (Glc), frutose (Fru), amido (Amd) ou lactose (Lac) (3 g%), após 30 dias em meio de cultura, tendo uma biomassa inicial de 2,0 g de células. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ($p < 0,05$).

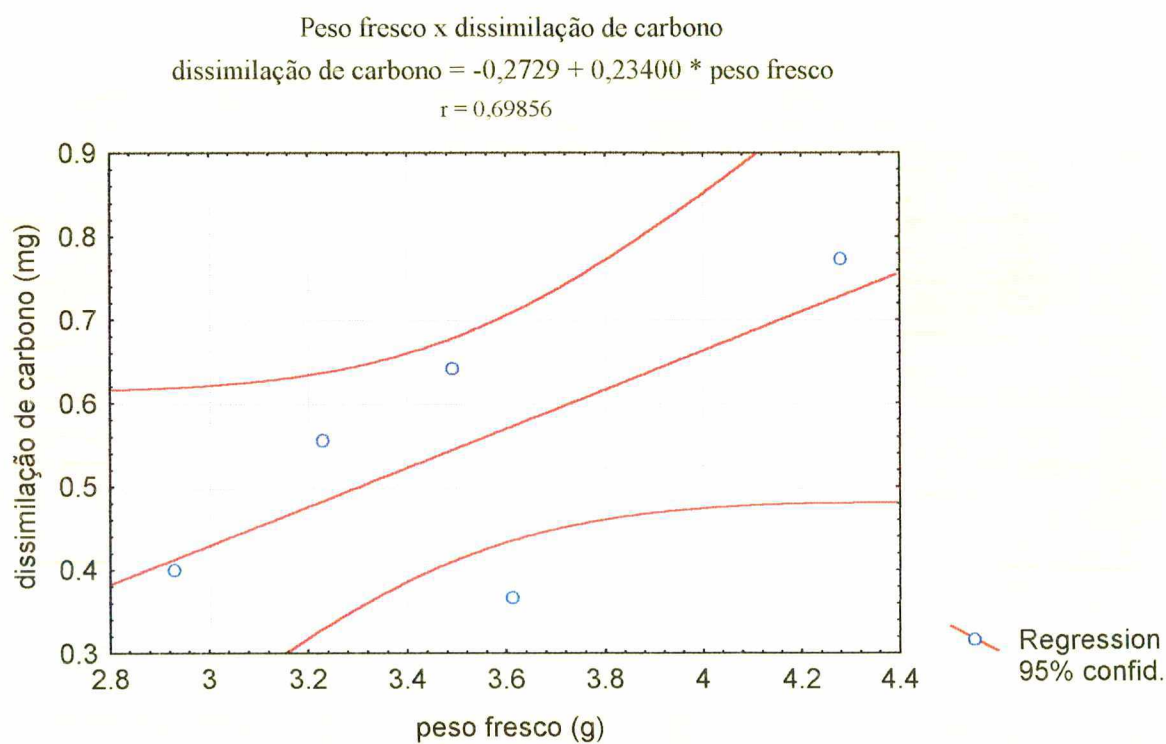


Figura 4 – Análise de correlação da perda de peso por dissimilação (mg) e peso fresco (g) de culturas de células de *O. odorifera*, em meio de cultura CS₁ suplementado com sacarose (3 g%) como fonte única de carbono.

CAPÍTULO VI

ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE CULTURAS CELULARES ESTÁTICAS DE *Ocotea odorifera* EM MEIO DE CULTURA SUPLEMENTADO COM ANA e 6-BAP¹

Ana Carla Oltramari², Ana Maria Viana³, Ênio L. Pedrotti², Marcelo Maraschin²

²Lab. Morfogênese e Bioquímica Vegetal - Centro de Ciências Agrárias/UFSC; ³Centro de Ciências Biológicas/UFSC.

RESUMO - Culturas celulares em meio semi-sólido de *Ocotea odorifera*, oriundas de tecido foliar, foram inoculadas em meio de cultura MS acrescido de ácido naftalenoacético (ANA - 0,0; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 μM) e 6-benzilaminopurina (BAP - 0,0; 0,5 e 1,0 μM). A taxa de crescimento das culturas foi avaliada pela determinação do peso fresco e seco e das curvas de dissimilação de carbono. O peso fresco dos cultivos celulares apresentou um perfil de incremento segundo um modelo sigmoidal, enquanto o peso seco seguiu um modelo quadrático para todos os tratamentos, exceto para culturas celulares mantidas em meio acrescido da combinação de 5 μM de ANA e 0,5 μM de BAP, onde observou-se um modelo sigmoidal. As curvas de dissimilação revelaram distintos perfis de incremento de biomassa (modelos sigmoidal, quadrático e linear), dependendo da composição do meio de cultura. Os maiores valores de perda de peso por dissimilação foram obtidos para os cultivos em meios suplementados isoladamente com BAP (0,5 μM) e ANA (1 μM e 5 μM). O maior incremento de peso fresco (2,79 g) e peso seco (112,75 mg) foi observado em meio de cultura acrescido de 0,5 μM de ANA, indicando uma correlação positiva entre os métodos utilizados para análise do crescimento.

Palavras-chave: *Ocotea odorifera*, cultura de células, canela sassafrás, dissimilação de carbono, análise de crescimento.

¹ Capítulo a ser submetido à Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal

1. INTRODUÇÃO

Canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) - *Lauraceae*.) é uma espécie lenhosa nativa do Brasil sob risco de extinção. No Estado de Santa Catarina, sua ocorrência é maior no ecossistema da Floresta Ombrófila Densa [Floresta Atlântica], especialmente no Vale do Rio Itajaí, sendo menos freqüente na Floresta Ombrófila Mista [Floresta de Araucária]. Muitas outras *Lauraceae* ocorrem na Floresta Atlântica, incluindo *Nectandra lanceolata*, *Ocotea catharinensis*, *O. porosa* e *O. puberula*. Algumas espécies do gênero *Ocotea* produzem significativas quantidades de óleos essenciais, que são utilizados nas indústrias de perfumes e cosméticos (Sakita e Yatagai, 1992). Segundo Lordello (1996), distintas classes de metabólitos secundários são encontradas nesse gênero, tais como: alcalóides, flavonóides, esteróides, lignóides, cumarinas, monoterpenos e sesquiterpenos.

A *O. odorifera* teve grande importância econômica no estado de Santa Catarina durante muitas décadas, devido à exploração de sua biomassa lignocelulósica para a extração de óleo essencial contendo elevados teores de safrol. A partir deste fenilpropanóide, são obtidos a heliotropina, um fixador de aroma, e o butóxido de piperonila, utilizado na produção de inseticidas biodegradáveis. Além disso, o safrol também é utilizado na síntese de compostos ativos na cascata da via de síntese do ácido araquidônico com atividades antiinflamatórias, analgésicas e antitrombóticas (Barreiro e Fraga, 1999).

A grande maioria dos óleos essenciais voláteis é constituída de derivados de fenilpropanóides e terpenóides. A produção de metabólitos secundários pertencentes a estas classes, via cultura de tecidos e células vegetais, tem se concentrado em compostos bioativos de interesse farmacêutico, os quais possuem elevado custo, baixas quantidades de produção em cultivos convencionais e grande demanda. O aumento da demanda de compostos de óleos essenciais tem resultado em numerosos estudos de culturas de células de plantas, como por exemplo os monoterpenóides limoneno (Reil e Berger, 1996) α -pineno, geraniol, nerol, citronelol (Berger *et al.*, 1990) e mentol (Chang *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999).

A indução e a otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais utiliza estratégias como a manipulação epigenética e a engenharia do metabolismo celular. A manipulação epigenética considera a identificação de linhagens celulares com potencial produtivo, a otimização do meio de cultura (fontes de carbono, reguladores de crescimento e nutrientes, por exemplo) e dos fatores ambientais (fotoperíodo, temperatura, composição atmosférica), a elicitação e a adição de precursores ou inibidores da via biossintética de interesse (Maraschin e Verpoorte, 1999). O acúmulo de metabólitos secundários é resultado de um equilíbrio dinâmico entre a formação, transporte, armazenamento, modificação e degradação (Jaziri *et al.*, 1996).

Compostos que suplementam o meio de cultura, principalmente os reguladores de crescimento da classe das auxinas e citocininas, exercem influências sobre a taxa mitótica, o crescimento e a diferenciação celular. Estes compostos atuam conjunta e seqüencialmente, estimulando o processo mitótico com intensidades que são peculiares à espécie e/ou à linhagem celular. Da mesma forma, tais considerações se aplicam à ação destes compostos sobre o metabolismo secundário vegetal (George e Sherrington, 1984).

Diversos estudos têm revelado o papel da aplicação exógena de auxinas e citocininas. Em cultura de células em suspensão de *Vaccinium pahalae*, a substituição de Cinetina por de BA (6-benziladenina - 20 μ M), resultou em um aumento de três ordens de magnitude na quantidade de antocininas produzidas e uma rápida acumulação desse metabólito durante o ciclo de cultura. Além disto, a suplementação do meio de cultura com BA induziu de forma concomitante o incremento de biomassa e o aumento da produtividade de antocianinas, contrariando alguns resultados observados em diversos sistemas de cultivo celular (Fang *et al.*, 1998). Com a finalidade de avaliar o acúmulo de biomassa e a produção de cucurbitacina, cultura de células de *Ecballium elaterium* foram mantidas em meio de cultura acrescido de combinações de auxinas e citocininas. A melhor combinação para a proliferação celular consistiu-se de 5 mg/l ANA e 5 mg/l BAP. Contudo, para a produção de cucurbitacina, o melhor resultado foi obtido quando da suplementação do meio de cultura com 5 mg/l de ANA (Attard, 2001). Explantes de folhas de *Duboisia myoporoides* foram expostos à 65 diferentes combinações de citocininas/auxinas, tendo sido detectada a presença dos alcalóides hiosciamina e escopolamina em cultivos celulares em meio de cultura contendo 10 μ M de BA e 1 μ M de

ANA, onze semanas após a inoculação (Khanam *et al.*, 2000). De forma semelhante, a produção do triterpeno ácido ursólico foi obtida em culturas de células em suspensões de *Salvia officinalis*, quando cultivadas em meio de cultura MS, suplementado com 10.47 μM de ANA e 4.5 μM de BA (Bolta *et al.*, 2000). Por sua vez, elevadas concentrações de ginsenosídeo foram encontradas em culturas celulares de raízes de *Panax ginseng*, em meio de cultura semi-sólido MS suplementado com 10,74 mM de ANA, após cinco semanas de cultivo (Bonfill *et al.*, 2002).

O incremento de biomassa celular vegetal nos cultivos *in vitro* pode ser avaliado por distintos métodos, tais como: peso fresco, peso seco, curvas de dissimilação, densidade celular e volume de células sedimentadas (Schripsema, 1991). Entre os parâmetros quantitativos utilizados na caracterização do crescimento celular, o peso seco tem sido o mais utilizado devido à sua precisão. Entretanto, este método utiliza altas temperaturas (estufas) ou baixas temperaturas (liofilização) para a desidratação celular, resultando na destruição da(s) amostra(s). Em função da exposto, métodos não destrutivos como a obtenção das curvas de dissimilação de carbono têm sido utilizados para a determinação do crescimento celular de diversas culturas de células de vegetais (Schripsema, 1991; Schripsema e Verpoorte, 1992; Maraschin, 1998).

Em conexão com estudos de biossíntese de safrol *in vitro*, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar a cinética de incremento de biomassa celular de *O. odorifera*, em meio de cultura suplementado com distintas combinações de ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina, através da determinação das curvas de dissimilação de carbono, de peso fresco e peso seco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células em meio semi-sólido

Culturas celulares oriundas de tecido foliar de *O. odorifera* foram estabelecidas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de picloram (10 μM), cinetina (1

μM), vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), sacarose (3g% - p/v) como fonte única de carbono e ágar (0,6 g% - p/v), conforme previamente descrito para o meio de cultura *CSI* (Oltamari, 1998).

Amostras de culturas de células ($\varnothing \sim 50$ mm) foram coletadas 30 dias após a repicagem e inoculadas em 30 ml de meio de cultura MS, acrescido de ácido naftalenoacético (ANA - 0,0; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 μM) em combinação com 6-benzilaminopurina (BAP - 0,0; 0,5 e 1,0 μM). O meio de cultura foi suplementado com sacarose (3 g%), vitaminas MS e ágar (0,6g%). O pH do meio de cultura foi ajustado previamente à autoclavagem em 5,8 e os cultivos celulares foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e 85% de umidade relativa, durante um período de 30 dias.

Análise do crescimento celular

O crescimento das culturas celulares foi avaliado pela obtenção dos valores de peso fresco (g) e seco (mg) e através da determinação das curvas de dissimilação de carbono, conforme descrito a seguir:

a) Análise do crescimento em função do peso fresco e seco

Para a análise da cinética de crescimento através da determinação dos valores de peso seco e peso fresco das culturas celulares foram utilizadas 12 placas de Petri/tratamento, contendo 20 ml de meio de cultura e 2 agregados celulares (1,0 g/placa). Em intervalos de 5 dias, coletou-se a biomassa celular de 2 placas de Petri/tratamento e determinou-se o valor do peso fresco e peso seco em balança KERN 430-21 (amplitude: 50 g – precisão: 1 mg). Para a obtenção do peso seco, as amostras foram transferidas para estufa e mantidas a 70°C por um período de 48 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado (DCC), com quinze tratamentos e duas repetições. Os dados foram submetidos à análise da variância e teste SNK ($p < 0,05$).

b) Obtenção das curvas de dissimilação de carbono

A capacidade de sustentação do crescimento celular dos meios de cultura, suplementados com as combinações de reguladores de crescimento (tratamentos) acima descritas, foi analisada através da determinação das curvas de dissimilação de carbono (Schripsema, 1991). Para cada tratamento, foram utilizadas 4 placas de Petri, contendo 20 ml de meio de cultura/placa, onde foram inoculados 2,0 g de biomassa celular/placa. Para efeitos de controle da evaporação e da difusão de CO₂, foram usadas 2 placas idênticas, contendo apenas o meio de cultura (20 ml), totalizando 96 placas. Imediatamente após a inoculação, as placas foram vedadas com parafilme e pesadas em intervalos de 24 horas em balança KERN 430-21 (amplitude: 50g – precisão: 1 mg), por um período de 30 dias.

A análise dos dados de perda de peso por dissimilação e a obtenção das curvas de dissimilação de carbono utilizou o programa *Wegen*, desenvolvido na divisão de Farmacognosia da Universidade de Leiden (Leiden, Holanda). Os dados de dissimilação total dos cultivos celulares foram determinados calculando-se o valor da integral da área de cada curva de dissimilação com o auxílio do programa *Origin v. 5.0*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) Análise do crescimento em função do peso fresco e seco

A análise de incremento do peso fresco celular revelou a existência de um perfil sigmoidal para todos os cultivos, independente do tratamento, com um coeficiente de determinação médio de $r^2 \geq 0,93$. Resultados semelhantes foram obtidos em culturas de células estáticas e em suspensão de *Mandevilla velutina* e *Tabernaemontana divaricata* (Araujo, 2001, Maraschin, 1998; Schripsema, 1991). Em todos os tratamentos os cultivos celulares não atingiram a fase estacionária de crescimento, havendo diferenças significativas no que concerne à duração das fases inicial e exponencial, segundo a combinação de reguladores de crescimento utilizada na suplementação do meio de cultura (Tabela 1). A fase inicial de crescimento normalmente caracteriza-se como um período de

adaptação celular às condições impostas pelo meio de cultura. Desta forma, a curta duração da fase inicial de crescimento pode ser um indicativo de uma rápida adaptação celular ao meio de cultura.

