

**PRODUÇÃO DE METABOLITOS DE STRESS POR
CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE
ONONIS NATRIX L. SSP. *RAMOSISSIMA* E
HYOSCYAMUS ALBUS L.**



Maria da Graça Costa Miguel

Dissertação apresentada à Universidade do Algarve para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica Vegetal (Biotecnologia Vegetal)

FARO - 1994

Declaração

Na presente dissertação incluem-se resultados que foram alvo de publicação em colaboração com José G. Barroso.

Para efeitos do disposto nos Artigos 17^o e seguintes do Dec-Lei 216/92, de 13 de Outubro, a autora da dissertação declara que interveio na concepção e execução do trabalho experimental, na interpretação dos resultados e na redacção dos manuscritos enviados para publicação.

Faro, Março de 1994

Maria da Graça Costa Miguel

Ao Cláudio,
Ao Emílio,
À memória do meu pai

AGRADECIMENTOS

A todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, possibilitaram a feitura deste trabalho, desde já, um "muito obrigada", pois constituíram-se, sem dúvida, igualmente fundamentais e valiosos. Passo, então, a citar:

Ao orientador, Professor Doutor José Manuel Gonçalves Barroso, da Faculdade de Ciências de Lisboa, quero expressar o meu sincero agradecimento pela orientação científica, apoio e, bem assim, pelas condições materiais postas à disposição, sem os quais este trabalho teria sido inglório. Agradeço-lhe, ainda, todas as sugestões colocadas ao longo da escrita desta tese, bem como, a revisão cuidada, exigente e paciente do mesmo. Ao professor José Barroso quero agradecer, ainda, todos os conhecimentos de âmbito científico, que me transmitiu, ao longo de todos estes anos de trabalho, bem como a disponibilidade que sempre demonstrou perante as minhas dúvidas, que não eram poucas.

À Professora Doutora M. Salomé Pais, da Faculdade de Ciências de Lisboa, quero expressar o meu agradecimento pelo acolhimento na sua Secção, desde os tempos do Mestrado, e pela confiança que me disponibilizou desde então.

À Professora Doutora Helena Margarida Nunes Pereira, quero agradecer a sua disponibilidade e interesse sempre demonstradas, durante os primeiros dois anos deste trabalho, não só na Universidade do Algarve, onde foi minha responsável interna, como ainda, no Instituto Superior de Agronomia, cujos ensaios de HPLC, na determinação dos açúcares, teria sido impossível sem o seu aval, mesmo depois daquele período.

À Professora Doutora Deborah Mary Power, da Universidade do Algarve, minha responsável interna, uma palavra de agradecimento pelo apoio, disponibilidade e interesse manifestado por este trabalho. Cabe-me, ainda, agradecer-lhe a preciosa ajuda a outros níveis, nomeadamente preparação de aulas, equipamento e parte burocrática, e sem as quais a realização desta tese teria sido mais difícil.

Ao Professor Doutor Abílio Marques da Silva, da Universidade do Algarve, tenho a agradecer a confiança e apoio sempre demonstrados desde que entrei para esta casa. Agradeço, ainda, a disponibilidade de algumas condições materiais, sem as quais a realização deste trabalho teria sido, sem dúvida, bem mais difícil.

Igualmente ao Professor Doutor Eugénio de Araújo Faria, da Universidade do Algarve, tenho uma palavra de apreço pelo incentivo, que sempre me deu, neste trabalho.

Às minhas colegas Mestre Emília Costa, Eng. Leonor Faleiro e Dra. Conceição Mateus, da Universidade do Algarve, vai uma palavra de gratidão pelo bom ambiente de trabalho e companheirismo destes anos.

À Doutora Ana Cristina da Silva Figueiredo, um "obrigada" muito especial, e este agradecimento reporta à altura em que, sem ter tido, ainda, a disciplina de "Cultura de Células Vegetais", no Mestrado, me propus a trabalhar nesta área. Esta palavra de gratidão muito especial vem, então, desde aí, pela total disponibilidade demonstrada na orientação, no ensinamento, na sugestão, na crítica dos mais diversos trabalhos, e quase sempre sem contrapartida alguma.

À Mestre Isabel Miranda, do Instituto Superior de Agronomia, quero agradecer as facilidades e o apoio manifestados sempre que era solicitada, durante a determinação dos açúcares por HPLC.

Tenho, ainda, a agradecer ao Professor Gayland Spencer, do United States Department of Agriculture, USA, pela cedência pronta da amostra autêntica de medicarpina, e bem assim ao Professor W. Barz, da Westfälische Wilhelms-Universität, Alemanha, pela cedência da amostra autêntica de maackiaina. À Doutora. Susane McCormick, do National Center for Agricultural Utilization Research, USA, agradeço igualmente a cedência das amostras autênticas de lubimina e 10-*epilubimina*.

Ao Prof. Dr. J. J. C. Scheffer, da Division of Pharmacognosy, Leiden / Amsterdam Center for Drug Research, Leiden University, Gorleans Laboratories, quero agradecer as facilidades concedidas na utilização do equipamento de NMR.

Ao Doutor Jan Schripsema, da Division of Pharmacognosy, Leiden / Amsterdam Center for Drug Research, Leiden University, Gorleans Laboratories, desejo agradecer as análises de espectrometria de ressonância magnética nuclear de próton dos compostos isolados neste trabalho.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica desejo agradecer o apoio financeiro (contrato de investigação PMCT/BIO/901/90). Quero também agradecer ao extinto Instituto Nacional de Investigação Científica a cedência da Bolsa de Estudo para Doutoramento no País (Proc. n.º. 29010). Sem o apoio financeiro das Instituições atrás referidas teria sido impossível a realização deste trabalho.

Agradeço, ainda, aos Conselhos Científicos da Unidade de Ciências Exactas e Humanas e Unidade das Ciências e Tecnologias Agrárias pelo parecer favorável ao meu pedido de intenção de doutoramento e bem assim a dispensa de serviço concedida por esta última Unidade, durante uma parte do trabalho, o que facilitou a realização atempada deste manuscrito.

Aos funcionários da Secção de Biologia Celular e Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências de Lisboa, muito em particular a D. Mariana, Lurdes e Sr. Francisco, e bem assim a D. Guilhermina, Júlia e D. Teresa, da Universidade do

Algarve, manifesto todo o meu reconhecimento pela simpatia e disponibilidade que sempre me dedicaram.

É com um carinho muito especial que quero agradecer à minha amiga e colega Mestre Ana Pintão todos os conselhos, companheirismo e paciência com que sempre me brindou, desde os tempos do Mestrado.

Aos meus sogros desejo expressar toda a minha gratidão por todas as ajudas que me facultaram, desde os tempos do meu curso de Licenciatura, e sem as quais muitas das etapas da minha vida teriam sido impossíveis de concretizar.

Ao meu marido, Emílio Matias, um "muito obrigada" por toda a disponibilidade que sempre demonstrou ao longo de todos estes anos, desde o recolher de amostras e o de fazer pesagens pela madrugada dentro, enquanto eu estava ausente na Universidade do Algarve, até aos ensinamentos que me ministrou no âmbito da Informática. Contudo, estes aspectos são comezinhos quando comparados com o todo o apoio e paciência com que sempre me brindou, e na certeza, porém, que teria sempre um amigo a meu lado com o qual poderia contar nos momentos mais periclitantes da minha vida.

Para o meu filho Cláudio não há palavras que possam descrever a minha gratidão pela sua ternura, compreensão e carinho, desde os tempos de pequenino em que dizia que a mãe andava na "2ª classe das flores" e não compreendia muito bem por que razão, sendo a mãe professora no Algarve, tinha de se ausentar para ser aluna em Lisboa, até agora, em que passou dias e dias fechado em bibliotecas e laboratórios aguardando, pacientemente, que eu terminasse os meus trabalhos. Para ele um "muito obrigada".