A metodologia adotada, no que se refere ao intervalo de coleta das amostras, não permitiu discriminar o tempo do início da fase estacionária da curva de crescimento celular, uma vez que foram realizadas coletas somente durante o período de trinta dias. Este fato é de importância quando se considera que as maiores concentrações de metabólitos têm sido encontradas, usualmente, ao final da fase exponencial de crescimento e/ou início da fase estacionária (Maraschin, 1998). A caracterização das fases de crescimento em culturas celulares é de importância, uma vez que um menor tempo de duração de cada fase pode resultar em uma economia, por exemplo, de tempo e de gastos laboratoriais (mão-de-obra, reagentes e energia) (Araujo, 2001). O conhecimento do tempo de duração de cada fase é um pressuposto básico para a aplicação de estratégias que visem o incremento de metabólitos secundários, como por exemplo um sistema de cultivo em dois estágios, sendo inicialmente favorecido o máximo acúmulo de biomassa, seguido pela transferência das células para o meio de produção que favoreça a biossíntese do(s) composto(s) de interesse (Schlatmann, 1995).

A análise de regressão da variável peso seco apresentou um modelo quadrático ($r^2 \geq 0,92$) ao longo do período de cultivo para todos os tratamentos realizados, exceto para culturas celulares mantidas em meio de cultura suplementado com 5 μM de ANA e 0,5 μM de BAP, o qual apresentou um modelo sigmoideal de crescimento (Tabela 1). A determinação do peso seco tem sido um dos métodos mais utilizados para a quantificação do crescimento celular *in vitro*, pois é considerado mais preciso em relação ao peso fresco. Tal fato pode ser observado quando os cultivos celulares apresentam-se hiperhídricos em decorrência, por exemplo da ação de fatores ambientais (U.R, temperatura ou fotoperíodo, por exemplo), ou ainda de constituintes do meio de cultura (fonte de carbono ou nitrogênio, por exemplo).

A análise de variância dos dados de peso fresco e peso seco das culturas celulares revelou a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos de reguladores de crescimento em estudo, após 25 e 30 dias de cultivo. Todavia, em momentos

anteriores a este período, os dados não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Tabela 2.

O maior incremento de peso fresco (2,72 g) e peso seco (122,75 mg) foi observado em meio de cultura acrescido de 0,5 μM de ANA, após 30 dias de cultivo. Entretanto, o valor de peso seco não difere estatisticamente, segundo o teste SNK ($p < 0,05$), daqueles observados para os cultivos celulares em meio de cultura acrescido de 0,5 μM de BAP (115,80 mg) (Tabela 2). Esse comportamento nem sempre é observado *in vitro*, onde em alguns casos o incremento de biomassa com base em peso fresco não correlaciona-se diretamente ao peso seco, devido aos efeitos da hidratação celular sobre a primeira variável. Além disto, em diversos estudos do metabolismo vegetal, tem sido observado que a máxima taxa de acúmulo de biomassa celular é, muitas vezes, antagônica ao maior nível de síntese/liberação de compostos do metabolismo secundário de interesse nas culturas *in vitro* (Maraschin e Verpoorte, 1999). Em alguns casos, todavia, há uma relação positiva entre o crescimento e síntese de metabólitos, como observado para *Morinda elliptica*, onde a melhor condição para a produção de biomassa e de antraquinonas foi encontrada quando as células foram cultivadas em meio de cultura MS, suplementado com 0,5 mg/l de ANA e 0,5mg/l de cinetina (Abdullah *et al.*, 1988). No caso específico dos cultivos celulares de canela sassafrás, estudos complementares são necessários, no que se refere à análise dos efeitos dos reguladores de crescimento sobre a síntese de safrol, de modo a se definir qual a combinação de reguladores de crescimento mais estimulatória da síntese daquele fenilpropanóide.

Os dados de incremento de biomassa das culturas celulares mantidas em meio isento de reguladores de crescimento demonstraram a ocorrência de somaclones com um comportamento autotrófico quanto à capacidade de síntese dos promotores de crescimento em estudo. Estes cultivos mantiveram o processo de crescimento ao longo de todo o período experimental, alcançando valores de acúmulo de biomassa de 1,93 g (peso fresco) e 115 mg (peso seco) ao término deste (Tabela 2). O caracter autotrófico de populações celulares quanto aos promotores de crescimento é usualmente bastante estável, com as células permanecendo independentes do suprimento exógeno destes compostos por várias gerações (George e Sherrington, 1984). Como exemplo disto, cultivos de células em suspensão de *Mandevilla velutina* em meio MS demonstraram a existência de somaclones

autotróficos para os reguladores de crescimento, com taxas de crescimento estáveis ao longo de 7 gerações (~ 10 meses) (Maraschin, 1998). A seleção de linhagens celulares com alto potencial produtivo, tendo por base a variação somaclonal existente nas populações celulares mantidas em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento, apresenta-se como uma alternativa para o estabelecimento de um sistema de produção de compostos bioativos *in vitro* com alta eficiência. O fenômeno de variação somaclonal, de ocorrência espontânea, tem sido observado em vários sistemas de cultivo *in vitro*, incluindo cultura de protoplastos (Shepard *et al.*, 1980), calos, suspensões celulares (Smith e Street, 1974) e órgãos (Earle e Gracen, 1984), podendo ter sua origem em fatores genéticos ou epigenéticos (Hadi e Bridgen, 1996). No primeiro caso, mutações pontuais (Evans e Sharp, 1983), alterações de número (poliploidia e aneuploidia) ou de arranjo cromossomal (recombinação), de número de cópias de genes, bem como as variações citoplasmáticas (Tabata *et al.*, 1978) têm sido relatados, sendo estes transmitidos à progênie (Scowcroft e Larkin, 1988). A poliploidia se mostra como o fenômeno de maior frequência de ocorrência nos cultivos *in vitro*, sendo dependente do tipo e concentração de citocininas utilizadas. O surgimento de células aneuplóides parece ter relação direta com o envelhecimento das culturas (Evans *et al.*, 1987). Variações de causa epigenética surgem a partir de agentes de meio, bióticos ou abióticos, sendo fenotipicamente estáveis, mas não sexualmente transmitidas às próximas gerações. Uma terceira e mais simples abordagem das causas da heterogeneidade celular *in vitro*, a considera como resultante de diferenças cinéticas no processo de diferenciação celular (assincronia), em dado momento da cultura (Petiard *et al.*, 1987). A identificação de somaclones de canela sassafrás autotróficos para os reguladores de crescimento é de interesse, porque evita sua exposição aos conhecidos efeitos mutagênicos daqueles compostos. No contexto tecnológico, por sua vez, esta condição traz implicações significativas, porque permite a utilização de um sistema de cultivo mais estável do ponto de vista fenotípico e reduz a possibilidade de perdas de linhagens altamente produtoras de safrol.

Tabela 1. Duração (dias) das fases de crescimento de culturas celulares estáticas de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS, suplementado com ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP), com base nos valores médios de acúmulo de peso fresco (g) e peso seco (mg). Os dados foram coletados em intervalos de cinco dias, ao longo do período de cultivo (30 dias), e submetidos à análise de regressão ($p < 0,05$).

ANA (μM)	BAP (μM)	Duração das fases de crescimento	
		Peso fresco (g)	Peso seco (mg)
-	-	Inicial: 3 dias - Exponencial: 27 dias $y = 0,0005x^3 - 0,0002x^2 + 0,0194x + 0,503$ $r^2 = 0,9971$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0639x^2 + 0,8168x + 33,55$ $r^2 = 0,9764$
-	0,5	Inicial: 3 dias - Exponencial: 27 dias $y = 0,0001x^3 - 0,0026x^2 + 0,041x + 0,4873$ $r^2 = 0,9977$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0841x^2 + 0,0948x + 38,075$ $r^2 = 0,9916$
-	1,0	Inicial: 5 dias - Exponencial: 25 dias $y = 0,005x^3 + 0,0024x^2 - 0,0068x + 0,5161$ $r^2 = 0,9903$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0291x^2 + 1,2941x + 30,025$ $r^2 = 0,963$
0,5	-	Inicial: 5 dias - Exponencial: 25 dias $y = 0,0001x^3 - 0,0022x^2 + 0,0248x + 0,4973$ $r^2 = 0,9999$	Exponencial: 30 dias $Y = 0,1268x^2 - 1,0818x + 39,65$ $r^2 = 0,9958$
1,0	-	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,000000005x^3 - 0,0028x^2 + 0,0431x + 0,4825$ $r^2 = 0,9836$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0591x^2 + 0,177x + 39,075$ $r^2 = 0,9675$
5,0	-	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,0005x^3 - 0,0014x^2 + 0,0285x + 0,5028$ $r^2 = 0,9892$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0088x^2 + 0,9795x + 31,375$ $r^2 = 0,9669$
10,0	-	Inicial: 2 dias - Exponencial: 28 dias $y = 0,4x^3 - 0,0035x^2 + 0,0515x + 0,4776$ $r^2 = 0,9854$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0802x^2 - 0,7734x + 43,425$ $r^2 = 0,9283$
0,5	0,5	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,000000006x^3 - 0,0004x^2 + 0,0276x + 0,5119$ $r^2 = 0,9695$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0396x^2 + 0,3425x + 40,85$ $r^2 = 0,9316$
1,0	0,5	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,00005x^3 - 0,0007x^2 + 0,0188x + 0,5196$ $r^2 = 0,9745$	Exponencial: 25 dias $y = 0,1175x^2 - 1,1368x + 42,05$ $r^2 = 0,9911$
5,0	0,5	Inicial: < 24 horas Exponencial: 29 dias $y = 0,6x^3 - 0,0004x^2 + 0,0272x + 0,5066$ $r^2 = 0,9318$	Inicial: 10 dias Exponencial: 16 dias Estacionária: 4 dias $y = 0,0104x^3 + 0,5326x^2 - 6,3276x + 62,361$ $r^2 = 0,9811$
10,0	0,5	Inicial: < 24 horas Exponencial: 29 dias $y = 0,000005x^3 - 0,0008x^2 + 0,0197x + 0,5114$ $r^2 = 0,9965$	Exponencial: 30 dias $y = 0,1082x^2 - 2,0561x + 45,45$ $r^2 = 0,9528$
0,5	1,0	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,0001x^3 - 0,0033x^2 + 0,0414x + 0,4919$ $r^2 = 0,9943$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0798x^2 - 0,8609x + 42,175$ $r^2 = 0,9744$
1,0	1,0	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,00004x^3 - 0,0028x^2 + 0,0374x + 0,5038$ $r^2 = 0,9922$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0529x^2 + 0,3171x + 35,45$ $r^2 = 0,9703$
5,0	1,0	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,000000005x^3 - 0,003x^2 + 0,0457x + 0,492$ $r^2 = 0,9945$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0752x^2 - 0,6741x + 42,375$ $r^2 = 0,956$
10,0	1,0	Inicial: < 24 horas - Exponencial: 29 dias $y = 0,0001x^3 - 0,0039x^2 + 0,0454x + 0,4886$ $r^2 = 0,9987$	Exponencial: 30 dias $y = 0,0832x^2 - 0,8339x + 42$ $r^2 = 0,9397$

Tabela 2. Médias de peso fresco (g) e peso seco (mg) de cultivos celulares de *Ocotea odorifera* em meio de cultura MS, acrescido de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP), aos 25 e 30 dias de cultivo.

ANA (μ M)	BAP (μ M)	Pesos (25 dias de cultivo)		Pesos (30 dias de cultivo)	
		Fresco (g)	Seco (mg)	Fresco (g)	Seco (mg)
-	-	1,51 ab*	94,50 a	1,93 bc	115,00 ab
-	0,5	1,48 abc	88,75 ab	2,24 b	115,8 a
-	1,0	1,44 abc	87,50 abc	1,61 bcd	91,50 ab
0,5	-	1,75 a	90,25 ab	2,72 a	122,75 a
1,0	-	1,15 bcde	75,75 abcd	1,76 bcd	99,50 ab
5,0	-	0,94 de	59,25 d	1,18 de	69,25 b
10,0	-	1,09 cde	64,50 d	1,63 bcd	97,50 ab
0,5	0,5	1,14 bcde	79,25 abcd	1,21 de	84,25 ab
1,0	0,5	1,53 ab	86,25 abc	1,84 bcd	115,00 ab
5,0	0,5	0,88 e	73,33 abcd	0,97 e	72,00 b
10,0	0,5	1,12 bcde	58,50 d	1,43 cde	81,75 ab
0,5	1,0	1,09 cde	67,00 cd	1,67 bcd	90,75 ab
1,0	1,0	1,17 bcde	73,50 abcd	1,77 bcd	93,00 ab
5,0	1,0	1,21 bcde	70,50 bcd	1,62 bcd	92,25 ab
10,0	1,0	1,30 bcd	65,00 d	2,05 bc	96,50 ab

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o teste SNK ($p < 0,05$).

b) Obtenção das curvas de dissimilação de carbono

Níveis distintos de metabolização de sacarose foram observados nas culturas celulares, segundo a combinação e concentração de reguladores de crescimento adicionados no meio de cultura. Análises do crescimento *in vitro* de células vegetais através de curvas de dissimilação permitem avaliar a relação entre o consumo de açúcares (fontes de carbono) e o crescimento celular, já que somente uma parte do açúcar disponibilizado às células é convertido em biomassa, sendo o restante dissimilado para suprir os requerimentos energéticos celulares (Schripsema, 1991; Maraschin, 1998; Araujo, 2001).

A análise dos dados de dissimilação de sacarose demonstrou a existência de comportamentos distintos quanto à duração das fases de crescimento das culturas (Tabela 3). Os cultivos celulares apresentaram uma fase inicial de crescimento com duração bastante variável, entre 24 horas a 6 dias, segundo o tratamento utilizado. A fase exponencial por sua vez, estendeu-se durante todo o período de cultivo e a fase estacionária somente foi observada para os tratamentos com 1 μM de BAP e 5 μM de ANA. A não ocorrência da fase estacionária, sugere que o meio de cultura não se encontra depletado da fonte de carbono, o que pode estar relacionado a uma baixa taxa de metabolização de carbono nos cultivos celulares. As curvas de dissimilação revelaram perfis de incremento de biomassa segundo os modelos sigmoidal, quadrático e linear, dependendo da composição do meio de cultura.

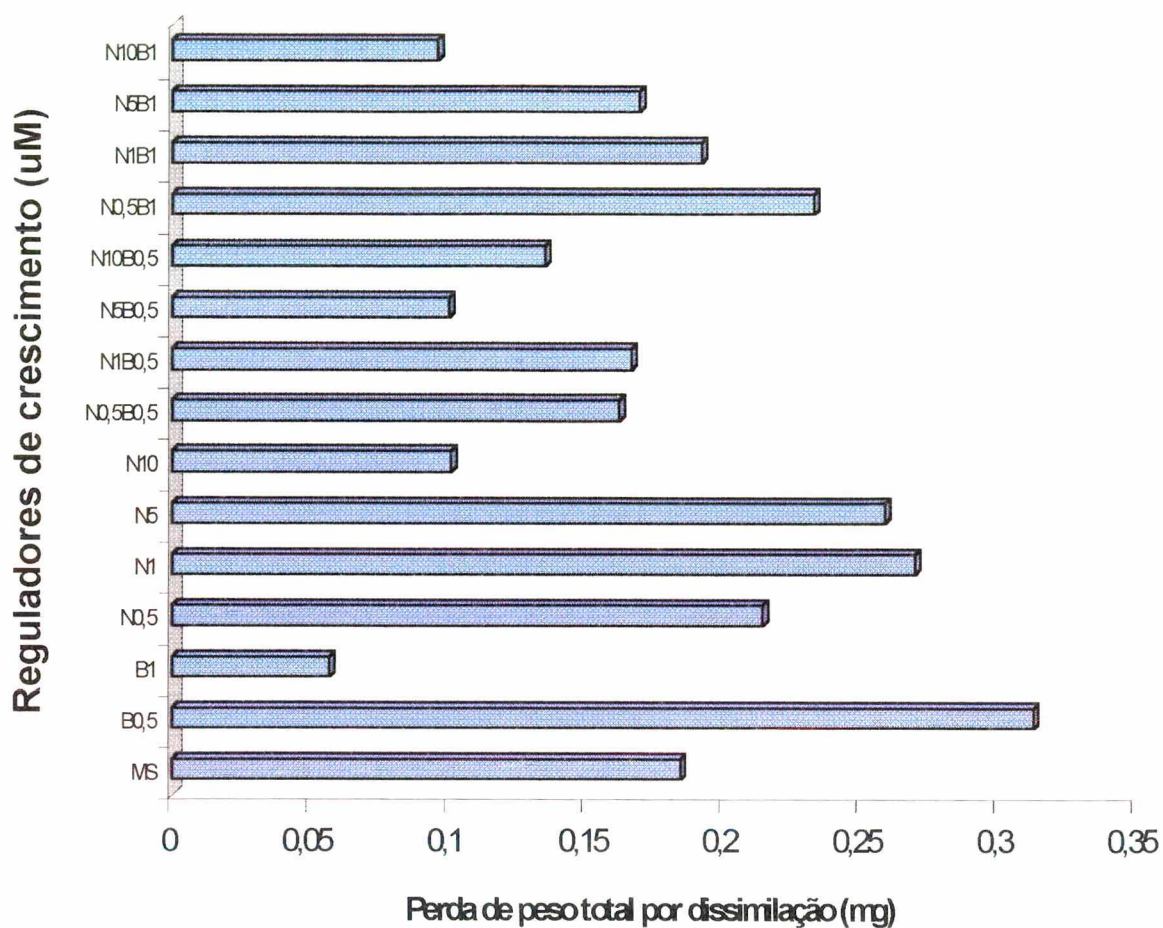
Os valores de perda de peso total por dissimilação das linhagens celulares podem ser observados na Figura 1. As maiores perdas de peso por dissimilação de carbono foram obtidas nas culturas celulares mantidas em meios suplementados com 0,5 μM de BAP (0,313 mg) e 1 μM e 5 μM de ANA (0,270 mg e 0,259 mg, respectivamente), sugerindo uma maior taxa de metabolização de sacarose naquelas condições. Por sua vez, a utilização isolada de BAP na concentração de 0,5 μM induziu à mais baixa taxa de acúmulo de biomassa nos cultivos celulares (Figura 2). A seleção de linhagens com menores taxas de crescimento, devido ao maior custo energético para absorção/metabolização de carboidratos do meio de cultura, pode ser interessante quando se objetiva otimizar a síntese/acúmulo de produtos do metabolismo secundário, visto que muitos destes compostos são gerados sob situações de estresse da planta e/ou dos cultivos *in vitro* (Maraschin, 1998). A menor perda

de peso por dissimilação foi obtida em meio de cultura acrescido de 1 μ M de BAP (0,057 mg) (Figura 1), entretanto, nesse tratamento foi observado o maior incremento de peso fresco, expresso em ordens de magnitude em relação a biomassa inicial (1,73x). Estes resultados tomados em conjunto indicam a inexistência de uma relação significativa entre a perda de peso por dissimilação e o peso fresco final dos cultivos.

Distintos incrementos de biomassa foram encontrados quando comparados os dois experimentos de análise de crescimento (análise do peso fresco/seco e obtenção das curvas de dissimilação) na mesma composição do meio de cultura. Essa variação pode estar relacionada com a densidade de inóculo inicial (1 g de células nos experimentos do peso fresco e seco e 2 g células nos experimentos de análise da dissimilação) ou a ocorrência de somaclones com distintos comportamentos em função da combinação e concentração dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura.

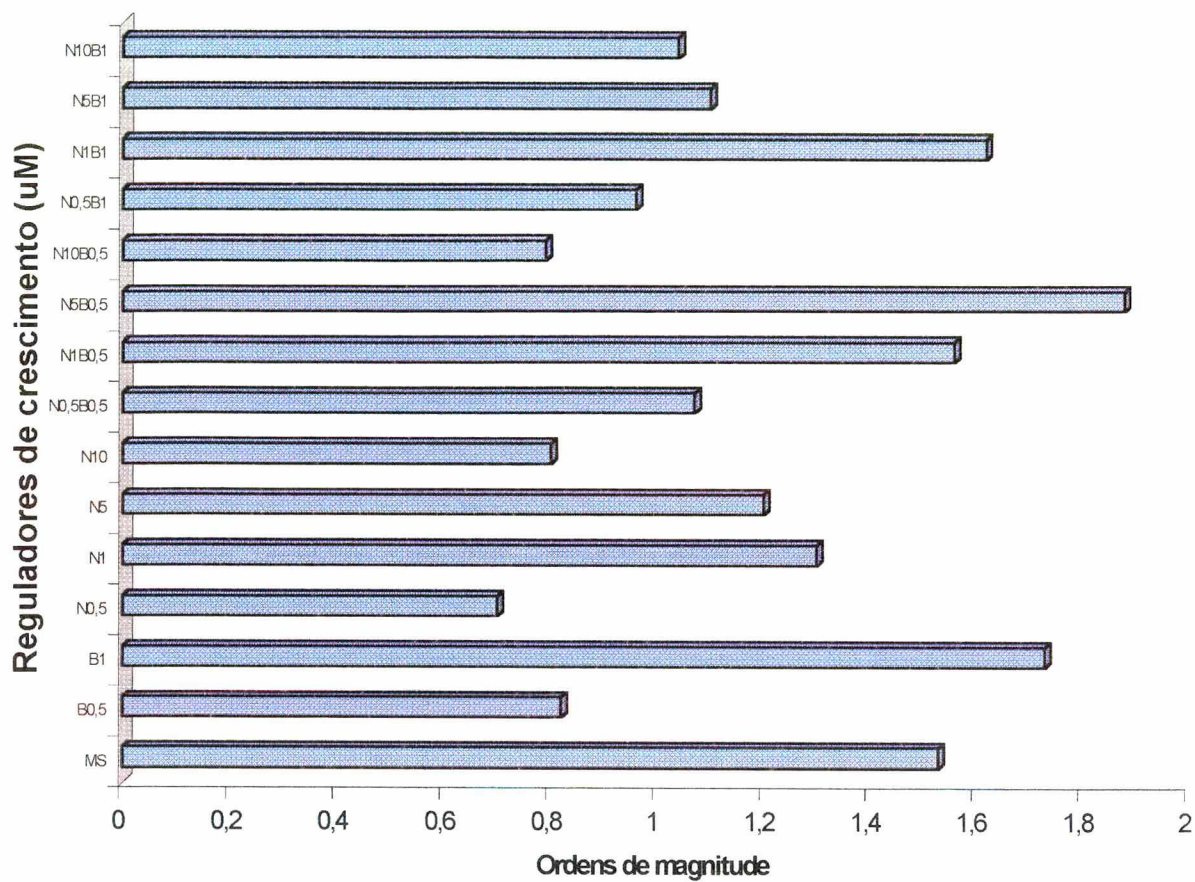
Tabela 3 – Duração (dias) das fases de crescimento celular de *O. odorifera* em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP), segundo análise das curvas de dissimilação de carbono.

ANA (μM)	BAP (μM)	Duração das fases de crescimento
-	-	Inicial: ≤ 24 horas $y = 0,01204x + 4,24844$ $r^2 = 0,99589$
-	0,5	Inicial: ≤ 24 horas $y = 0,01432x + 7,2282$ $r^2 = 0,99773$
-	1,0	Inicial: 6 dias Exponencial: 20 dias Estacionária: 4 dias $y = 7,86 \cdot 10^{-6} x^3 - 3,88 \cdot 10^{-4} x^2 + 0,00264x + 1,76151$ $r^2 = 0,99181$
0,5	-	Inicial: ≤ 24 horas Exponencial: 30 dias $y = 6,62 \cdot 10^{-6} x^3 - 3,66 \cdot 10^{-4} x^2 + 0,01496x + 0,72863$ $r^2 = 0,99561$
1,0	-	Inicial: 2 dias Exponencial: 28 dias $y = -5,94 \cdot 10^{-5} x^2 - 0,0062 x + 7,15182$ $r^2 = 0,99745$
5,0	-	Inicial: 2 dias Exponencial: 27 dias Estacionária: 1 dia $y = 1,46 \cdot 10^{-6} x^3 - 8,01 \cdot 10^{-5} x^2 - 0,00858 x + 5,53989$ $r^2 = 0,99701$
10,0	-	Inicial: ≤ 24 horas Exponencial: 30 dias $y = 4,71 \cdot 10^{-5} x^2 + 0,0045x + 9,68304$ $r^2 = 0,98738$
0,5	0,5	Inicial: ≤ 24 horas $y = 0,00388x + 4,8271$ $r^2 = 0,9946$
1,0	0,5	Inicial: 2 dias Exponencial: 28 dias $y = 1,35 \cdot 10^{-5} x^2 - 0,00683 x + 3,16544$ $r^2 = 0,99681$
5,0	0,5	Inicial: 4 dias Exponencial: 26 dias $y = 4,61 \cdot 10^{-6} x^2 - 0,00375x + 2,81327$ $r^2 = 0,98849$ $Y = -4,60829E-6 x^2 -$
10,0	0,5	Inicial: ≤ 24 horas Exponencial: 30 dias $y = 4,35 \cdot 10^{-6} x^2 - 0,00416 x + 2,06405$ $r^2 = 0,98256$
0,5	1,0	Inicial: ≤ 24 horas Exponencial: 30 dias $y = 0,00821 x + 5,36025$ $r^2 = 0,99092$
1,0	1,0	Inicial: 2 dias Exponencial: 28 dias $y = 1,80 \cdot 10^{-5} x^2 + 0,00712 x + 2,21357$ $r^2 = 0,99477$
5,0	1,0	Inicial: 2 dias Exponencial: 28 dias $y = 6,90 \cdot 10^{-5} x^2 - 0,01046 x + 2,24418$ $r^2 = 0,99837$
10,0	1,0	Inicial: 2 dias Exponencial: 28 dias $y = Y = -1,42 \cdot 10^{-5} x^2 - 0,00413 x + 1,59243$ $r^2 = 0,99222$



*B = BAP e N = ANA

Figura 1 – Perda de peso total (mg) por dissimilação de carbono de células de *O. odorifera* em meio de cultura MS acrescido de ácido naftalenoacético (ANA - 0,0; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 μM) e 6-benzilaminopurina (BAP - 0,0; 0,5 e 1,0 μM), ao longo de 30 dias de cultivo.



*B = BAP e N = ANA

Figura 2 - Incremento de biomassa fresca em ordens de magnitude em relação a biomassa inicial (2 g) de culturas celulares de canela sassafrás em meio de cultura MS suplementado com ácido naftalenoacético (ANA - 0,0; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 μM) 6-benzilaminopurina (BAP - 0,0; 0,5 e 1,0 μM), após 30 dias de cultivo.

CAPÍTULO VII

ANÁLISE DO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE CANELA SASSAFRÁS (*OCOTEA ODORIFERA* (VELL.) ROHWER) POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA ¹

Oltramari, AC²; Viana, A.M.³; Pedrotti, E.L.²; Wood KV⁴; Bonham, C⁴; Maraschin, M.²

²Lab. Morfogênese e Bioquímica Vegetal - Centro de Ciências Agrárias/UFSC; ³Centro de Ciências Biológicas/UFSC; ⁴Campus-wide Mass Spectrometry Center - Department of Chemistry, Purdue University - West Lafayette, IN-USA

RESUMO – A biossíntese de safrol e outros compostos do metabolismo secundário de linhagem celular, produzidas a partir de cultura *in vitro* de segmentos de folhas de canela sassafrás, foi monitorada ao longo das gerações de cultivo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). A análise de amostras das frações orgânicas dos cultivos celulares mantidos em meio CS_2 revelou a existência de perfis distintos de constituintes químicos, ao longo das gerações de cultivo. Entretanto, os dados demonstraram que a linhagem celular em estudo apresentou-se estável quanto à síntese de safrol. A ocorrência de somaclones autotróficos para reguladores de crescimento foi observada, os quais apresentaram capacidade de síntese de safrol ao longo do período de cultivo.

Palavras-chave: biossíntese de safrol, metabolismo secundário, cultura de células, canela sassafrás.

¹ Capítulo a ser submetido à revista *Phytochemical Analysis*.

1. INTRODUÇÃO

Diversas espécies pertencentes à família *Lauraceae* ocorrem na Floresta Atlântica, incluindo *Ocotea odorifera* (canela sassafrás), *O. catharinensis* (canela preta), *O. porosa*, *O. puberula* e *Nectandra lanceolata*. A partir da biomassa destas espécies, uma série de compostos derivados do metabolismo secundário têm sido obtidos, como por exemplo: alcalóides, flavonóides, esteróides, lignóides, cumarinas, monoterpenos e sesquiterpenos (Lordello, 1996), sugerindo a existência de uma diversidade química elevada e caracterizando esta família botânica como de elevado potencial como fonte de compostos bioativos de interesse. Algumas espécies dos gêneros *Ocotea*, *Cinnamomum* e *Aniba* produzem significativas quantidades de óleos essenciais de utilização corrente nas indústrias de perfumes e cosméticos (Sakita e Yatagai, 1992), mencionando-se o óleo de pau-Rosa (*Aniba duckey*), o óleo de canela do Ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*), o óleo de canela da China (*Cinnamomum cassia*) e o óleo de cânfora (*Cinnamomum camphora*), por exemplo (Craveiro *et al.*, 1981).