ABREVIATURAS

- μA - Microampere
 $\mu\text{E.m-2.s-1}$ - Micro Einstein por metro quadrado, por segundo
 μg - Micrograma
 μl - microlitro
 μm - Micrómetro
 $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{CN}+\text{H}_3\text{PO}_4}$ - Comprimento de onda máximo verificado em acetonitrilo e ácido fosfórico
 $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ - Comprimento de onda máximo verificado em metanol
% - Percentagem
 $^{\circ}\text{C}$ - Grau Celsius
 $^1\text{H-NMR}$ - Ressonância magnética nuclear de próton
2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
a. C. - antes de Cristo
Ác. - Ácido
AÇU. - Açúcar
atm - Atmosfera
ax - Axial
B5 - Meio de cultura Gamborg *et al.* (1968)
BA - Benziladenina
BSTFA - N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
 CDCl_3 - Clorofórmio deuterado
cm/s - Centímetro/segundo
cm - Centímetro
CoA - Coenzima A
d. i. - Diâmetro interno
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Etilenodiaminotetracético
eq - Equatorial
eV - Electrão volt
FDA - Diacetato de fluoresceína
Fig. - Figura
FPP - Farnesilopirofosfato
FRU: - Frutose
g/l - Grama/litro
g - Força gravitacional
g - Grama
GC-MS - Cromatografia gás-líquido acoplado a espectrometria de massa
GC - Cromatografia gás-líquido
GLU. - Glucose
h - Hora
HMDS - Hexametildisilano
HPLC - "High performance liquid chromatography" (Cromatografia líquida de alta eficiência)
Hz - Hertz
IBA - Ácido indolbutírico
IPP - Isopentenilopirofosfato
Kin - Cinetina
 m/z - Relação massa / carga
M - Molar
mbar - Milibar

mg/ml - Miligrama/militro
MHz - Megahertz
min - Minuto
mm - Milímetros
mM - Milimolar
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
MS - Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)
MVA - Ácido mevalônico
NAA - Ácido naftalenoacético
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
nm - Nanómetro
(o) - ombro
OPP - Pirofosfato
p. f. - peso fresco
p. s. - Peso seco
p/v - Peso/volume
Pág. - Página
ppm - Parte por milhão
rpm - Rotações por minuto
s - Segundo
SAC. - Sacarose
SH - Meio de cultura Schenk e Hildebrandt (1972)
td - Tempo de duplicação
THF - Tetrahydrofurano anidro
TLC - Cromatografia em camada delgada
TMCS - Trimetilclorosilano
TMS - Tetrametilsilano
u.m.a. - Unidade de massa atômica
UDP-glucose - Uridina difosfato-glucose
UV-VIS - Ultravioleta-Visível
UV - Ultravioleta
v/v - Volume/volume

ÍNDICE

<i>A. A Cultura de Células Vegetais: Aspectos gerais. Objectivos do Trabalho</i>	1
I. ASPECTOS GERAIS	2
1.1. <u>IMPORTÂNCIA DO REINO VEGETAL NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS</u>	2
1.2. <u>CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS E SEU INTERESSE NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS</u>	3
1.3. <u>VIAS PARA UMA PRODUÇÃO OPTIMIZADA DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS</u>	5
1.3.1. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA	6
1.3.1.1. Factores físicos	6
1.3.1.2. Composição do meio e regulação hormonal	8
1.3.2. ADIÇÃO DE PRECURSORES	9
1.3.3. SELECÇÃO DE LINHAS CELULARES	11
1.3.4. SELECÇÃO DE LINHAS MUTANTES	12
1.3.5. DIFERENCIAÇÃO	13
1.3.6. IMOBILIZAÇÃO	13
1.3.7. TRANSFORMAÇÃO	14
1.3.8. MICROPROPAGAÇÃO	15
1.3.9. "TWO-PHASE CULTURE"	15
1.3.10. ELICITAÇÃO	17
1.4. <u>OBJECTIVOS DO TRABALHO</u>	19
<i>B. Ononis Natrix: Aspectos Gerais, Estudo da Influência de Diversos Factores no Crescimento das Culturas de Células em Suspensão e na Acumulação de Medicarpina e Maackiaina</i>	21
I. INTRODUÇÃO	22
1.1. <u>CARACTERÍSTICAS GERAIS, DISTRIBUIÇÃO E UTILIZAÇÃO</u>	22
1.2. <u>A ACUMULAÇÃO DE FITOALEXINAS NA FAMÍLIA LEGUMINOSAE</u>	22
II. MATERIAL E MÉTODOS	26
1. MATERIAL	26
1.1. <u>MATERIAL BIOLÓGICO</u>	26
1.2. <u>REAGENTES E SOLVENTES</u>	26
2. MÉTODOS	26
2.1. <u>OBTENÇÃO DE CALLI E DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO</u>	26
2.1.1. GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>ONONIS NATRIX</i>	26
2.1.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE <i>CALLI</i>	27

2.1.3. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	27
2.1.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	29
2.1.4.1. Determinação do crescimento celular pelo método do peso seco	29
2.1.4.2. Determinação do crescimento pelo método de dissimilação	29
2.1.4.3. Dimensão das células em suspensão	30
2.1.4.4. Viabilidade celular	30
2.1.4.5. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura	31
2.1.4.5.1. <u>Condições de análise</u>	31
2.1.4.6. Mobilização do nitrato do meio de cultura	32
2.1.4.6.1. <u>Condições de análise</u>	32
2.1.4.7. Mobilização do amónio do meio de cultura	33
2.1.5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	34
2.1.5.1. Densidade de inóculo	34
2.1.5.2. Tempo de subcultura	34
2.1.5.3. Fonte de carbono	34
2.1.5.4. Concentração de sacarose	35
2.1.5.5. Concentração da fonte de azoto	35
2.1.5.6. Regulação hormonal	35
2.1.5.7. Concentração de CuSO ₄	36
2.2. <u>MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPEN- SÃO E NA PLANTA</u>	36
2.2.1. ACUMULAÇÃO DE MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	36
2.2.1.1. Extracção da medicarpina e da maackiaina do meio de cultura	36
2.2.1.2. Purificação da medicarpina e da maackiaina por cromatografia em camada delgada semi preparativa	36
2.2.1.3. Identificação da medicarpina e da maackiaina	37
2.2.1.3.1. <u>Deteccção de fenóis em placa</u>	37
2.2.1.3.1.1. <i>Preparação de nitroanilina diazotizada</i>	37
2.2.1.3.2. <u>Derivatização das amostras</u>	37
2.2.1.3.2.1. <i>Preparação do diazometano</i>	38
2.2.1.3.3. <u>Condições de análise</u>	38
2.2.1.3.3.1. <i>Cromatografia gás líquido acoplada a espectrometria de massa</i>	38
2.2.1.3.3.2. <i>Espectrofotometria ultravioleta</i>	39
2.2.1.3.3.3. <i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (¹H-NMR)</i>	39
2.2.1.4. Extracção e quantificação da medicarpina e da maackiaina	39
2.2.1.4.1. <u>Extracção e quantificação da medicarpina e da maackiaina extracelulares</u>	39