Análises mais detalhadas da fração óleo essencial de *Sassafras albidum* (*Lauraceae*) revelaram a ocorrência de safrol (85%) como composto majoritário, cânfora (3,25%) e metil-eugenol (1,10% - Kamdem e Gage, 1995). Por sua vez, o óleo essencial extraído da casca de *Ocotea catharinensis* possui como principais componentes: linalol (95,76%), α -terpineol (1,47%), β -citronelol (0,28%), geraniol (0,75%), 1,8-cineol (0,14%), α -pineno (0,07%) e o óxido-3,6-linalol (0,36%) (Sakita e Yatagai, 1992). Estudos realizados por Silva (1987) demonstraram que o óleo essencial de *Ocotea odorifera* contem em sua composição safrol (92%), pineno (0,7%), eugenol (0,6%), furfurool (0,17%), cineol (0,21%), *n*-valeraldeído (0,001), benzaldeído (0,03%) e sesquiterpenos (5,1%).

Estudos fitoquímicos concernentes à canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) indicam um teor médio de safrol de 80% na fração óleo essencial, valor este que apresenta variações segundo a idade da planta, a região de ocorrência e o órgão (raiz, caule, ramos) utilizado no processo extrativo. A partir deste fenilpropanóide, são obtidos a heliotropina, um fixador de aroma, e o butóxido de piperonila, utilizado na produção de

inseticidas biodegradáveis (EMBRAPA, 1998). A exploração intensiva da biomassa de canela sassafrás, visando a obtenção de óleo essencial, ocorreu segundo um modelo extrativista, ao longo de aproximadamente 40 anos (1940 - 1980), levando a espécie ao risco de extinção (Oltamari *et al.*, 2002). Do ponto de vista tecnológico, uma das principais restrições à propagação desta espécie é a pequena quantidade de material seminífero produzido por plantas matrizes, com uma estimativa de 2.000 sementes/ano/planta matriz de 100 anos de idade. Uma segunda limitação neste contexto é o seu grande período de juvenilidade, o qual pode se estender de 25 a 40 anos, dificultando a obtenção de mudas (Duarte da Silva, *et al.*, 2001). Assim, devido às suas características reprodutivas e ao seu longo ciclo de crescimento, o cultivo em larga escala de *O. odorifera* apresenta dificuldades. Além disto, o sistema exclusivamente extrativista de exploração de sua biomassa concorreu para o estabelecimento de uma condição crítica de sobrevivência da espécie em seu ecossistema nativo, com implicações significativas no que se refere à sua exploração comercial. Em função do exposto, estudos visando a obtenção e o desenvolvimento de formas alternativas e sustentáveis de produção do óleo de sassafrás e safrol são de interesse, permitindo o abastecimento do mercado sem comprometer os germoplasmas remanescentes desta espécie (Oltamari *et al.*, 2002).

Neste contexto, estudos que buscam formas alternativas de produção de safrol tem sido realizados considerando a exploração do potencial produtivo de diversas espécies como, por exemplo, *Sassafras officinale*, *Cinnamomum spp*, *Magnolia kobus*, *Boronia saffrolifera*, *Laurelia serrata*, *Daphnandra aromatica* e *Piper hispidinervium* (Silva, 1987; Pescador *et al.*, 2000). Segundo Bizzo *et al.* (2000), o óleo extraído da folha de *Piper hispidinervium* possui em sua composição 18,4% de safrol. Em *Illicium sp.*, safrol é o componente majoritário da fração óleo essencial extraída do tronco e da casca da raiz (60,2 e 77,7 %, respectivamente (Tam *et al.*, 1998).

A grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados de fenilpropanóides e terpenos. A produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos tem se concentrado em compostos farmacêuticos, os quais possuem elevado custo, baixas quantidades de produção em cultivos convencionais e grande demanda. O aumento da demanda de compostos de óleos essenciais tem resultado em numerosos estudos de culturas de células de plantas *in vitro*.

O presente trabalho tem como objetivos: a) monitorar a biossíntese de safrol e outros compostos do metabolismo secundário em culturas de células de canela sassafrás, ao longo das gerações de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1) Cultura de células em meio semi-sólido

Experimento 1: Linhagem celular (12^o geração), oriunda de tecido foliar, foi cultivada em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de picloram (10 μ M), cinetina (1 μ M), vitaminas de Morel (Morel e Wetmore, 1951), sacarose (3 g%) e ágar (0,6 g%), conforme previamente descrito para o meio de cultura *CS_I* (Oltamari, 1998). Os cultivos celulares foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 85% de U. R., com intervalos de subcultivos de 30 dias. Para efeitos de análise da síntese de metabólitos secundários, ao longo de um período experimental de 8 meses, amostras de células (~ 30 g – biomassa fresca) foram coletadas no 1^o (13^o geração), 4^o (16^o geração) e 8^o (20^o geração) meses de cultura. Após a coleta as amostras foram imediatamente armazenadas em freezer (-18°C), até o momento da extração.

Experimento 2: Amostras de células (~ 3,0 g – biomassa fresco) cultivadas em meio de cultura MS (3 gerações, intervalo de subcultivo de 30 dias), vitaminas de Morel e ágar (0,6 g%) foram coletadas e armazenadas em freezer (-18°C), até o momento da extração.

2) Extração da fração óleo essencial com solventes orgânicos

As amostras de células dos distintos experimentos, foram desidratadas em estufa a 70°C por 24 horas. Frações contendo 2,5 g de biomassa seca de cada experimento foram maceradas com nitrogênio líquido e incubadas por um período de 24 horas em uma solução de 10 ml de MeOH/ CHCl_3 (1:1). Ao término deste período, o material foi filtrado em

suporte de porcelana, sob vácuo. A fração orgânica foi centrifugada (6 krpm/5min), o sobrenadante foi coletado e evaporado até atingir um volume de 0,8 ml.

3) Análise do conteúdo de metabólitos secundários nas frações orgânicas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Amostras (1 μ l) das frações orgânicas dos cultivos foram analisadas quanto ao conteúdo de metabólitos secundários em espectrômetro de massa (ThermoFinnigan GCQ) acoplado à cromatógrafo equipado com coluna DB-1. A programação de temperatura da coluna foi de 50°C/0,1 min, seguido de elevação a 240°C, a 10°C/min. Para a ionização das amostras foi utilizada uma interface de impacto de elétrons (IE - 70 eV).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados de composição de metabólitos secundários das frações orgânicas dos cultivos celulares de canela sassafrás por CG-EM revelou a existência de perfis distintos ao longo das gerações de cultivo, conforme demonstrado na figura **1a-c** e tabela **1**. A variabilidade química observada nas amostras em estudo mostrou-se crescente ao longo das gerações de cultivo, demonstrando o efeito do tempo de cultivo sobre a síntese de compostos do metabolismo secundário de canela sassafrás. Esta abordagem é de interesse, uma vez que permite monitorar o potencial biossintético (totipotência bioquímica) (Zenk 1978), a uniformidade e a estabilidade do metabolismo secundário, parâmetros de significativa importância na análise da viabilidade de sistemas de produção *in vitro* de compostos bioativos. A perda, ou a redução, da capacidade de síntese de um dado composto em linhagens celulares altamente produtivas determina a necessidade de resseleção destes materiais, uma tarefa usualmente tediosa e que consome uma apreciável quantidade de tempo e de recursos financeiros (Ohta e Verpoorte, 1992; Maraschin, 1998).

Tabela 1. Composição qualitativa de metabólitos secundários na fração orgânica (CHCl₃:MeOH, 1:1) de células de canela sassafrás cultivadas em meio CS₁, ao longo de 7 gerações de cultivo (tempo de residência = 30 dias).

COMPOSTOS	GERAÇÕES DE CULTIVO		
	13 ^o	16 ^o	20 ^o
(a) a) Safrol [4 alil 1,2 metileno dioxibenzeno] , PM = 162	X	X	X
(b) b) Ciclopropano, 1-2 (metilbutil)-1-(1-metilpropil), PM = 168		X	
(c) c) Acil-fenol (C ₈), PM = 206		X	X
(d) d) Ácido graxo (C ₁₃), PM = 214			X
(e) e) Ácido graxo (C ₁₄), PM = 228	X		X
(f) f) Ácido graxo (C ₁₆), PM = 256			X
(g) g) Olefina ou álcool superior			X
(h) h) Hidrocarbonetos		X	X
(i) i) Produtos de hidrólise de açúcares	X		

Estudos relativos ao metabolismo secundário de canela sassafrás são escassos, porém, usualmente referem-se à detecção e quantificação do composto alil benzênico safrol na fração óleo essencial obtida por hidro-destilação de biomassas oriundas de processos extrativistas – i.e. caule, raízes e ramos, devido à sua importância em processos de síntese e semi-síntese de compostos de interesse das indústrias química, farmacêutica e de alimentos (piperonal, vanilina, isovanilina, isoeugenol) (Hickey, 1948; Silva, 1987). Neste contexto, os dados revelaram que a linhagem celular em estudo apresentou-se estável quanto à síntese deste composto, caracterizando-a como de interesse para estudos subsequentes de otimização do processo de produção de safrol, segundo uma abordagem de engenharia de metabolismo (Maraschin e Verpoorte, 1999). Contudo, estudos neste contexto utilizando biomassas de canela sassafrás produzidas em sistemas *in vitro* não têm sido encontrados na literatura, sugerindo que este seja o primeiro relato desta natureza.

O acoplamento da espectrometria de massa à cromatografia gasosa permitiu a detecção e a identificação de uma série de compostos nas amostras em estudo, revelando o potencial desta técnica espectroscópica e a adequação da abordagem experimental utilizada. A EM foi introduzida no início da década de 60 como técnica altamente sensível e seletiva de detecção (ordem de µg) de compostos, com limite ótimo de detecção na faixa de 40 mol (10⁻¹⁸ M). De modo geral, e a despeito de algumas dificuldades devido a características particulares de cada técnica e material amostral, os métodos analíticos seqüenciais (*on line*), e especialmente a CG-EM, têm demonstrado ser uma estratégia adequada, quando se busca

maior sensibilidade e seletividade na análise de amostras biológicas (Maraschin e Verpoorte, 2001). Estudos prévios (dados não mostrados) de análise de safrol via injeção direta das amostras (1 μ l) em estudo em espectrômetro de tempo de voo, equipado com interface de ionização em matriz assistida por laser (MALDI-TOF), não lograram êxito em decorrência da não ionização do composto de forma satisfatória. A volatilização das amostras no sistema de injeção do cromatógrafo gasoso e a utilização de interface de ionização por impacto de elétrons mostrou-se como alternativa metodológica mais apropriada à análise deste fenilpropanóide, com a vantagem adicional de permitir a detecção e a identificação de outros componentes do metabolismo secundário de células de canela sassafrás, conforme descrito anteriormente (Figura 1a-c, Tabela 1). Estes dados demonstram que fontes mais brandas de ionização (MALDI) não induzem à formação de íons moleculares $[M^+]$, havendo a necessidade de utilização de interfaces de ionização mais potentes (70 eV) para a detecção dos compostos de interesse nas frações orgânicas ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 1:1) analisadas. De fato, a utilização da CG-EM parece ser a técnica preferida quando da análise dos componentes da fração óleo essencial de diversas espécies vegetais (Janssen, 1989; Onayade-Sontan, 1991; Setzer *et al.*, 1999; Barazani *et al.*, 1999; Povh *et al.*, 2001).

Ao longo do processo de seleção de linhagens de canela sassafrás (Oltamari, 1998), alguns somaclones apresentaram a capacidade de crescimento em meio de cultura MS desprovido de reguladores de crescimento. Este fenômeno, denominado habituação celular (Skirvin, 1978; Stafford, 1986; Skirvin *et al.*, 1994) é caracterizado por sua natureza epigenética, sendo considerado um exemplo da ocorrência de variação somaclonal em cultivos de células vegetais (Stafford, 1986; Scowcroft e Larkin, 1988; Skirvin *et al.*, 1994). Entre os diversos fatores determinantes da ocorrência deste fenômeno, a duração do período de cultivo de células ou tecidos e a suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento (2, 4-D, e.g.) têm sido apontadas por diversos autores (Karp, 1991; Linacero e Vázquez, 1993; Tremblay *et al.*, 1999). No caso específico dos cultivos celulares de canela sassafrás, especula-se que o efeito destes fatores pode ser significativo, considerando-se que alguns dos cultivos foram iniciados utilizando-se altas doses de auxinas e citocininas (2, 4-D, 6-BAP e KIN - 8 a 13 μM - dados não publicados) e têm sido mantidos por um período de tempo superior a 3 anos (> 30 gerações).

A análise dos metabólitos secundários por CG-EM na fração orgânica das culturas celulares autotróficas para os reguladores de crescimento (Experimento 2) revelou a existência de um perfil de composição semelhante ao observado para as culturas celulares em meio *CS₁*, após 20^o gerações de cultivo, exceto quanto à ocorrência de ácidos graxos com 13 e 16 átomos de carbono, com um peso molecular de 214 e 256, respectivamente (Figura 2). Estes resultados demonstram que a não suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento não afetou a capacidade de síntese de safrol da linhagem celular autotrófica, um aspecto de interesse devido à viabilidade do cultivo celular na ausência de compostos potencialmente mutagênicos. Esta abordagem corrobora, em alguma extensão, para reduzir a frequência de ocorrência de variantes nos cultivos *in vitro* e para o estabelecimento de um sistema de produção de safrol por via biotecnológica.

O uso de reguladores de crescimento, notadamente da classe das auxinas (2,4-D, por exemplo) tem sido determinante, em alguns casos, da redução ou da inibição da síntese de compostos de interesse farmacológico em cultivos celulares vegetais. A influência de reguladores de crescimento sobre a produção de metabólitos de interesse medicinal vem sendo estudada, por exemplo, em relação à produção de alcalóides em culturas de células de *Catharanthus roseus*. Os resultados demonstraram o efeito inibitório de auxinas sobre a produção de alcalóides, devido à inibição da transcrição de genes daquela via biossintética (van der Heijden, 1989; Whitmer *et al.*, 1998). A adição de ácido naftaleno acético (ANA) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) ao meio de cultura da linhagem transgênica S10 de *Catharanthus roseus* resultou em baixos níveis de acúmulo de alcalóides em um sistema de produção em dois estágios. Os cultivos mantidos em meio contendo 2,4-D evidenciaram uma pequena capacidade de fornecimento de precursores da via biossintética o que determinou um pequeno acúmulo de alcalóides ao longo da fase de produção. Adicionalmente, foi observado que a expressão do transgene que codifica para estrictosidina sintase (STR), avaliada a nível enzimático, foi reduzida em todas as condições analisadas naquele estudo, um resultado, por certo, não esperado (Whitmer *et al.*, 1998). Em função disto, a análise da estabilidade fenotípica da linhagem autotrófica de canela sassafrás, no que concerne à sua produtividade (ml safrol/g biomassa seca), é de importância para o estabelecimento de um sistema de produção *in vitro* de safrol tecnológica e comercialmente viável.

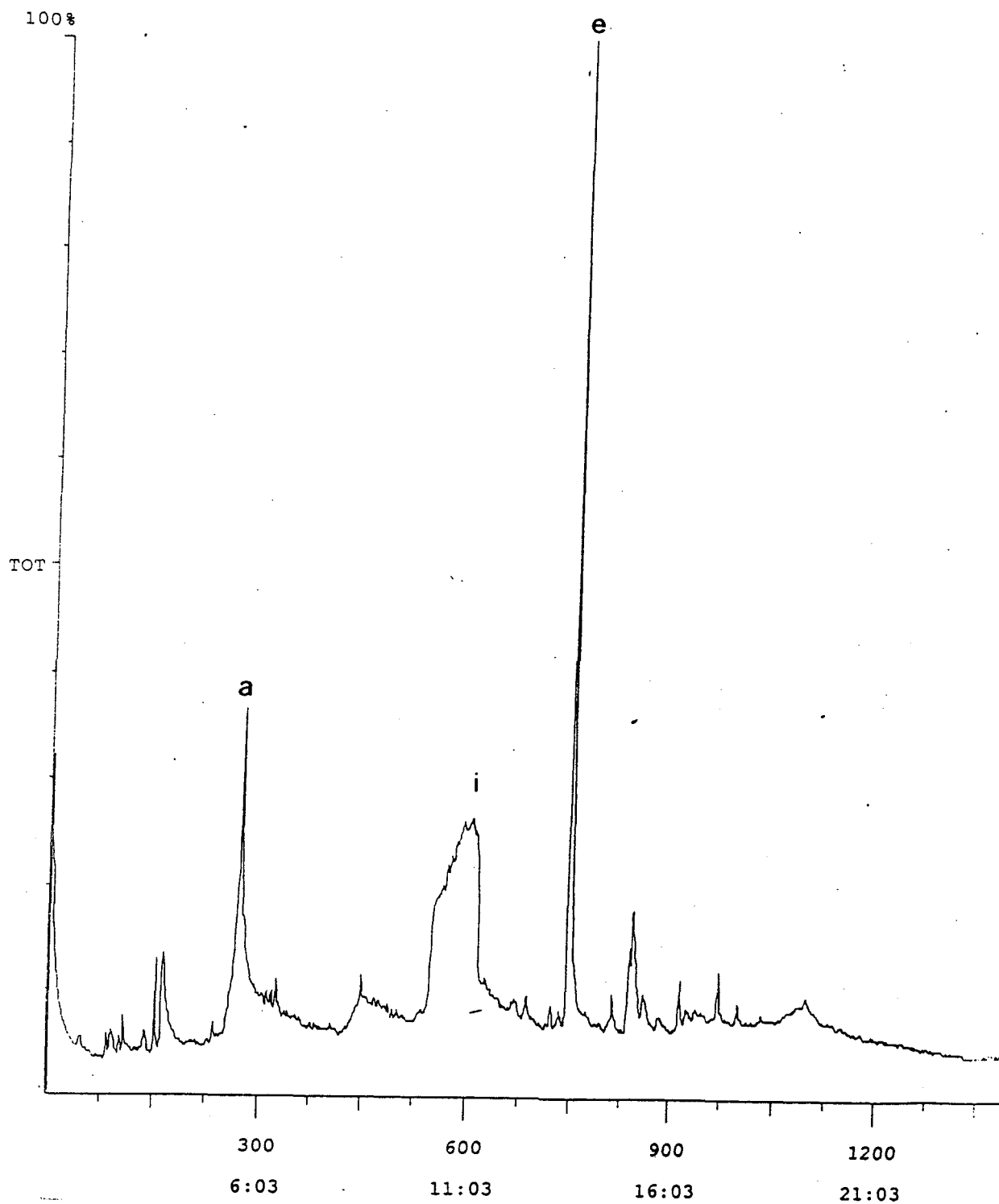


Figura 1 a -. Perfil cromatográfico da fração $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) de células de canela sassafrás mantidas em meio CS_7 na 13ª geração de cultivo. Indicações: a) Safrol [4 alil 1,2 metileno dioxibenzeno], $\text{PM} = 162$; e) Ácido graxo (C_{14}), $\text{PM} = 228$; i) Produtos de hidrólise de açúcares.

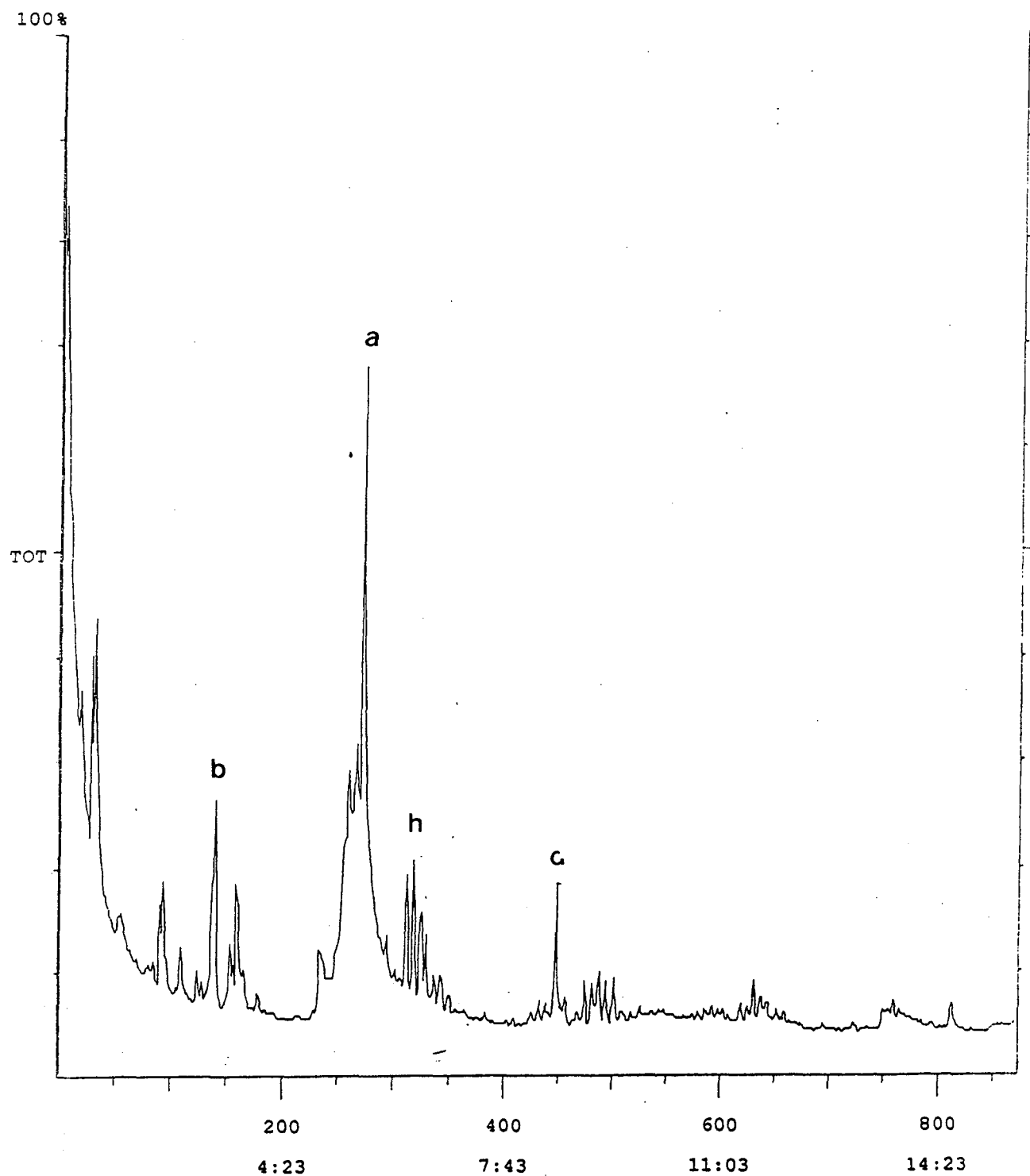


Figura 1 b -. Perfil cromatográfico da fração $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) de células de canela sassafrás mantidas em meio CS_7 na 16ª geração de cultivo. Indicações: a) Safrol [4 alil 1,2 metileno dioxibenzeno], $\text{PM} = 162$; b) Ciclopropano, 1-2 (metilbutil)-1-(1-metilpropil), $\text{PM} = 168$; c) Acilfenol (C_8), $\text{PM} = 206$; h) Hidrocarbonetos.

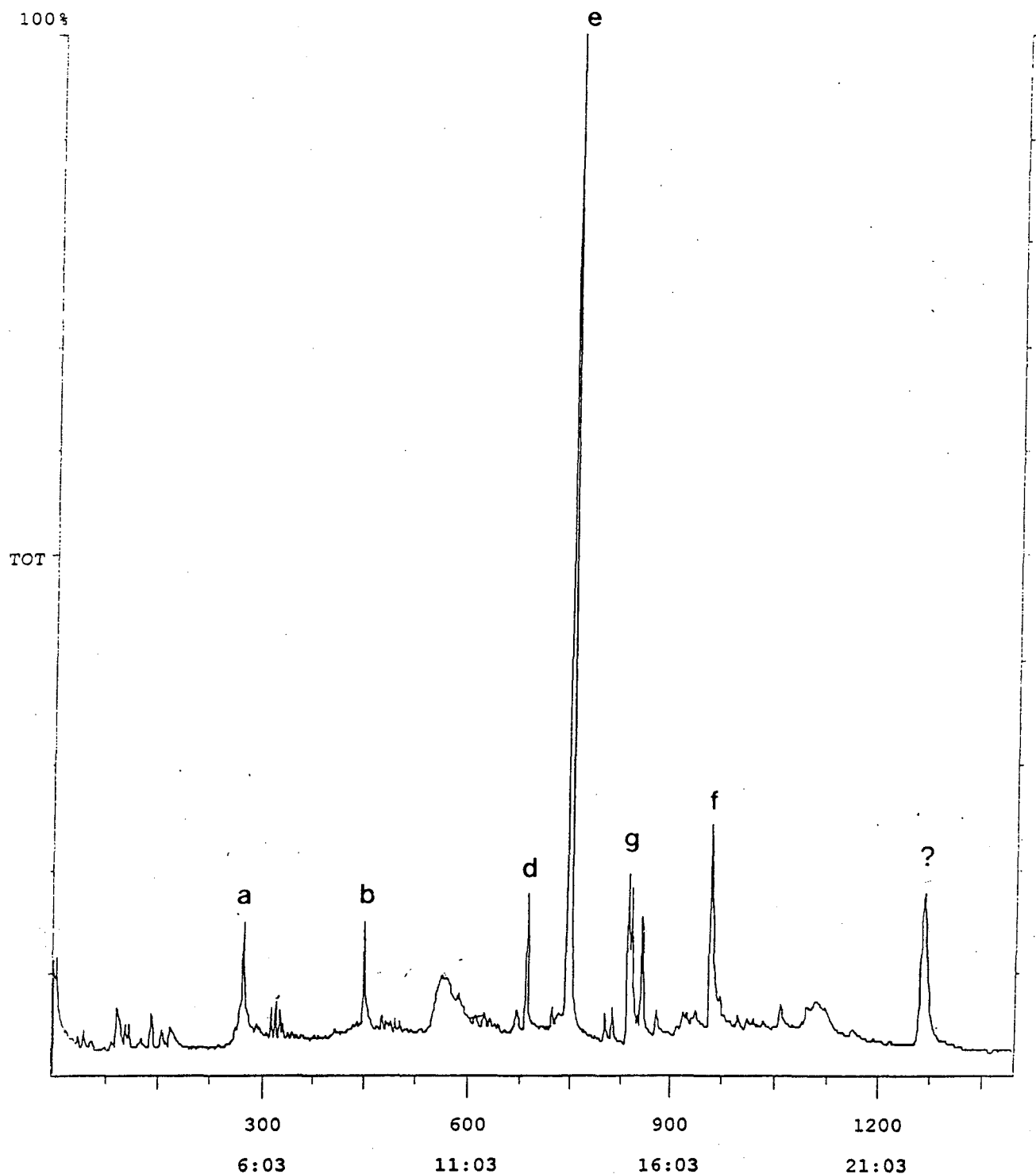


Figura 1 c - Perfil cromatográfico da fração $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) de células de canela sassafrás mantidas em meio CS_7 na 20ª geração de cultivo. **Indicações:** a) Safrol [4 alil 1,2 metileno dioxibenzeno], PM = 162; b) Ciclopropano, 1-2 (metilbutil)-1-(1-metilpropil), PM = 168; d) Ácido graxo (C_{13}), PM = 214; e) Ácido graxo (C_{14}), PM = 228; f) Ácido graxo (C_{16}), PM = 256; g) Olefina ou álcool superior.

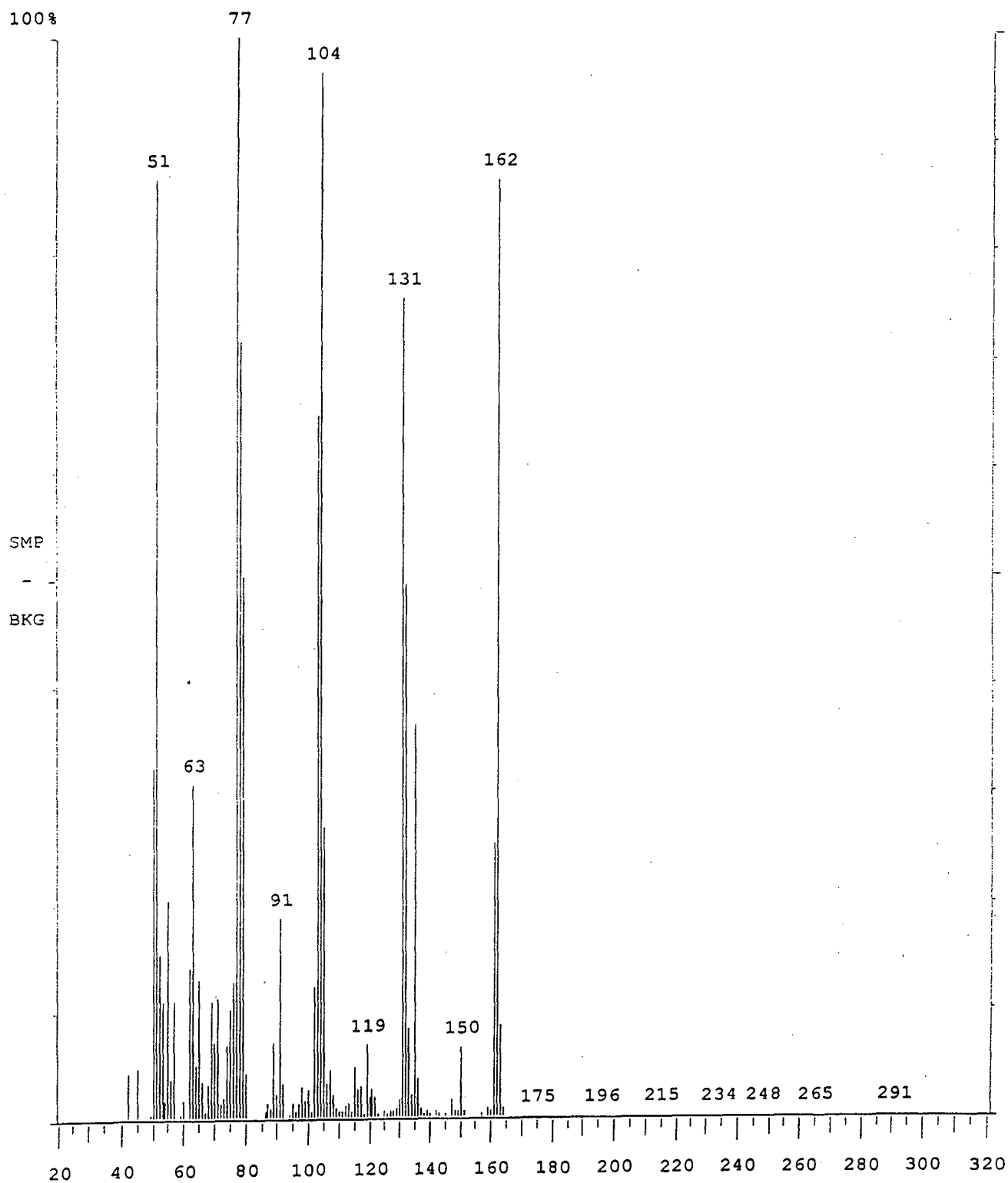


Figura 1 d -. Perfil cromatográfico do safrol [5-(2-Propenil)-1,3-benzodioxole].