2.2.1.4.2. <u>Extracção e quantificação da medicarpina e da maackiaina intracelulares</u>	39
2.2.1.4.3. <u>Extracção dos glicoconjugados da medicarpina e da maackiaina intracelulares</u>	40
2.2.1.4.3.1. <i>Hidrólise</i>	40
2.2.1.4.4. <u>Síntese de 7-acetoxi-4-metilumbeliferona (padrão interno)</u>	40
2.2.1.4.5. <u>Cálculo do factor de resposta relativo da maackiaina</u>	41
2.2.1.4.6. <u>Condições de análise</u>	41
2.2.1.4.6.1. <i>Cromatografia gás-líquido de alta resolução</i>	41
2.2.1.5. Influência de diversos factores na acumulação da medicarpina e da maackiaina nas culturas de células em suspensão	42
2.2.1.5.1. <u>Fonte de carbono</u>	42
2.2.1.5.2. <u>Concentração de sacarose</u>	42
2.2.1.5.3. <u>Concentração da fonte de azoto</u>	42
2.2.1.5.4. <u>Regulação hormonal</u>	42
2.2.1.5.5. <u>Concentração de CuSO₄</u>	42
2.2.1.5.6. <u>Adição de fenilalanina e acetato de sódio ao meio de cultura</u>	42
2.2.1.5.7. <u>Adição de elicitadores bióticos</u>	43
2.2.1.5.7.1. <u>Adição de <i>Candida albicans</i></u>	43
2.2.1.5.7.1.1. Preparação do elicitador	43
2.2.1.5.7.2. <u>Adição de <i>Phytophthora cinnamomi</i></u>	43
2.2.1.5.7.2.1. Preparação do elicitador	43
2.2.1.5.7.3. <u>Adição de celulase</u>	44
2.2.2. MEDICARPINA E MAACKIAINA NA PLANTA	44
2.2.2.1. Extracção e quantificação da medicarpina e maackiaina da planta	44
2.2.3. ENSAIOS DE ACTIVIDADE	44
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
1. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS <i>IN VITRO</i>	46
1.1. <u>OBTENÇÃO DE <i>CALLI</i></u>	46
1.1.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES	46
1.1.2. SELECÇÃO DO EXPLANTE	46
1.1.3. SELECÇÃO DO MEIO DE CULTURA E REGULAÇÃO HORMONAL	47
1.2. <u>OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>ONONIS NATRIX</i></u>	48
1.2.1.1. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS CULTURAS EM SUSPENSÃO DE <i>ONONIS NATRIX</i>	49
1.2.2. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>ONONIS NATRIX</i>	50
1.2.2.1. Densidade de inóculo	50
1.2.2.2. Tempo de subcultura	51

1.2.2.3. Influência da concentração de sacarose no crescimento celular em diversas regulações hormonais	52
1.2.2.4. Efeito da ausência de auxina ou citocinina	54
1.3. <u>CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO EM TERMOS DO CONSUMO DE AÇÚCARES, NITRATO E AMÓNIO</u>	56
1.3.1. INFLUÊNCIA DO TIPO DA FONTE DE CARBONO NA MOBILIZAÇÃO DOS AÇÚCARES	56
1.3.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA MOBILIZAÇÃO DOS HIDRATOS DE CARBONO DO MEIO DE CULTURA	59
1.3.3. INFLUÊNCIA DO BALANÇO DE AZOTO NA MOBILIZAÇÃO DOS HIDRATOS DE CARBONO DO MEIO DE CULTURA	64
1.3.4. INFLUÊNCIA DA REGULAÇÃO HORMONAL NA MOBILIZAÇÃO DOS HIDRATOS DE CARBONO DO MEIO DE CULTURA	67
1.3.5. MOBILIZAÇÃO DO NITRATO E DO AMÓNIO DO MEIO DE CULTURA	72
1.3.5.1. Influência da fonte de carbono na mobilização do amónio e nitrato do meio de cultura	73
1.3.5.2. Influência da concentração de sacarose na mobilização do amónio e do nitrato do meio de cultura	75
1.3.5.3. Influência do balanço de azoto na mobilização do amónio e do nitrato do meio de cultura	76
1.3.5.4. Influência da regulação hormonal na mobilização do amónio e nitrato do meio de cultura	79
2.1. <u>ESTUDO DA PRODUÇÃO DA MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO</u>	84
2.1.1. IDENTIFICAÇÃO DA MEDICARPINA E DA MAACKIAINA	84
2.1.2. ACUMULAÇÃO DE MEDICARPINA E MAACKIAINA EM FUNÇÃO DE DIVERSOS FACTORES	90
2.1.2.1. Acumulação de medicarpina e maackiaina em cultura de células em suspensão de <i>Ononis natrix</i>	90
2.1.2.2. Influência do tipo da fonte de carbono na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão	91
2.1.2.3. Influência da concentração de sacarose na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão	98
2.1.2.4. Influência da regulação hormonal na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão	102
2.1.2.5. Influência do balanço de azoto na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão	106

2.1.2.6. Influência do cobre na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão	110
2.1.2.7. Influência da adição de precursores na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão	114
IV. RESUMO E CONCLUSÕES	117
1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>O. NATRIX</i>	117
2. ACUMULAÇÃO DE MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>O. NATRIX</i>	119
IV. SUMMARY AND CONCLUSIONS	121
1. ESTABLISHMENT AND CHARACTERISATION OF CELL GROWTH PATTERN OF SUSPENSION CULTURES OF <i>O. NATRIX</i>	121
2. ACCUMULATION OF MEDICARPIN AND MAACKIAIN IN CELL SUSPENSION CULTURES OF <i>O. NATRIX</i>	122
<i>C. Hyoscyamus Albus: Aspectos gerais, Estudo da Influência de Diversos Factores no Crescimento das Culturas de Células em Suspensão, Estudo da Produção de Metabólitos de Stress em Diversas Condições de Elicitação</i>	125
I. INTRODUÇÃO	126
1.1. <u>CARACTERÍSTICAS GERAIS, DISTRIBUIÇÃO E UTILIZAÇÃO</u>	126
1.2. <u>A ACUMULAÇÃO DE FITOALEXINAS NA FAMÍLIA SOLANACEAE</u>	126
II. MATERIAL E MÉTODOS	131
1. MATERIAL	131
1.1. <u>MATERIAL VEGETAL</u>	131
1.2. <u>REAGENTES E SOLVENTES</u>	131
2. MÉTODOS	131
2.1. <u>OBTENÇÃO DE CALLI E DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO</u>	131
2.1.1. GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE <i>HYOSCYAMUS ALBUS</i>	131
2.1.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CALLI	132
2.1.3. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	132
2.1.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS EM SUSPENSÃO	133
2.1.5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	133
2.1.5.1. Densidade de inóculo	133
2.1.5.2. Concentração de sacarose	133
2.1.5.3. Regulação hormonal	133
2.2. <u>PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE STRESS PELAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO</u>	134

2.2.1. ELICITAÇÃO E EXTRACÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS	134
2.2.2. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS	134
2.2.2.1. Isolamento e identificação da lubimina e 10- <i>epilubimina</i>	134
2.2.2.1.1. <u>Cromatografia em camada delgada semipreparativa</u>	134
2.2.2.1.2. <u>Cromatografia analítica em camada delgada</u>	135
2.2.2.1.2.1. <i>Testes cromogénicos</i>	135
2.2.2.1.3. <u>Redução da lubimina e 10-<i>epilubimina</i></u>	135
2.2.2.1.4. <u>Derivatização das amostras</u>	135
2.2.2.1.5. <u>Determinação dos índices de retenção linear</u>	136
2.2.2.1.6. <u>Condições de análise</u>	136
2.2.2.1.6.1. <i>Cromatografia gás-líquido de alta resolução</i>	136
2.2.2.1.6.2. <i>Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa</i>	137
2.2.2.1.6.3. <i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (¹H-NMR)</i>	137
2.2.2.2. Isolamento e identificação da solavetivona e rishitina	137
2.2.2.2.1. <u>Obtenção de padrões de rishitina e solavetivona</u>	138
2.2.2.2.1.1. <i>Obtenção de rishitina</i>	138
2.2.2.2.1.2. <i>Obtenção de solavetivona</i>	138
2.2.2.2.2. <u>Redução da solavetivona</u>	138
2.2.2.2.3. <u>Derivatização das amostras</u>	138
2.2.2.2.4. <u>Condições de análise</u>	139
2.2.2.2.4.1. <i>Espectrofotometria de ultravioleta</i>	139
2.2.2.3. Isolamento e identificação das acetofenonas	139
2.2.2.3.1. <u>Derivatização das amostras</u>	139
2.2.2.4. Extracção e quantificação dos metabolitos de stress	139
2.2.2.4.1. <u>Síntese do palmitato de metilo (padrão)</u>	140
2.2.2.4.2. <u>Cálculo do factor de resposta relativo da lubimina</u>	140
2.2.2.4.3. <u>Condições de análise</u>	140
2.2.2.5. Estudo de diversos factores na acumulação dos metabolitos de stress	141
2.2.2.5.1. <u>Estádio do crescimento celular e tempo de incubação</u>	141
2.2.2.5.2. <u>Influência da concentração do elicitor</u>	141
2.2.2.5.3. <u>Adição de acetato de sódio e farnesol ao meio de cultura</u>	141
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	142
1. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS <i>IN VITRO</i>	142
1.1. <u>OBTENÇÃO DE <i>CALLI</i></u>	142
1.1.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES	142
1.1.2. SELECÇÃO DO MEIO DE CULTURA E REGULAÇÃO HORMONAL	142
1.2. <u>OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO</u>	142