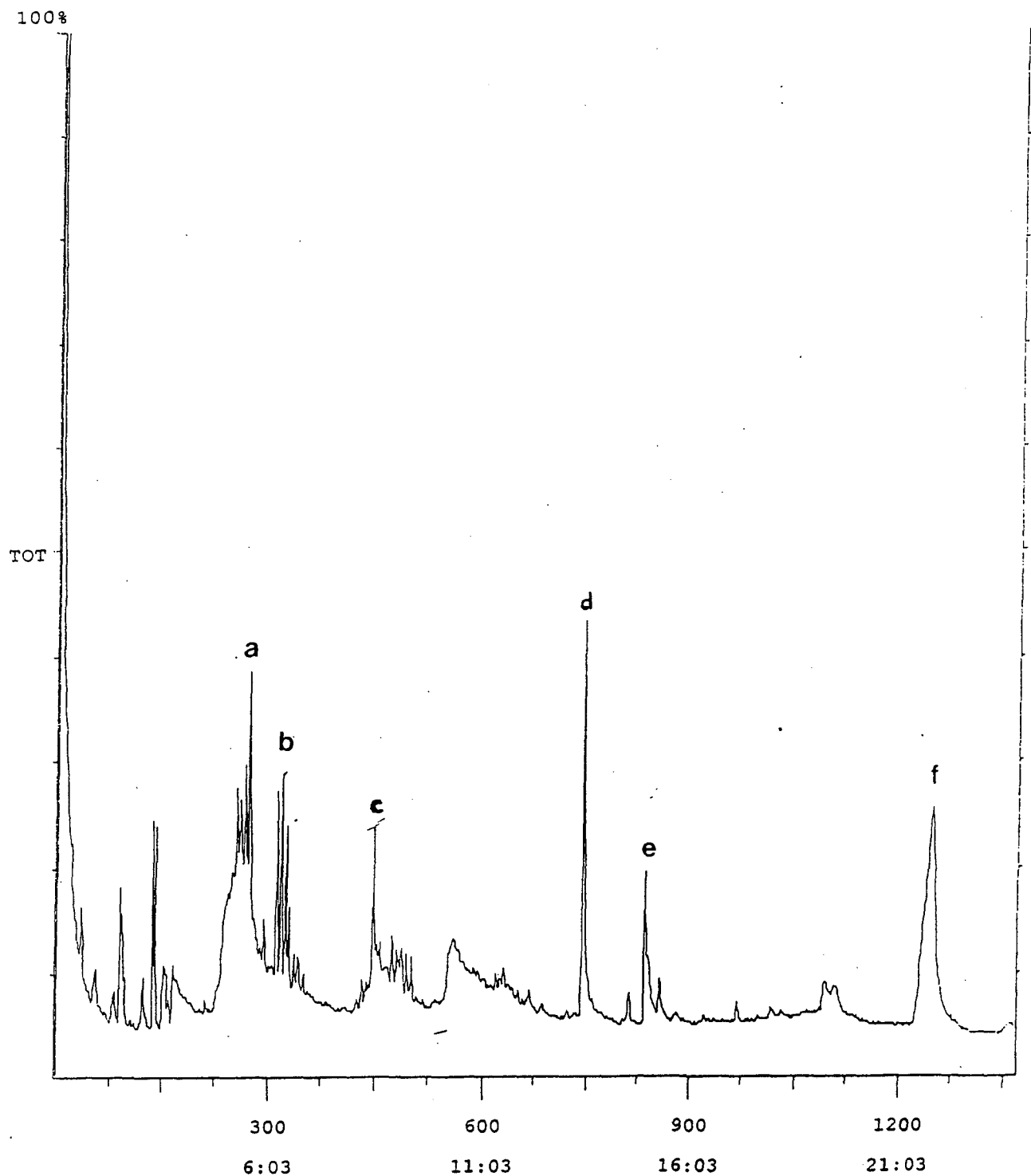


Figura 2. Perfil cromatográfico da fração $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) de células de canela sassafrás autotróficas para reguladores de crescimento (3ª geração), cultivadas em meio MS. **Indicações:** a) Safrol [4 alil 1,2 metileno dioxibenzeno], PM = 162; b) Ciclopropano, 1-2 (metilbutil)-1-(1-metilpropil), PM = 168; c) Acil-fenol (C_8), PM = 206; d) Ácido graxo (C_{13}), PM = 214; e) Ácido graxo (C_{14}), PM = 228; f) Ácido graxo (C_{16}), PM = 256.

CAPÍTULO VIII

DISCUSSÃO GERAL

O Estado de Santa Catarina foi, durante várias décadas, o maior exportador de óleo de sassafrás do Brasil. Contudo, poucos dados de órgãos governamentais foram encontrados referentes àquela atividade, notadamente no que se refere à quantidade de biomassa de canela sassafrás explorada nas décadas de 40 a 80, de modo que apenas estimativas puderam ser feitas a partir dos registros da literatura. A redução do volume de biomassa explorado alcançou seu auge no início na década de 90, devido à não sustentabilidade do modelo de produção utilizado (extrativismo), o qual foi determinante para que a espécie fosse levada a uma condição crítica de sobrevivência, com implicações significativas para a sua exploração comercial. O preço do óleo de sassafrás no mercado externo apresentou variação significativa, ao longo do período estudado (1942-1998), e os dados indicaram um crescente aumento do preço de safrol no mercado externo, uma provável consequência da escassez do produto no mercado, decorrente do sistema extrativista de produção, também utilizado nos principais países produtores.

Os métodos convencionais de propagação vegetativa (enraizamento de estacas, e.g.), dessa espécie não têm apresentado resultados satisfatórios e, em função disto, o desenvolvimento de métodos não convencionais de propagação, através da cultura de tecidos vegetais, é uma alternativa viável, na medida em que possibilita a obtenção de taxas de multiplicação maiores, permitindo a propagação em grande escala da espécie com valores de rendimento mais interessantes, especialmente quando se objetiva a reposição e preservação da espécie em seu ecossistema.

Outro fator limitante para a obtenção do óleo de sassafrás a partir do cultivo extensivo é o longo período para a produção desta biomassa, sendo estimada uma rotação mínima de 42 anos. Nesse caso, a produção de safrol por via biotecnológica pode ser uma alternativa, desde que os cultivos celulares apresentem produtividade

adequada. No entanto, a produção biotecnológica de compostos bioativos somente poderá competir com os processos agrícolas convencionais se os cultivos celulares apresentarem maior produtividade e a qualidade do produto final for superior. A análise da produtividade dos cultivos celulares encontra-se relacionada, entre outros fatores, à taxa de produção de biomassa e de biossíntese do(s) metabólito(s) de interesse na unidade de tempo (Schlatmann, 1995).

A análise do incremento de biomassa celular ao longo do período de cultivo, constitui-se em aspecto básico na avaliação da produtividade dos sistemas *in vitro*. O padrão de crescimento celular *in vitro* de canela sassafrás foi obtido através das análises de peso fresco, peso seco de células e determinação das curvas de dissimilação de carbono. Os estudos de dissimilação em culturas de células de canela sassafrás forneceram dados suficientes para caracterizar as fases de crescimento celular em meio de cultura semi-sólido suplementado com distintos reguladores de crescimento e fontes de carbono.

A fonte de carbono utilizada no meio de cultura, afeta, em alguns casos, a biossíntese *in vitro* de compostos bioativos. Tal aspecto decorre do fato de que as células cultivadas *in vitro* são usualmente heterotróficas quanto à capacidade de síntese de uma série de compostos via fotossíntese, em níveis adequados à manutenção dos processos de desenvolvimento. Por esta razão, se faz necessária a adição de carboidratos ao meio de cultura como fonte de carbono e energia (Maraschin e Verpoorte, 1999). A capacidade adaptativa celular à metabolização de distintos carboidratos, foi monitorada por ^1H -RMN. Os espectros de ^1H -RMN, possibilitaram a determinação direta da concentração de compostos em amostras de células de canela sassafrás. Tal abordagem tem permitido a comparação direta da concentração de compostos totalmente distintos, bem como a detecção de metabólitos secundários vegetais de interesse farmacológico em matrizes biológicas complexas por 1D ^1H -RMN (Schripsema e Verpoorte, 1991; Maraschin *et al.*, 2001, Wolfender *et al.*, 2001).

Maiores valores de produção de biomassa nos cultivos celulares de canela sassafrás, foram obtidos em meio de cultura acrescido de 0,5 μM de ANA, quando conforme demonstrado pelas análises de crescimento com base nas variáveis peso fresco e peso seco. No caso específico dos cultivos celulares desta espécie, estudos complementares são necessários, no que se refere à análise dos efeitos dos reguladores de crescimento sobre a síntese de safrol, de modo a se definir qual a combinação de reguladores de crescimento mais estimulatória da síntese desse fenilpropanóide.

Compostos que suplementam o meio de cultura, principalmente os reguladores de crescimento da classe das auxinas e citocininas, exercem influências sobre a taxa mitótica, o crescimento e a diferenciação celular. Estes compostos atuam conjunta e seqüencialmente, estimulando o processo mitótico com intensidades que são peculiares à espécie e/ou à linhagem celular. Da mesma forma, tais considerações se aplicam à ação destes compostos sobre o metabolismo secundário vegetal (George e Sherrington, 1984).

A identificação de linhagens autotróficas para os reguladores de crescimento é de interesse, porque evita sua exposição aos conhecidos efeitos mutagênicos daqueles compostos. No contexto tecnológico, por sua vez, esta condição traz implicações significativas, porque permite a utilização de um sistema de cultivo mais estável do ponto de vista fenotípico e reduz a possibilidade de perdas de linhagens altamente produtoras de safrol. Linhagem autotrófica de canela sassafrás, mantida em meio de cultura isento de reguladores de crescimento, apresentou capacidade de síntese de safrol ao longo do período de cultivo.

A variabilidade química mostrou-se crescente ao longo das gerações de cultivo, demonstrando o efeito do tempo de cultivo sobre a síntese de compostos do metabolismo secundário de canela sassafrás. Esta abordagem é de interesse, uma vez que permite monitorar o potencial biossintético (totipotência bioquímica – Zenk 1978), a uniformidade e a estabilidade do metabolismo secundário, parâmetros de significativa importância na análise da viabilidade de sistemas de produção *in vitro* de compostos bioativos. Entretanto, os dados demonstraram que a linhagem celular em estudo apresentou-se estável quanto à síntese de safrol.

CONCLUSÕES

- A exploração da canela sassafrás foi realizada durante mais de 40 anos de forma irrestrita. Este fato, aliado ao pouco conhecimento do manejo desta espécie e ao preço atrativo do óleo essencial e do safrol no mercado internacional, foram os principais agentes causadores de um extrativismo exacerbado no Estado de Santa Catarina, colocando esta espécie em perigo de extinção.
- A série histórica de dados de comercialização e preços dos produtos sugere a necessidade de readequação do setor, notadamente através da adoção de novas tecnologias que permitam a produção sob um sistema de manejo sustentado.
- A estratégia de utilização de técnicas biotecnológicas se mostrou viável no estudo de fenômenos morfogenéticos de *Ocotea odorifera*, permitindo o resgate de material seminífero através do cultivo *in vitro* de embriões imaturos.
- Um padrão de crescimento linear das culturas celulares foi obtido através das curvas de dissimilação de carbono, independente do carboidrato utilizado na suplementação do meio de cultura.
- As culturas celulares de *O. odorifera* apresentaram uma rápida resposta adaptativa do metabolismo celular para a metabolização de **Amd** e **Lac**.
- Os dados demonstram que a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) mostrou ser uma técnica viável no monitoramento do metabolismo de carboidratos intracelulares em culturas de células vegetais de *O. odorifera*.
- Os resultados obtidos por ¹H-RMN evidenciaram a existência de um equilíbrio intracelular de anômeros de **D-Glc**, independentemente da fonte de carbono utilizada nos cultivos *in vitro* de canela sassafrás, sugerindo que a metabolização destes monossacarídeos é um processo fortemente regulado.

- A análise dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ dos extratos aquosos de células mantidas em meio acrescido de **Lac** apresentaram sinais característicos de **Glc** ($\alpha\text{-D-Glc}$ e $\beta\text{-D-Glc}$) e de **D-Gal**, em relação aos seus padrões, demonstrando a existência de via(s) de absorção dos produtos de hidrólise enzimática da **Lac**. Os resultados demonstram uma rápida adaptação do metabolismo celular à suplementação do meio de cultura com **Lac**.
- A cinética de metabolização de sacarose nos cultivos celulares de canela sassafrás parece ser fortemente modulada pelo aporte exógeno da citocinina 6-BAP e da auxina ANA.
- A suplementação do meio de cultura com $0,5 \mu\text{M}$ de ANA é de interesse quando se buscam maiores valores de produção de biomassa nos cultivos celulares de canela sassafrás, conforme demonstrado pelas análises de crescimento com base nas variáveis peso fresco e peso seco.
- Uma correlação positiva entre os métodos de análise de crescimento peso fresco e peso seco foi observada nos experimentos.
- As curvas de dissimilação de carbono revelaram distintos perfis de incremento de biomassa (modelos sigmoidal, quadrático e linear), dependendo da combinação de reguladores de crescimento utilizada na suplementação do meio de cultura.
- Somaclones com comportamento autotrófico quanto à capacidade de síntese de promotores de crescimento foram observados em culturas celulares mantidas em meio isento de reguladores de crescimento.
- O acoplamento da espectrometria de massa à cromatografia gasosa permitiu a detecção e a identificação de uma série de compostos nas amostras em estudo, revelando o potencial desta técnica espectroscópica e a adequação da abordagem experimental utilizada.

- A análise dos dados de composição de metabólitos secundários das frações orgânicas dos cultivos celulares, revelou a existência de perfis distintos ao longo das gerações de cultivo. Entretanto, os dados demonstraram que a linhagem celular em estudo apresentou síntese de safrol em todas as gerações.
- Células mantidas em meio de cultura isento de reguladores de crescimento, apresentaram capacidade de síntese de safrol ao longo do período de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M.A.; ALI, M.A.; MARZIAH, M.; LAJIS, N.H.; ARIFF, A.B. - Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **54**: 173-182, 1998.
- AKALEZI, C.O.; LIU, S.; LI, Q.S.; YU, J.T.; ZHONG, J.J. - Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Process Biochemistry*, **34**: 639-642, 1999.
- ARAÚJO, P.S.; OLTRAMARI, A.C.; DUARTE da SILVA, J.M.O.; PASSOS, R.; VERPOORTE, R.; CARO, M.S.B.; MARASCHIN, M. - Cinética do metabolismo de carboidratos em sistemas de cultivos celulares de *Mandevilla velutina* por ¹H-RMN. In: *Anais do VIII Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear - I Encontro Luso-Brasileiro de Ressonância Magnética Nuclear*, AUREMN, Mangaratiba (RJ), 2001. p.225-226.
- ARAÚJO, P.S. - Engenharia do metabolismo em culturas de células de *Mandevilla velutina* (MART) WOODSON (*Apocynaceae*). Florianópolis, SC, 2001. (Dissertação de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais – Universidade Federal de Santa Catarina)
- ATTARD, E. - *Ecballium elaterium*: an in vitro source of cucurbitacins, *Fitoterapia*, **72**: 46-53, 2001.
- BARAZANI, O; FAIT, A; COHEN, Y; DIMINSHTEIN, S; RAVID, U; PUTIEVISKY, E; LEWINSOHN, E; FRIEDMAN, J. - Chemical variation among indigenous populations of *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* in Israel. *Planta Medica*, **65**: 486-489, 1999.
- BARREIRO, E.J. e FRAGA, C.A.M. - The utilization of the safrole, principal chemical constituent of sassafras oil, in the synthesis of compounds actives in the arachidonic acid cascade: Antiinflammatory, analgesic and antithrombotic. *Química Nova*, **22**:744-759, 1999.
- BERGER, R.G.; AKKAN, Z.; DRAWERT, F. - Catabolism of geraniol by cell suspension cultures of *Citrus limon*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1055**: 234-239, 1990.
- BOLTA, I.; BARI EVI, D.; BOHANEK, B.; ANDREN EK, S. - A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **62**: 57-63, 2000.
- BONFILL, M.; CUSIDÓ, R.M.; PALAZÓN, J.; PIÑOL, M.T.; MORALES, C. - Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **68**: 73-78, 2002.
- BÜRKLE, L.; HIBBERD, J.M.; QUICK, W.P.; KÜHN, C.; HIRNER, B.; FROMMER, W.B.

- The H⁺-sucrose co-transporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology*, **118**: 59-68, 1998.

BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ABDALA, R.V.; PIMENTEL, F.A.; SOUZA, J.A.; PEREIRA, M.V.G.; BERGTER, L.; GUIMARÃES, E.F. - Sarisam from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (long pepper). *Flavour and Fragrance Journal*, **16**: 113-115, 2001.

CARVALHO, P.E.R. - *Espécies florestais brasileiras recomendações: Silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas Florestais. Colombo: EMBRAPA - CNPF; Brasília - SPI, 1994. 640p.

CHANG, J.H., JOONG HAN SHIN, I.S.C.; JOO LEE, H. - Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*. *Biotechnology Letters*, **20**:1097-1099, 1998.

CHANG, J.H., JOONG HAN SHIN, I.S.C.; JOO LEE, H. - Improved menthol production using suspension cultures of *Mentha piperita* with pectinase elicitation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **9**:358-360, 1999.

CHIOU, T.J. e BUSH, D.R. - Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA, **95**: 4784-4788, 1998.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, FJA.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. - *Óleos essenciais de plantas do Nordeste*. Fortaleza, ed. UFC, 1981.

DUARTE DA SILVA, J.M.O; OLTRAMARI, A.C.; MARASCHIN, M.; PEDROTTI, E.L. - Cultura de embriões imaturos e organogênese. *Biotecnologia - Ciência e Desenvolvimento*, **20**: 44-48, 2001.

EARLE, E. D. e GRACEN, V. E. - Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue cultures. In: HENKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (eds.) - *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. New York, Plenum Press, 1984. p.139-152.

EILERT, U. - In: Vasil IM. Ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol.4. San Diego:Academic Press. p.153-164,1987.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) - Embrapa identifica pimenta que produz safrol. *Boletim semanal de divulgação científica*. Ano VI, 13 de novembro de 1998, 13p.

EVANS, D. A. e SHARP, W. R. - Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science*, **221**:949-951, 1983.

- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BRAVO, J. E. - Plant somaclonal variation and mutagenesis. *Nestlé Research News* 1986/87. Le Mont, Lausanne, Jean Genoud SA, 1987. p.63-71.
- FANG, Y; SMITH, M.A.L.; PÉPIN, M.F. - Benzyl adenine restores anthocyanin pigmentation in suspension cultures of wild *Vaccinium pahalae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **54** (2): 113-122, 1998.
- FREITAS, J.C.C. E BONAGAMBA, T.J. - *Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear*, Rio de Janeiro, Ed. AUREMN, 1999. 94p.
- FONTANEL, A.; TABATA, M. - Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects. *Nestlé Researches News*, 1987. p.69-75.
- FOWLER, M. W. E STEPAN-SARKISSIAN, G. - Carbohydrate source, biomass productivity and natural product yield in cell suspension cultures. In: NEUMANN, K. H. e REINHARD, E. (eds.). - *Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*, Springer-Verlag, Berlin, 1985. p.66-73.
- FUJITA, Y.; HARA, Y.; SUGA, C.; MORIMOTO, T. - Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports*, **1**: 61-63, 1981.
- FUJITA, Y. - Industrial production of shikonin and berberine. In : *Ciba Foundation Symposium, Application of plant cell and tissue culture*. New York, John Wiley and Sons, 1988. p.228-238.
- FUNK, C.; GUGLER, K.; BRODELIUS, P. - Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry*, **26**: 401-500, 1987.
- FURMANOWA, M.; GLOWNIAK, K.; SYKLOWSKA-BARANEK, K.; ZGÓRKA, Z.; JÓZEFczyk, A. - Effect of the picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **49**:75-79, 1997.
- GAHRTZ, M. e SAUER, N. - A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major*L. Supports the model of apoplastic phloem loading. *The Plant Journal*, **6**: 697-706, 1994.
- GEORGE, E. F. e SHERRINGTON, P. D. - *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press, Reading, Berks, 709p. 1984.

- HADI, M. Z. e BRIDGEN, M. P. - Somaclonal variation as a tool to develop pest resistance plants to *Torenia fournieri* "Compacta Blue". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **46**:43-50, 1996.
- HAY, C. A.; ANDERSON, L. A.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D. - Alkaloid production by plant cell cultures. In: ALAN, R.(ed.). - *Biotechnology in Agriculture*. London, Liss Inc, 1988. .p.97-140.
- HICKEY, M.J. - Investigation of the chemical constituents of Brazilian sassafrás oil. *J. Org. Chem.*, **13**: 443-446, 1948.
- HIRASUNA, J.T.; PESTCHANKER, L.J.; SRINIVASAN, V.; SHULER, M.L. - Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **44**: 95-102, 1996.
- HOEKSTRA, S.S.; HARKES, P.A.A.; LIBBENGA, K.R.; VERPOORTE, R. - Effect of auxin on cytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Chinchona ledgeriana*. *Plant Cell Reports*, **8**: 571-574, 1990.
- HOUGHTON, P.H.; RAMAN, A. - Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts, New York: Chapman e Hall, 1998.
- JANSSEN, A.M. - *Antimicrobial activities of essential oils - a pharmacognostical study*. Leiden, Netherlands, 1989. (Ph. D. Thesis - Leiden University)
- JAZIRI, M.; ZHIRI, A.; GUO, Y.W., DUPONT, J.P.; SHIMOMURA, K.; HAMADA, H.; VANHAELEN, M.; HOMÈS, J. - *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoides production: a literature survey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **46**: 59-75, 1996.
- KETCHUM, R.E.B. e GIBSON, D.M. - Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **46**: 9-16, 1996.
- KAMDEM, D.P.; GAGE, D.A. - Chemical composition of essential oil from the root bark of *Sassafras albidum*. *Planta Medica*, **61**: 574-575, 1995.
- KHANAM, N.; KHOO, C.; KHAN, A.G. - Effects of cytokinin/auxin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **62** (2): 125-133, 2000.
- KARP, A. - On the current understanding of somaclonal variation. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, **7**:1-58, 1991.
- KIERAN, P.M.; MACLOUGHLIN, P.F.; MALONE, D.M. - Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, **59**: 39-52, 1997.

- KIM, J. H.; YUN, J. H.; HWANG, Y. S.; BYUN, S. Y. & KIM, D. I. - Production of taxol and related taxanes in *Taxus brevifolia* cell cultures: effect of sugar. *Biotechnology Letters*, **17**: 101-106, 1995.
- KIM, I.S.; BARROW, K.D.; ROGERS, P.L. - Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to analysis of ethanol fermentation kinetics in yeasts and bacteria. *Biotechnology Letters*, **21**:839-848, 1999.
- KOTYK A. How to name various transport mechanisms and their vehicles. *Biochemical Education*, **25**: 86-87, 1997.
- KÜHN, C.; BARKER, L.; BÜRKLE L.; FROMMER, W.B. - Update on sucrose transport in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 935-953, 1999.
- LACEY, M.E.; SUBRAMANIAN, R.; OLSON, D.L.; WEBB, A.G.; SWEEDLER, J.V. - High-resolution NMR spectroscopy of sample volumes from 1 nL to 10 μ L. *Chemical Reviews*, **99**: 3133-3152, 1999.
- LALONDE, S.; BOLES, E.; HELLMANN, H.; BARKER, L.; PATRICK, J.W.; FROMMER, W.B.; WARD, M. - The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *The Plant Cell*, **11**:707-726, 1999.
- LEMOINE, R.; KÜHN, C.; THIELE, N.; DEIROT, S.; FROMMER, W.B. - Antisense inhibition of the sucrose transporter: Effects on amount of carrier and sucrose transport activity. *Plant Cell Environ*, **19**:1124-1131, 1996.
- LINACERO, R; VÁZQUEZ, AM. Somaclonal variation in rye. *Mutation Research*, **302**: 210-205, 1993.
- LIMBERG, M.; CRESS, D. E LARK, K. G. - Variants of soybean cells which can grow in suspension with maltose as a carbon-energy source. *Plant Physiology*, **63**:718-721, 1979.
- LLOYD, G. e MCCOWN, B. - Commercially-flasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, **30**: 421-427, 1980.
- LORDELLO, A.L.L. - Constituintes químicos de folhas e de cultura de células e tecidos de *Ocotea catharinensis* Mez (*Lauraceae*). São Paulo, SP, 1996. (Tese de doutorado - Universidade Federal de São Paulo).
- MADHAVI, D. L.; JUTHANGKON, S.; LEWEN, K.; BERBER-JIMENEZ, M. D.; SMITH, M. A. L. - Characterization of Anthocyanins from *Ajuga pyramidalis* Metallica Crispa Cell Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 1170-1176, 1996.

- MANTELL, S. H. e SMITH, H. - Cultural factor that influence secondary metabolites accumulations in plant cell and tissue cultures. In: SMITH, H. e MANTELL, S. H. (eds.). - *Plant Biotechnology*. Cambridge, Cambridge University Press, 1983. p.75-108.
- MARASCHIN, M; VERPOORTE, R. - Dissimilation curve as a tool for somaclonal variation analysis in *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) callus cultures.. In: *I Meeting on Medicinal Plants of Santa Catarina State*, UNISUL, Tubarão (SC), 1998. p. 37.
- MARASCHIN, M. - *Variação somaclonal, metabolismo de carbono e caracterização bioquímica e imunológica nos cultivos celulares de Mandevilla velutina (MART) WOODSON* (Apocynaceae). Curitiba, PR, 1998. (Tese de Doutorado em Ciências - Universidade Federal do Paraná).
- MARASCHIN, M. e VERPOORTE, R. - Engenharia do metabolismo secundário. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*, **10**: 24-28, 1999.
- MARASCHIN, M.; PASSOS, R.; ARAUJO, P.S.; OLTRAMARI, A.C.; DUARTE da SILVA, J.M.O.; DIAS, P.F.; FONTANA, J.D.; CARO, M.S.B. - Isolation and *trans*-resveratrol analysis in Brazilian red wines by ¹H nuclear magnetic resonance. *Royal Society of Chemistry – A (Math. and Physical Sciences)*, **1**: 136-141, 2001.
- MARASCHIN, M; VERPOORTE, R. - Engenharia do Metabolismo de Plantas Medicinais. In: YUNES, R.A. E CALIXTO J.B. - *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna* (eds), Chapecó, Argos Editora Universitária, 2001. p.381-434.
- MARASCHIN, M; VERPOORTE, R. - Aplicações da Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa na Análise de Metabólitos Secundários Vegetais em Biomedicina. In: YUNES, R.A. E CALIXTO J.B. - *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna* (eds), Chapecó, Argos Editora Universitária, 2001. p.147-193.
- MARETZKI, A. e THOM, M. - Characteristics of a galactose-adapted sugarcane cell line grown in suspension culture. *Plant Physiology*, **61**: 544-548, 1978.
- MOREL, G.M. e WETMORE, R.H. - Fern callus tissue culture. *Am. J. Botany*, **38**: 41-143, 1951.
- MOLINARI, O. L. - *A cultura da sassafrás (Ocotea pretiosa Mez.)*. Pelotas, RS, 1989. (Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Pelotas)
- MOORE, P. H. - Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. *Australian Journal of Plant Physiology*, **22**: 661-679, 1995.