1.2.1. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO	143
1.2.1.1. Influência da regulação hormonal	143
1.2.1.2. Influência da densidade do inóculo	143
1.2.1.3. Influência da concentração de sacarose no crescimento celular	144
1.2.2. MOBILIZAÇÃO DE ALGUNS NUTRIENTES DO MEIO DE CULTURA	145
1.2.2.1. Mobilização dos açúcares	145
1.2.2.2. Mobilização do amónio e nitrato do meio	146
2.1. <u>ESTUDO DA PRODUÇÃO DE METABOLITOS DE STRESS NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO</u>	148
2.1.1. IDENTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS	148
2.1.2. ACUMULAÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS APÓS ELICITAÇÃO BIÓTICA	166
2.1.2.1. Estudo da produção dos metabolitos de stress, pelas culturas de células em suspensão de <i>Hyoscyamus albus</i> , com diversos elicitadores	166
2.1.2.2. A importância da idade das culturas de células em suspensão e do tempo de incubação com o elicitador na acumulação de metabolitos de stress	168
2.1.2.3. Influência da concentração do elicitador na acumulação de lubimina e 10-epilubimina pelas culturas de células em suspensão	173
2.1.2.4. Influência do acetato e farnesol, adicionados às culturas de células em suspensão, na acumulação de fitoalexinas sesquiterpénicas	174
IV. <u>RESUMO E CONCLUSÕES</u>	176
1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE <i>H. ALBUS</i>	176
2. INFLUÊNCIA DA IDADE DA CULTURA, DA CONCENTRAÇÃO DE ELICITADOR E DA ADIÇÃO DE PRECURSORES NA ACUMULAÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS	177
IV. <u>SUMMARY AND CONCLUSIONS</u>	180
1. OBTAINMENT AND CHARACTERISATION OF THE GROWTH CONDITIONS OF CELL SUSPENSION CULTURES OF <i>H. ALBUS</i>	180
2. INFLUENCE OF THE CELL GROWTH STAGE; THE INCUBATION TIME WITH THE ELICITOR; ELICITOR CONCENTRATION AND THE ADDITION OF PRECURSORS ON THE ACCUMULATION OF STRESS SECONDARY METABOLITES	181
D. <i>Perspectivas futuras</i>	183
E. <i>Bibliografia</i>	185

A. A Cultura de Células Vegetais:

Aspectos Gerais

Objectivos do Trabalho

I. ASPECTOS GERAIS

1.1. IMPORTÂNCIA DO REINO VEGETAL NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS

Há milénios que o Homem recorre às plantas e às suas propriedades terapêuticas para prevenir e curar doenças. Já no manuscrito de Bower, da Índia, 450 a. C., o alho era mencionado para o tratamento de dores abdominais. Também no papiro de Ebers, o alho era mencionado no tratamento de feridas (Essman, 1984). Hipócrates, um dos maiores servidores da Humanidade, 460 a. C., já prescrevia ópio, mandrágora e meimandro como narcotizantes, absinto e pequena centáurea como febrífugas e escamónia e eufórbia como purgativas (Delaveau, 1982).

As plantas revestem-se, hoje, de enorme importância económica porque têm uma larga aplicação nas indústrias alimentar, química, construção, têxtil, papel e produção de energia (Fowler, 1983; Fowler e Scragg, 1988). Na indústria química, as plantas são geralmente utilizadas na produção de medicamentos, cosmética, agro-químicos, aromas, fragrâncias, pigmentos, adoçantes e enzimas. A generalidade destes compostos pertence ao grupo dos metabolitos secundários, que, embora não sendo necessário para o crescimento e/ou reprodução do organismo, expressam a individualidade das espécies em termos químicos (Haslam, 1986).

O desenvolvimento da síntese química tem vindo a substituir, com alguma vantagem comercial, a obtenção de alguns metabolitos secundários de origem vegetal, por garantirem, na generalidade dos casos, uma maior rentabilização da produção dos princípios activos e uma maior homogeneidade na qualidade dos mesmos. Contudo, em alguns casos, as substâncias continuam a ser preferencialmente obtidas a partir da planta, quer por impossibilidade de síntese química, devida à complexidade da estrutura, que inviabilizaria o processo do ponto de vista económico, quer pela maior toxicidade cumulativa apresentada por alguns compostos de síntese (Fowler, 1983).

Para a obtenção de metabolitos secundários com interesse, são necessárias, na generalidade dos casos, grandes quantidades de material vegetal. Tais necessidades podem levar à extinção da espécie possuidora do princípio activo, como é o caso de *Taxus brevifolia*, espécie produtora de taxol (Hostettmann e Hamburger, 1991), ou exigir plantações em larga escala. Ora, a ocupação de grandes áreas com este propósito, é incompatível com a necessidade, cada vez maior, de libertar os terrenos para a produção agrícola. Além disso, a produção por este processo, contraria as tendências actuais do mercado, que aliam o lucro, com o menor risco possível, à grande exigência em termos de qualidade. Neste contexto, a cultura "in vitro" de células

vegetais pode constituir uma alternativa válida à produção de biomassa e de produtos naturais com interesse.

1.2. CULTURA DE CÉLULAS VEGETAIS E SEU INTERESSE NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS

A substituição dos métodos tradicionais de produção de metabolitos secundários pela cultura "in vitro" de células vegetais apresenta as seguintes vantagens potenciais: 1) independência em relação aos factores ambientais, tais como o clima, pragas, doenças e restrições geográficas; 2) a natureza intensiva da produção de compostos em cultura poderá libertar as terras para a agricultura; 3) a cultura de células poderá apresentar vantagens nos casos em que as plantas dificilmente crescem em condições naturais, devido ao seu ciclo de vida longo; 4) o relativo grau de controlo das condições de cultura, poderá permitir que os níveis de produção sejam alcançados mais de acordo com a procura do mercado; 5) maior qualidade do produto poderá ser assegurada utilizando linhas de células perfeitamente caracterizadas; 6) novas vias de síntese poderão ser estabelecidas em linhas de células mutantes, obtendo-se novos produtos até então nunca encontrados na planta; 7) algumas culturas de células poderão ser utilizadas em processos de biotransformação de substratos específicos, levando à obtenção de substâncias com interesse (Mantell *et al.*, 1985).

Na Tabela 1.1 apresentam-se alguns dos compostos com interesse comercial produzidos por culturas de células vegetais.

Tabela 1.1. Compostos de interesse comercial obtidos a partir de culturas de células vegetais (Scragg, 1986)

Composto / Preparado	Aplicação
Ajmalicina	Doenças circulatorias
Codeína	Analgésico
Digoxina	Cardiotónico
Diosgenina	Produção de fármacos esteróides
Jasmina	Fragrâncias
Piretrinas	Insecticidas
Quinina	Antimalárico, aroma
Óleo de rosa	Fragrância
Hortelã	Fragrância, aroma
Açafrão	Corante, aroma
Xiconina	Antibacteriano, corante
Vimblastina, vincristina	Leucemia

Embora todos os factores atrás referidos se apresentem favoráveis à produção de compostos naturais, só muito raramente as culturas de células vegetais se têm revelado economicamente viáveis. A viabilidade traduz-se na produtividade medida em

termos de quantidade de produto sintetizado por unidade de volume de cultura, num intervalo de tempo definido (Fowler, 1988) e que depende, fundamentalmente, da taxa de crescimento das células, produção de biomassa, produção do composto e do número de subculturas que podem ser efectuadas nesse intervalo de tempo (Fowler e Scragg, 1988). Para os resultados relativamente desanimadores contribuem o crescimento mais lento das células vegetais em relação aos microrganismos, a utilização de meios de cultura de formulação dispendiosa, a tendência generalizada da acumulação dos produtos nas células, em vez dos excretarem para o meio de cultura, e a menor produção dos metabolitos pelas culturas de células em relação à planta (Barz e Ellis, 1981; Rokem *et al.*, 1985).