- MOREIRA, F.M. - Avaliação morfo-fisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira 'Paulsen 110' *in vitro*. Florianópolis, SC, 2000. (Dissertação de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais – Universidade Federal de Santa Catarina)
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**:473-497, 1962.
- NOTEBORN, H.P.J.M.; LOMMEN, A.; WESEMAN, J.M. - Metabolism of transgenic food crops by ^1H -nuclear magnetic resonance. In: *Proc. Fifth International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food Science*. Aveiro-Portugal, 2001. p. 78.
- OKSMAN-CALDENTEY, K. M.; SEVÓN, N.; VANHALA, L. E HILTUNEN, R. - Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **38**:263-272, 1994.
- OLTRAMARI, A.C. - Estabelecimento de cultivos celulares de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.), análise de crescimento e caracterização citoquímica. Florianópolis, SC, 1998. (Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia - Universidade Federal de Santa Catarina)
- OLTRAMARI, A.C.; DUARTE da SILVA, J.M.O.; ARAUJO, P.S.; PASSOS, R.; PEDROTTI, EL; VERPOORTE, R; CARO, MSB; MARASCHIN, M. - Análise do metabolismo de glucose em linhagens celulares de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez.) por ^1H – RMN. In: *Anais VI Jornada Brasileira de Ressonância Magnética Nuclear*. Belo Horizonte (MG), AUREMN, **1**: 115-116, 2000.
- OLTRAMARI, A.C.; DUARTE da SILVA, J.M.O; VIANA, A.M.; ARAUJO, P.S; PASSOS, R.; PEDROTTI, E.L.; VERPOORTE, R.; CARO, M.S.B.; MARASCHIN, M. - Metabolismo de carboidratos em culturas de células de canela sassafrás (*Ocotea odorifera*) investigado por ^1H -RMN. In: *Anais do VIII Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear – I Encontro Luso-Brasileiro de Ressonância Magnética Nuclear*, AUREMN, Mangaratiba (RJ), 2001. p.105-106.
- OLTRAMARI, A.C.; DUARTE da SILVA, J.M.O.; PASSOS, R.; PEDROTTI, E.L.; MARASCHIN, M. Análise de crescimento e metabolismo de carbono em cultivos celulares de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). In: *Anais III Jornada Catarinense de Plantas Mediciniais*. Lages (SC), 2001. p.97.
- OLTRAMARI, A.C.; DUARTE da SILVA, J.M.O.; PEDROTTI, E.L.; MARASCHIN, M. Análise histórica e de mercado da atividade extrativista da madeira e do óleo essencial da canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer) no Estado de Santa Catarina. *Revista Árvore*, **26**:99-106, 2002.

- ONAYADE-SONTAN, A.O. - Analysis of the essential oils of some plants used in traditional medicine in Nigeria. Leiden, Netherlands, 1991. (Ph. D. Thesis - Leiden University)
- OHTA, S. e VERPOORTE, R. - Some accounts of variation (heterogeneity and/or instability) in secondary metabolites production by plant cell cultures. *Ann. Rep. Nat. Sci. Home Economics*, **32**: 9-23, 1992.
- PASSOS, R.; DALL'AGNOL, I.; DUARTE da SILVA, J.M.O.; DIAS, P.F.; OLTRAMARI, A.C.; ARAUJO, P.S.; CARO, M.S.B.; MARASCHIN, M. - Análise comparativa do perfil espectroscópico (UV/Visível e ^{13}C -RMN) de amostras de vinhos tintos produzidos no Sul do Brasil. In: *Anais Farmapólis 2000*. Florianópolis (SC), **1**: 98, 2000.
- PESCADOR, R.; ARAUJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G.; TAVARES, L.B.B. - Biotecnologia da *Piper hispidinervium* - Pimenta Longa. *Biotecnologia - Ciência e Desenvolvimento*, **15**: 18-23, 2000.
- PETIARD, V.; BAUBAULT, C.; BARIAUD, A.; HUTIN, M.; COURTOIS, D. - Studies on variability of plant tissue cultures for alkaloid production in *Catharanthus roseus* and *Papaver somniferum* callus cultures. *Nestlé Research News 1986/87*. Le Mont, Lausanne, Jean Genoud SA, p.117-120, 1987.
- POVH, N.P.; GARCIA, C.A.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELÈS, M.Á.A. Extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomila recutita* [L.] Rauschert) by steam distillation and extraction with organic solvents: a process design approach. *Braz. J. Medicinal Plants*, **4**: 1-8, 2001.
- REITZ, R.; KLEIN, RM; REIS, A. - *Projeto Madeira de Santa Catarina. Sellowia*, Itajaí, 1978. 320p.
- REIL, G. e BERGER, R.G. - Elicitation of volatile compounds in photomixotrophic cell culture of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **46**:131-136, 1996.
- RIESMEIER, J.; WILLMITZER, L.; FROMMER, W.B. - Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal*, **11**: 4705-4713, 1992.
- RIESMEIER, J.; HIRNER, B.; FROMMER, W.B. - Potato sucrose transporter expression in minor veins indicate a role in phloem loading. *The Plant Cell*, **5**: 1591-1598, 1993.
- ROBERTS, J.K.M.; RAY, P.M.; WADE-JARDETZKY, N.; JARDETZKY, O. - Estimation of cytoplasmic and vacuolar pH in higher plant cells by ^{31}P NMR. *Nature*, **283**: 870-872, 1980.

- ROBERTS, J.K.M. e JARDETZKY, O. - Monitoring of celular metabolism by NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, **639**: 53-76, 1981.
- ROOK, F.; GRRITS, N.; KORTSTEE, A.; van KAMPEN, M.; BORRIAS, M.; WIESBEEK, P.; SMEEKENS, S. - Sucurose-specific signaling represses translation of the *Arabidopsis* ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal For Cell and Molecular Biology*, **15**:253-263, 1998.
- SACCHI, R. - High resolution NMR of virgin olive oil. *Royal Society of Chemistry – A (Math. and Physical Sciences)*, Cambridge, **1**: 213-226, 2001.
- SAKITA, M.N.; YATAGAI, M. - Óleo essencial da casca de *Ocotea catharinensis* Mez. (*Lauraceae*). Anais do Congresso Nacional sobre Essências Florestais Nativas, **2**:684-687, 1992.
- SALOMÃO, A. N., BRANDÃO, J.E.M., SILVA, J.A. - Distribuição geográfica de seis espécies florestais como subsídio para a escolha de conservação "in situ". In: *Congresso Nacional Sobre Essências Nativas*, 2, 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p. 1237-1240. Publicado na Revista do Instituto Florestal, v.4, parte 4, edição especial, 1992.
- SATO, F.; YAMADA, Y. High berberine producing cultures of *Coptis japonica* cells. *Phytochemistry*, **23**:281-285, 1984.
- SCHLATMANN, JE. - Ajmalicine production by *Catharanthus roseus* . Process operation and modelling, 1995. (Ph.D. Thesis - Technische Universiteit Delft)
- SCHMITT, B. e SCHNEIDER, B. - Phenylpropanoid interconversion in *Anigozanthos preissii* observed by high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochemistry Analysis*, **12**: 43- 47, 2001.
- SCHRIPSEMA, J. - *Factors involved in the alkaloid production of Tabernaemontana divaricata plant cell suspension cultures*. Leiden, Netherlands, 1991. (Ph. D. Thesis - Leiden University)
- SCHRIPSEMA, J. e VERPOORTE, R. - Investigation of extracts of plant cell cultures by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochemical Analysis.*, **2**: 155-162, 1991.
- SCHRIPSEMA, J; ERKENLENS, C.; VERPOORTE, R. - Intra- and extracellular carbohydrates in plant cell cultures investigated by ¹H-RMN. *Plant Cell Report*, **9**: 527-530, 1991.
- SCHRIPSEMA, J. e VERPOORTE, R. - Search for factors related to the indole alkaloid production un cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata*. *Planta Médica*,

.58: 245-249, 1992.

- SCOWCROFT, W. R. e LARKIN, P. J. - Somaclonal variation. In : *Applications of Plant Cell and Tissue Culture*. Ciba Foundation Symposium 137, Chichester, John Wiley & Sons, 1988. p. 21-35.
- SETZER, W.N.; SETZER, M.; MORIARITY, D.M.; BATES, R.B.; HABER, W.A. - Biological activity of the essential oil of *Myrcianthes* sp. nov. "Black Fruit" from Monteverde, Costa Rica. *Planta Medica*, **65**: 468-469, 1991.
- SHEPARD, J. F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. - Potato protoplast in crop improvement. *Science*, **28**: 17-24, 1980.
- SIERRA, M. I. - Aspects of indole alkaloid accumulation in *Tabernaemontana* tissues cultures : differentiation, peroxidases and stability. Leiden, Netherlands, 1991. (Ph. D. Thesis - Leiden University)
- SILVA, J.L.N. -Estudo sintético de derivados do óleo de sassafrás. Florianópolis, Santa Catarina, 1987. (Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina).
- SKIRVIN, R.M. - Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica*, **27**: 241-266, 1978.
- SKIRVIN, R.M.; MCPHEETERS K.D.; NORTON, M. - Sources of frequency of somaclonal variation. *Hortscience*, **29**: 1232-1237, 1994.
- SMEEKENS, S. e ROOK, F. – Sugar sensing and sugar mediated signal transduction in plants. *Plant Physiology*, **115**: 7-13, 1997.
- SMITH, S. M. e STREET, H. E. The decline of the embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann. Bot.*, **38**: 233-241, 1974.
- SMITH, J. I.; QUESNEL, A. A., SMART, N. J.; MISAWA, M. - The development of a single-stage growth and indole alkaloid production medium for *Catharanthus roseus* (L.) G. Don suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, **9**: 466-469, 1987.
- STABA, E. J. - *Plant Tissue Cultures as a Source of Biochemicals*. Boca Raton, USA, CRC Press, 1980. 285p.
- STAFFORD, A. - Genetic basis of instability in cell cultures. In : MORRIS, P.; SCRAAG, A. H.; STAFFORD, A.; FOWLER, M. W. (eds.). - *Secondary Metabolism in Plant Cell Culture*. Cambridge, Cambridge University Press, 1986. p.219-223.
- STAFFORD, A. Genetics of cultured plant cells. In : MORRIS, P.; SCRAAG, A. H.; STAFFORD, A.; FOWLER, M. W. (eds.), *Secondary Metabolism in Plant Cell Culture*, Cambridge, Cambridge University Press, 1986. p. 25-47.

- STAFFORD, A. e WARREN, A. - Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. In: Stafford, A. (ed.). - *Plant Cell in Tissue Culture*. England, John Wiley e Sons, 1991. p.124-161.
- STEPAN-SARKISSIAN, G. e FOWLER, MW. - The metabolism and utilization of carbohydrates by suspension cultures of plant cells. In: MORGAN, M.J. (ed.). - *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells*. New York, Plenum Press, 1986. p.151-181.
- SUZUKI H.; MATSUMOTO, T.; MIKAMI, Y. - Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones by *Rubia cordifolia* plant cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 603-610, 1984.
- TABATA, M.; OGINO, T.; YOSHIOKA, K.; YOSHIKAWA, N.; HIRAOKA, N. - Selection of cell lines with higher yield of secondary products. In: THORPE, T. A. (ed.). - *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Calgary, Alberta, University of Calgary, 1978. p.213-222.
- TAM, N.T.; NA, H.L.; MUSELLI, A.; BIGHELLI, A.; CASANOVA, J. - Essential oil of an unidentified *Illicium* species from Ninh Binh Province, Vietnam. *Flavour and Fragrance Journal*, **13**: 393-396, 1998.
- TOWERS, G.H.N.; ELLIS, S. - Secondary metabolism in plant tissue cultures transformed with *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenesis*. In: KINGHORN, A.D. e BALANDRIN, M.F. (eds.). - *Human Medicinal Agents from Plants*. Washington, DC, 1993.
- TREMBLAY, L.; LEVASSEUR, C.; TREMBLAY, F.M. - Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*P. glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *American Journal of Botany*, **86**: 1373-1381, 1999.
- van der HEIJDEN, R. *Indole alkaloids in cell and tissue cultures of Tabernaemontana species*. Leiden, Netherlands, 1989. (Ph. D. Thesis - Leiden University)
- VERPOORTE, R. - The production of plant secondary metabolites. In: DEKKERS, J.J.; PLAS, H.C. van der e VUIJK, D.H. (eds.). - *Agricultural Biotechnology in focus in the Netherlands*. Pudoc, Wageningen, 1990. p.1-16.
- VERPOORTE, R.; SCHRIJPEMA, J.; MEIJER, A.H.; van IREN, F.; ten HOOPEN, H.J.G. - Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **22**: 55-64, 1991.

- VERPOORTE, R. - Plant Cell Biotechnological Research in the Netherlands. In: DICOSMO, F. e MISAWA, M. (eds.). - *Plant Cell Culture Secondary Metabolism – Toward Industrial Application*. Netherlands, CRC Press, 1996. p.203-228.
- VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MORENO, P.R.H. - Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. In: CORDELL, G.A. (ed.). - *The Alkaloids*. San Diego, Academic Press, 49: 221-299, 1997.
- VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; TEM HOOPEN, H.J.G.; MEMELINK, J. - Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21: 467-479, 1999.
- VERPOORTE, R. - Secondary Metabolism. In: VERPOORTE, R. e ALFERMANN, A.W. (eds.) - *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 2000. p.1-29.
- VERPOORTE, R e MARASCHIN, M. - Engenharia do Metabolismo de Plantas Mediciniais. In: YUNES, R.A. e CALIXTO J.B.(eds.). - *Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó, Argos Editora Universitária, 2001. p.381-432.
- VUKE, T. M. e MOTT, R. L. - Grow of loblolly pine callus on a variety of carbohydrate sources. *Plant Cell Report*, 6: 153-156, 1987.
- WESTGATE, P. J.; EMERY, A. H.; HASEGAWA, P. M.; HEINSTEIN, P. F. - Growth of *Cephalotaxus harringtonia* plant-cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 798-803, 1991.
- WHITMER, S.; VERPOORTE, R.; CANEL, C. - Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53:135-141, 1998.
- WIJNSMA, R. - Anthraquinones and alkaloids in cell and tissue cultures of *Cinchona* species. Leiden, Netherlands, 1986. (Ph. D. Thesis - Leiden University)
- WINK, M. - The cell culture medium - a functional extracellular compartment of suspension-cultured cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 307-319, 1994.
- WITHERS, L. A. - Germoplasm storage in plant biotechnology. In: MANTELL, S. H. e SMITH, H. (eds.). - *Plant Biotechnology*. Cambridge, Cambridge University Press, 1983. p.187-218.
- WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. - The potential of LC-NMR in *Phytochemical Analysis*, 12: 2-22, 2001.

- WU, J. e HO, K. - Assessment of various carbon sources and nutrient feeding strategies for *Panax ginseng* cell culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **82**: 17-26, 1999.
- YAMAMOTO, Y.; MIZUGUCHI, R.; YAMADA, Y. - Selection of high and stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia milli* cells. *Theoret. Appl. Genet.*, **61**: 113-116, 1982.
- YOKOHAMA, R.; HIROSE, T.; FUJII, N.; ASPURIA, E.T.; KATO, A.; UCHIMIYA, H. The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.*, **244**: 15-22, 1997.
- ZENK, M. H.; EL-SHAGI, H & SCHULTE, U. - Antraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica* (Suppl.), p. 79-101, 1975.
- ZENK, M. H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STÖCKIGT, J.; WEILER, E. W. E DEUS, B. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: BARZ, W.; REINHARD, E. e ZENK, M. H. (eds.). - *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications*. Springer-verlag, Berlin, 1977. p.27-32.
- ZENK, M.H. - The impact of plant cell culture on industry. In: Thorpe, T. A. (ed.), *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Calgary, Calgary University, 1978. p.1-13.
- ZHANG, W.; BAI, X.; BU, Z.; WANG, J.; YU, X.; YUAN, Q. - Enhanced production of harringtonine and homoharringtonine in *Cephalotaxus fortunei* callus culture by periodic temperature oscillation. *Biotechnology Letters*, **20**: 63-66, 1998.