Para alguns autores, esta menor produção nas culturas de células vegetais é justificada pela dormência ou repressão dos genes codificantes de determinadas enzimas específicas de uma via metabólica (Bohm, 1980; Einstein, 1985). No entanto, para outros, este facto parece improvável devido à totipotência das células vegetais em cultura (Butcher, 1977; Shargool, 1982; Constabel, 1987). Assim, o fracasso da produção dos metabolitos secundários resultaria ou de alterações epigenéticas verificadas nas culturas (Shargool, 1982), ou das propriedades fisiológicas e morfológicas das células desdiferenciadas em cultura, pois, apresentam, uma diferenciação celular e um desenvolvimento tecidular organizado limitado ou nulo (Butcher, 1977; Constabel, 1987).

Na verdade, muitos metabolitos secundários não são produzidos em cultura porque a sua síntese ocorre apenas em células diferenciadas e especializadas ou em tecidos organizados. A título de exemplo refira-se a produção de escopolamina, por cultura de raízes em suspensão de *Hyoscyamus niger*, e de piretrinas, por cultura de rebentos de *Pyrethrum*, ou ainda dos óleos essenciais, que são geralmente sintetizados por células secretoras, de estruturas especializadas, necessitando, por isso de elevado grau de citodiferenciação (Staba, 1985; Guern *et al.*, 1987). Segundo Newmamm (1989), para as células em cultura produzirem e acumularem metabolitos secundários, é necessário que a interfase seja relativamente longa. Se o intervalo entre duas mitoses for curto, as células são incapazes de se diferenciar em células especializadas, com um conjunto de enzimas e uma ultraestrutura apropriados para a produção e armazenamento dos metabolitos secundários. No entanto, para Charlwood *et al.* (1989), a citodiferenciação ou mesmo a morfogénese não são um pré-requisito para a síntese e acumulação de isoprenóides de baixo peso molecular, porquanto *calli* de *Pelargonium* mantidos em condições nutricionais, de luminosidade e regulação hormonal apropriadas produziam e acumulavam óleo essencial.

Do exposto fica patente que a produção de compostos naturais com interesse, por culturas de células vegetais, só encontra aplicação biotecnológica se as reacções fo-

rem específicas e, portanto, não possam ser efectuadas por microrganismos ou por síntese química. Pesem embora as limitações já apontadas, as culturas de células devem continuar a ser alvo de estudo, pois podem ser de extrema utilidade nos seguintes domínios: 1) produção de metabolitos secundários com interesse, sempre que os níveis sejam superiores aos da planta, ou quando a mesma não se encontra disponível; 2) produção dos metabolitos secundários por biotransformação, a partir de precursores de baixo custo, que não possam ser eficientemente transformados por processos químicos ou microbiológicos; 3) produção de novos compostos, com propriedades biológicas particulares e úteis; 4) produção de compostos específicos de plantas (enzimas) que só possam ser obtidos a partir de células vivas; 5) elucidação de algumas vias biossintéticas, servindo como fonte adequada de enzimas, mRNA e genes do metabolismo secundário, uma vez que as células vegetais, em cultura, apresentam uma actividade metabólica mais elevada do que a das respectivas plantas diferenciadas (Barz e Ellis, 1981; Lindsey e Jones, 1989; Zenk, 1991). Esta última alínea é, só por si, suficiente para justificar a utilização de culturas de células vegetais, pois a informação disponível do metabolismo vegetal e sua regulação é muito reduzida.

Estudar a cinética do crescimento celular e a formação dos metabolitos secundários são etapas essenciais à compreensão dos mecanismos reguladores do metabolismo secundário. Em relação ao crescimento celular, podem considerar-se dois modelos de acumulação de metabolitos secundários: 1) acumulação durante a fase estacionária, quando o crescimento celular é quase nulo; a maioria das culturas de células vegetais estudadas caem neste modelo; 2) acumulação durante a fase exponencial em estreita associação com a divisão celular; a acumulação da betacianina, pelas culturas de *Phytolaca americana*, é um exemplo deste modelo (Sakuta e Komamine, 1987; Komamine *et al.*, 1989).

1.3. VIAS PARA UMA PRODUÇÃO OPTIMIZADA DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS

Vários métodos e técnicas têm sido utilizados na tentativa de aumentar a síntese e a acumulação de metabolitos secundários, por culturas de células vegetais em suspensão:

- 1- Optimização das condições de cultura;
- 2- Adição de precursores;
- 3- Selecção de linhas celulares;
- 4- Selecção de linhas mutantes;
- 5- Diferenciação e/ou morfogénese;

- 6- Imobilização;
- 7- Transformação;
- 8- Micropropagação;
- 9- "Two-phase culture"
- 10- Elicitação.

1.3.1. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTURA

Diversos factores físicos (luz, temperatura, arejamento, pH) e químicos (composição do meio e regulação hormonal) afectam a cinética de crescimento celular e a produção de metabolitos secundários.

1.3.1.1. Factores físicos

O efeito da luz, da temperatura, do arejamento e do pH do meio, na produção de biomassa e de metabolitos secundários, têm sido estudados por diversos autores.

Geralmente, a acumulação de metabolitos secundários, nas culturas, não aumenta para temperaturas superiores a 25 °C. As culturas mantidas, por exemplo, a 30 °C, acastanham rapidamente e morrem (Watts *et al.*, 1984; Mulder-Krieger *et al.*, 1988).

Na produção de alcalóides, as temperaturas baixas (16 °C), parecem ser mais favoráveis do que as temperaturas mais elevadas. No entanto, o crescimento celular é, nestas condições, fortemente reduzido. À temperatura de 16 °C, o conteúdo elevado de alcalóides nos vacúolos parece dever-se a um balanço modificado entre a síntese e a degradação e não a uma síntese aumentada (Heidjen, 1989).

Segundo Watts *et al.* (1984), as células em suspensão de *Apium graveolens*, quando mantidas a temperatura de 4 °C, durante os primeiros cinco dias de cultura, libertavam limoneno para o meio de cultura, após serem transferidas para 25 °C. Estes resultados não se verificavam nas culturas controlo, mantidas a 24 °C.

As condições de iluminação afectam a produção de terpenos, de flavonóides e de outros pigmentos em células em cultura (Corduan e Reinhart, 1972; Brown e Charlwood, 1986; Jordan *et al.*, 1986; Charlwood *et al.*, 1988; Mulder-Krieger *et al.*, 1988; Berger *et al.*, 1990). A presença ou ausência de luz e bem assim o tipo de luz incidente revelaram-se factores determinantes na produção de metabolitos secundários. Segundo Corduan e Reinhart (1972), a biossíntese de óleos essenciais em culturas de *Ruta graveolens* mostrou ser dependente da qualidade e intensidade luminosas. Estas culturas, sob luz permanente (Cool White, 250 lux), produziam óleos essenciais semelhantes aos encontrados na planta mãe. Em contrapartida, o tipo de

compostos produzidos variava significativamente quando as culturas eram sujeitas a outros comprimentos de onda ou mantidas às escuras (Corduan e Reinhart, 1972). Outros autores (Tabata e Fujita, 1985) mostraram que as culturas de *Lithospermum* não produziam shikonina, quando expostas a luz branca ou azul, não sendo, no entanto, afectadas pela luz vermelha ou verde. Estas culturas, quando mantidas às escuras, produziam igualmente a shikonina, tornando o processo economicamente mais viável, sempre que se trabalha em fermentador e em larga escala. Também em muitos casos, a luz não parece ser necessária à produção de óleos essenciais em cultura (Mulder-Krieger *et al.*, 1988). Charlwood *et al.* (1988) verificaram um aumento da produção de monoterpenos em culturas de *Pelargonium fragans*, quando estas eram transferidas de luz permanente para a escuridão. Igualmente, Figueiredo (1992) observou um aumento na produção de óleos essenciais quando as culturas de *Achillea millefolium* eram transferidas para a escuridão, depois de estarem em condições de fotoperíodo.

Segundo Trotin *et al.* (1992), as culturas de *Fagopyrum esculentum* produziam catequinas e procianidinas, quer às escuras, quer na presença de luz. Weathers *et al.* (1992) verificaram, por outro lado, que a luz inibia a formação de capsaicina em *calli* de *Capsicum annuum*.

Verificou-se, em alguns casos, que o efeito da luz na formação de antocianinas e serpentina, dependia, ainda, da composição do meio de cultura. Os estudos efectuados permitiram concluir que o efeito da luz na acumulação daqueles compostos era maior quando no meio existiam baixas concentrações de 2,4-D, fosfato e azoto inorgânico (Heijden, 1989).

O fornecimento de oxigénio a cultura de células em suspensão em sistema "batch" depende da permeabilidade da rolha e da intensidade da agitação (Heijden, 1989). Verificou-se, nalguns casos, que níveis elevados de oxigénio, dissolvido no meio, eram responsáveis por uma maior produção de metabolitos secundários (Fowler, 1986). Segundo Fontanel e Tabata (1987), as culturas de células em suspensão de *Lithospermum erythrorhizon* produziam mais shikonina quando, em fermentador, se aumentava os níveis de oxigénio (Fontanel e Tabata, 1987). Embora pouco explorada, como método para aumentar a produção de voláteis em cultura, a adição de CO₂ aumentou a produção de monoterpenos em culturas de *Vitis vinifera* e de compostos característicos do aroma de maçã em culturas de *Malus* sp. (Mulder-Krieger *et al.*, 1988).

Segundo Heijden (1989), para valores de pH entre 5,5-6,5, a produção de alcalóides não variava significativamente, embora, algumas linhas celulares (PRL#953) acumulassem níveis mais elevados de alcalóides quando mantidas em meio de cultura a pH 7 (Heijden, 1989).

1.3.1.2. Composição do meio e regulação hormonal

O meio de cultura, constituído por uma fonte de carbono, uma fonte de azoto, fósforo, vitaminas, sais minerais e fitorreguladores, deve ser capaz de induzir e manter o crescimento das células vegetais, e, se possível, permitir a produção de metabolitos secundários com interesse.

A produção "in vitro" de metabolitos secundários, para além de depender da espécie vegetal em estudo, é afectada, ainda, pela composição do meio (Mulder-Krieger *et al.*, 1988; Sakamura e Suga, 1989; Berger *et al.*, 1990). Da análise da produção de óleo essencial, por culturas de *Thymus vulgaris*, verificou-se que o meio base MS era, de entre cinco meios ensaiados, o que mais favorecia a produção de terpenos (Sugisawa *et al.*, 1988).

A sacarose é a fonte de carbono geralmente usada na cultura de células vegetais, por se revelar mais eficiente, tendo-se verificado que concentrações diversas deste açúcar afectam não só o crescimento celular como a produção de metabolitos secundários (Gautheret, 1955; Tabata e Fujita, 1985; Sakuta e Komamine, 1987; Fowler e Stafford, 1992). Os dissacáridos maltose, lactose, celobiose, melobiose e trealose (Herouart *et al.*, 1991) têm sido, igualmente, usados nas culturas de células vegetais, e bem assim os monossacáridos glucose, frutose, manose e galactose (Amorim *et al.*, 1977; Sahai e Shuler, 1984; Thompson e Thorpe, 1987; Borkowska e Szczerba, 1991) e o trissacárido rafinose (Gautheret, 1955). Também neste caso, têm sido testadas concentrações diversas no intuito de melhorar a produtividade (Fowler e Stafford, 1992). Em caso algum, foi possível estabelecer qualquer relação entre pressão osmótica, devida à presença do açúcar, e a produção de metabolitos secundários (Sakuta e Komamine, 1987).

Os sais de amónio e os nitratos são geralmente usados em cultura de células vegetais como fonte de azoto. O amónio é, normalmente, usado em concentração inferior à do nitrato e, portanto, com um desaparecimento mais rápido do meio de cultura (Heijden, 1989).

A adição de amónio e nitrato ao meio de cultura leva a um rápido aumento de biomassa mas tem como contrapartida uma inibição da biossíntese de metabolitos secundários (alcalóides, antocianinas e fenóis). A acumulação destes compostos é fortemente aumentada reduzindo o azoto mineral (Heijden, 1989). Por outro lado, a produção dos metabolitos secundários é influenciada pelas relações amónio/nitrato e azoto inorgânico/sacarose dos meios de cultura (Sakuta e Komamine, 1987).

O fosfato é um elemento importante na regulação do crescimento e do metabolismo secundário, sendo rápida e completamente consumido do meio de cultura, para

ser armazenado no vacúolo. Este rápido consumo do fosfato provoca um aumento da síntese do ATP, durante a fase de crescimento exponencial das células. Verifica-se, geralmente, que valores iniciais mais elevados de fosfato estimulam o crescimento e a síntese proteica, observando-se um comportamento inverso, no que diz respeito à indução e acumulação de alcalóides (Heijden, 1989).

Os micronutrientes geralmente usados (cálcio, magnésio, sódio, potássio, sulfato, molibdénio, zinco) não parecem influenciar a acumulação de polifenóis e alcalóides, ao contrário do que se verifica com o suplemento vitamínico, que influencia qualitativa e quantitativamente a produção de alcalóides (Heijden, 1989). Segundo Inagaki *et al.* (1991) a produção de biomassa e de verbascosido era aumentada em cultura de células de *Leucosceptrum japonicum*, quando a concentração de sais do meio B5 era reduzida para metade.

A natureza e a concentração de fitorreguladores, presentes no meio de cultura, influencia quer o crescimento, quer a indução e a acumulação de metabolitos secundários. O 2,4-D, sendo uma hormona muito usada em culturas de células vegetais para a obtenção de *calli*, tem o inconveniente de, nalgumas células vegetais, inibir a síntese de metabolitos secundários (Everett e Street, 1979; Lindsey e Yeoman, 1983a; Morris *et al.*, 1985; Morris, 1986; Robins *et al.*, 1986; Takeda, 1988).

Segundo Sugisawa *et al.* (1988), nas culturas de *Thymus vulgaris*, a combinação de 2,4-D (10 ppm) / Kin (10 ppm) quintuplicava a produção de óleo essencial, relativamente a várias outras suplementações hormonais ensaiadas. A produção de óleo essencial nas culturas de *Coleonema album* revelou-se igualmente dependente da regulação hormonal utilizada (Berger *et al.*, 1990). Igualmente, Ozeki *et al.* (1989, 1990) observaram a inibição da síntese de antocianinas em culturas de células em suspensão de cenoura, mantidas num meio contendo 2,4-D.

Dos diversos estudos efectuados, pode concluir-se que o meio optimizado para o crescimento celular não é, na generalidade dos casos, o meio adequado para a produção de metabolitos secundários. Alguns autores preferem, num primeiro passo, subcultivar as células em meio optimizado para o crescimento celular, e, só depois, transferi-las para meio optimizado para a produção (Sakuta e Komamine, 1987). Esta foi, por exemplo, a metodologia seguida por Tabata e Fujita (1985) para a optimização da produção de shikonina.

1.3.2. ADIÇÃO DE PRECURSORES

Com o objectivo de melhorar a produção de metabolitos secundários com interesse, têm-se recorrido a processos de biotransformação de compostos precursores. Os precursores podem ser metabolitos primários, como por exemplo a fenilalanina ou

metabolitos mais próximos dos compostos pretendidos, cuja biotransformação se pode dar num único passo (Fowler e Stafford, 1992). Parece, no entanto, que não se deve fazer qualquer generalização sobre o efeito positivo ou negativo da adição do precursor, a não ser nos casos em que as linhas celulares estão bem definidas e caracterizadas (Deus e Zenk, 1982). Esta conclusão baseia-se no facto de, diferentes linhas celulares, obtidas a partir de uma mesma população celular, poderem apresentar comportamentos diversos, perante a adição de um mesmo precursor. O triptofano e a triptamina são dois precursores de alcalóides indólicos, usados em culturas de células de *Catharanthus roseus*. Em determinadas linhas celulares ambos os precursores afectam positivamente a produção; noutras linhas, têm um efeito negativo (Deus e Zenk, 1982).

As principais reacções observadas nos processos de biotransformação, em cultura de células vegetais, envolvem: oxidação, redução, hidroxilação, metilação, desmetilação, isomerização e epoxidação, para além de reacções de conjugação. Os grupos glicosilo, acilo, aminoacilo, amino e peptídilo podem ser adicionados a grupos funcionais do substrato (Barz e Ellis, 1981).

A formação do ácido rosmarínico não é influenciada por diversas concentrações de ácido shiquímico, L-fenilalanina e L-tirosina adicionados às culturas em suspensão de *Coleus blumei* (Bohm, 1980). Por seu turno, a adição de ácido *o*-succinilbenzóico às culturas em suspensão de *Galium mollugo* provocou um aumento da produção de antraquinonas (Bohm, 1980).

O colesterol adicionado a culturas de células de *Dioscorea deltoidea* provocou o aumento da produção de diosgenina. O mesmo precursor, adicionado a culturas de *D. mertonensis* levou, por seu turno, à produção de cardenólidos (Staba, 1977).

Culturas de células de *Digitalis lanata* biotransformaram β -metildigitoxina em β -metildigoxina (Misawa e Suzuki, 1982).

A adição ao meio de cultura de precursores, mais ou menos longíquos, das vias de síntese dos óleos essenciais, tem sido também testada com vista a estimular a produção de voláteis (Banthorpe *et al.*, 1986; Banthorpe, 1988; Mulder-Krieger *et al.*, 1988). Culturas de *calli* de *Pelargonium fragans*, às quais se adicionaram ácidos orgânicos ao meio de cultura, produziam cerca de 225 vezes mais de óleo do que as culturas controlo (Charlwood *et al.*, 1988). A adição de ácido mevalónico ao meio de cultura de *calli* de *Thymus vulgaris* foi responsável pelo aumento da produção de óleo essencial em cerca de doze vezes (Sugisawa *et al.*, 1988).

Alguns dos compostos adicionados ao meio de cultura influenciam o metabolismo secundário de forma indirecta, ao provocarem o crescimento e a diferenciação celulares. Arfmann *et al.* (1985) administraram a 5-azacytidina às culturas de células de

Catharanthus roseus e conseguiram a produção de liriocresinol B-mono- β -glucosido, por indução da diferenciação celular.

Numa revisão recente, Suga e Hirata (1990) referem-se aos vários tipos de mecanismos de reacção e estereoquímica envolvidos nos processos de biotransformação, em trinta espécies vegetais em cultura, cobrindo duzentos substratos, incluindo células vegetais imobilizadas.

1.3.3. SELECÇÃO DE LINHAS CELULARES

As culturas de células vegetais são bastante heterogéneas, quer na capacidade de acumular metabolitos secundários, quer na capacidade de catalisar reacções específicas de uma determinada via biossintética (Stafford *et al.*, 1986).

Aberrações cromossómicas podem ser uma das razões para a diferente capacidade de produzir metabolitos secundários bem como para a maior ou menor frequência de uma determinada variante celular, na cultura de células. Refira-se, por exemplo que as células em cultura de *Catharanthus roseus*, grandes produtoras de alcalóides apresentavam, em regra, 16 cromossomas, número igual ao das células das raízes da planta, zona preferencial de produção de alcalóides. Por seu turno, uma outra linhagem de células, com baixa produção de alcalóides, apresentava duplicação do número de cromossomas além de aneuploidia (Deus e Zenk, 1982).

A selecção de linhas celulares altamente produtoras de metabolitos efectua-se por clonagem. Dois métodos são, geralmente, utilizados: a clonagem partindo de uma célula ou protoplasto ("single cell cloning") e a clonagem usando pequenos aglomerados celulares (10-100 células) ("small cell aggregate cloning") (Yamada, 1984; Fontanel e Tabata, 1987). A determinação do método mais eficiente é, contudo, contraditória, uma vez que para ambas as técnicas há descrições de instabilidade e heterogeneidade produtiva, embora, nalguns casos, o problema possa ser ultrapassado fazendo uma selecção repetida até que a produtividade estabilize (Yamada, 1984; Dougall, 1987; Fontanel e Tabata, 1987).

Em muitos casos, o método da clonagem de células isoladas é o que apresenta maior variabilidade na produção de compostos por se verificar aí uma maior variação do número de cromossomas (Yamada, 1984; Dougall, 1985). Segundo alguns autores, esta alteração pode dever-se à ausência de organização meristemática neste tipo de culturas (Stafford *et al.*, 1986).

Alterações genéticas, como sejam a poliploidia, aneuploidia, rearranjos intracromossómicos, variabilidade no DNA mitocondrial e alterações epigenéticas como sejam a metilação do DNA e a amplificação de genes instáveis são alguns dos factores apontados para a inactivação dos genes responsáveis pela síntese dos metabolitos se-

cundários (Stafford *et al.*, 1986). Além destes, factores de ordem fisiológica (condições nutricionais, de agregação e de divisão celulares) podem ser também responsáveis pela instabilidade verificada por diversas linhas de células (Dougall, 1987; Berlin, 1988).

Várias técnicas têm sido aplicadas para detectar e isolar as células com elevada produção: 1) métodos directos (observação directa da cor para compostos corados, ou observação fluorimétrica para compostos fluorescentes); 2) métodos indirectos socorrem-se a reacções coradas, cromatografia ou ensaios de radioimunidade (Yamada, 1984; Fontanel e Tabata, 1987).

1.3.4. SELECÇÃO DE LINHAS MUTANTES

O recurso a técnicas para a obtenção de mutantes, com o propósito de seleccionar linhas de células vegetais altamente produtoras de metabolitos secundários, tem-se revelado difícil por se conhecer mal algumas vias biossintéticas e ser difícil manipular as células vegetais (Widholm, 1987).

A criação de linhas celulares, resistentes a determinados compostos tóxicos, pode levar à acumulação de metabolitos secundários (Widholm, 1987).

A resistência de uma linha celular a um composto tóxico, análogo ao composto pretendido, pode dever-se à produção, em larga escala, do metabolito desejado. Com efeito, teores elevados do composto pretendido acabam por diluir o composto tóxico, no meio de cultura e, portanto, eliminar a sua toxicidade. Tais mutantes podem ser seleccionados facilmente a partir de uma população grande porque possuem a capacidade de crescer mesmo na presença do inibidor. Geralmente, utilizam-se análogos de metabolitos primários, pois provocam o aumento da síntese do correspondente metabolito, que por sua vez, pode ser o precursor de um composto secundário e, aumentar, portanto, a sua síntese (Widholm, 1987).

As células de tabaco e cenoura resistentes à *p*-fluorofenilalanina, um análogo da fenilalanina, acumulam elevados teores de fenóis, devido ao aumento da produção de fenilalanina e, conseqüentemente, da actividade da fenilalanina amónia liase (PAL) (Widholm, 1987). Níveis elevados de saponinas foram obtidos em linhas de células mutantes de *ginseng*, resistentes à nitrosoguanidina (Staba, 1982).

A resistência pode, ainda, ser devida à desintoxicação do análogo. Se esta desintoxicação for efectuada pela(s) mesma(s) enzima(s) responsáveis pela síntese de metabolitos secundários, então a selecção para a resistência pode induzir a um aumento nos níveis enzimáticos ou nas características cinéticas dos mesmos que levariam, por sua vez, a uma maior produção dos compostos secundários (Widholm, 1987).

As linhas de células mutantes são mais estáveis e podem ser mantidas sob condições selectivas, ao contrário do que se verifica noutras linhas celulares seleccionadas por outro processo (Berlin, 1988).

1.3.5. DIFERENCIAÇÃO

A maioria dos metabolitos secundários acumula-se em células e tecidos específicos das plantas superiores, o que pressupõe uma relação entre o metabolismo secundário e o crescimento e diferenciação morfológica das células.

As plantas apresentam estruturas altamente especializadas para a acumulação de metabolitos secundários: laticíferos, bolsas, canais e tricomas secretores, entre outros. Neste contexto, as células em suspensão não possuem níveis elevados de organização estrutural, o que pode constituir um obstáculo à biossíntese de diversos metabolitos. Há, no entanto, referências sobre a formação de terpenos, morfina e codeína em cultura de células sem a correspondente diferenciação morfológica (Morris *et al.*, 1985; Fontanel e Tabata, 1987; Charlwood *et al.*, 1989). De qualquer modo, a obtenção de culturas de rebentos, raízes e embriões, a partir de *calli* e de células em suspensão de espécies diversas, tem sido utilizado no sentido de melhorar a produção de metabolitos secundários (Fowler e Stafford, 1992).

1.3.6. IMOBILIZAÇÃO

Na produção de metabolitos secundários, a imobilização de células vegetais pode ter algumas vantagens, em relação às culturas em suspensão: 1) maior produção de metabolitos secundários; 2) uma fase estacionária mais longa; 3) possível reutilização da biomassa, eliminando a fase de crescimento não produtiva; 4) possível desenvolvimento de um processo de produção contínua, quando o composto é libertado para o meio de cultura; 5) possibilidade de trabalhar com altas concentrações de biomassa, o que leva a um aumento de produção; 6) manutenção de linhas celulares de crescimento fraco ou nulo, reduzindo o risco de uma menor produção (Brodélius, 1984; Fontanel e Tabata, 1987).

A maior produção de metabolitos secundários, em células imobilizadas, pode dever-se à agregação celular, o que determina à célula uma certa organização, essencial ao seu metabolismo. O contacto entre as células pode induzir alguma citodiferenciação que, por sua vez, é determinante da produção de metabolitos secundários (Lindsey e Yeoman, 1983a; Sakuta e Komamine, 1987; Mavituna, 1988; Yeoman, 1988; Williams e Mavituna, 1992).

A utilização das células imobilizadas pareceu bastante promissora nos processos que envolviam reacções de síntese ou de degradação, necessidade de cofactores caros ou no caso de vias metabólicas complexas. Contudo, várias limitações se têm colocado a este método, destacando-se, principalmente, as dificuldades de permeabilização do substrato ou produto, através da membrana plasmática, e ainda problemas associados a reacções laterais, envolvendo outras enzimas das células, ou substâncias libertadas por células degenerescentes. Por outro lado, os metabolitos secundários ficam, ainda, frequentemente retidos na matriz de imobilização (Berlin *et al.*, 1989).

As técnicas geralmente empregues na imobilização de células vegetais são as de oclusão em geles sintéticos (poliacrilamida, poliuretano, resina epoxídica), hidratos de carbono (celulose, agar, K-carragénio, alginato, quitosano) e proteínas (colagénio, gelatina, fibrina) (Brodelius, 1986).

As espumas reticuladas de poliuretano têm sido utilizadas, na imobilização, para aumentar a produção de óleos essenciais em cultura. Em culturas de células de *Pelargonium fragans*, imobilizadas por este processo, a produção de óleo essencial foi oito vezes superior à das células não imobilizadas (Brown e Charlwood, 1986; Charlwood *et al.*, 1988).

1.3.7. TRANSFORMAÇÃO

A cultura de células transformadas pode ser uma via alternativa para aumentar a produção de fitoquímicos. Os primeiros passos começaram já a ser dados na purificação, caracterização das enzimas chave das vias biossintéticas, no isolamento de clones de cDNA e na caracterização e síntese de genes (Constabel, 1990). A manipulação genética pode dividir-se, neste campo, em duas grandes categorias: 1) cultura de órgãos transformados, "hairy roots" e "shooty teratomas", para uma elevada produção de metabolitos específicos; 2) transferência e expressão de genes estranhos, manipulados artificialmente, incluindo genes modelo e genes específicos, capazes de alterar o modelo metabólico (Saito *et al.*, 1992).

Existem três vias para introduzir DNA em células vegetais: infecção com *Agrobacterium*, introdução directa de DNA ou infecção com o vírus do mosaico da couve flor (Ca MV) (McPherson e Parish, 1987).

O mais eficiente é o Ti- (tumor inducing) ou Ri- (root inducing) plasmídeos das bactérias *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* respectivamente, que, durante a infecção, transferem um fragmento de DNA específico (T-DNA) dos Ti/Ri plasmídeos para o genoma da célula vegetal (Dudits, 1987; McPherson e Parish, 1987; Saito *et al.*, 1992). As células vegetais assim transformadas pelos

plasmídeos Ti e Ri proliferam para formar respectivamente "crown galls" e "hairy roots".

As "hairy roots", que se formam por alteração do metabolismo auxínico, crescem rapidamente na ausência de fitorreguladores exógenos. Esta metodologia aplica-se geralmente a dicotiledóneas e à obtenção de compostos produzidos nas raízes (Hamill *et al.*, 1987; Saito *et al.*, 1992). Algumas culturas de raízes transformadas libertam os produtos para o meio de cultura, pelo que a produção pode ser aumentada com a utilização de adsorventes e elicitadores fúngicos (Hamill *et al.*, 1987). As "hairy roots" têm sido utilizadas, principalmente, na obtenção de compostos específicos das Solanaceae, nomeadamente na produção de alcalóides. Porém, outros compostos têm, também, sido obtidos com "hairy roots" como sejam os cardenólidos, saponinas e shikonina (Hamill *et al.*, 1987, Saito *et al.*, 1992). Estas raízes evidenciam elevada produtividade e relativa estabilidade da produção, em contraste com as culturas de células desdiferenciadas.

As culturas dos tecidos transformados podem, ainda, ser usadas na produção *de novo* ou na biotransformação de alguns metabolitos específicos, geralmente, produzidos ou biotransformados em folhas e/ou caules clorofilinos das plantas (Hamill *et al.*, 1987).

1.3.8. MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação pode vir a constituir uma boa alternativa na multiplicação e manutenção de plantas que requerem vários anos para o seu completo desenvolvimento. A micropropagação de plantas como *Cephaelis ipecacuanha*, *Panax ginseng*, *Digitalis lanata*, *Camomila recutita* e *Papaver somniferum* são alguns dos exemplos promissores do ponto de vista medicinal (Constabel, 1990). Por seu turno, a micropropagação de *Pelargonium graveolens*, *Mentha arvensis*, *Syzigium aromaticum*, *Pimenta dioica*, *Vanilla planifolia*, *Rosa* sp. e *Curcuma longa*, tem sido correntemente utilizada na área das indústrias de óleos essenciais (Stones, 1988).

A variação somaclonal tem sido utilizada como via de selecção de espécies de elevada produção de fitoquímicos com interesse medicinal e industrial. A grande desvantagem deste processo é a ausência de estabilidade nos quimiovariantes obtidos (Constabel, 1990).

1.3.9. "TWO-PHASE CULTURE"

A produção de metabolitos secundários, libertados para o meio de cultura, em baixas concentrações, pode ser melhorada usando a cultura em duas fases "two-

phase culture". Por este processo, utilizam-se locais artificiais de acumulação e/ou conservação, de carácter temporário, dos produtos secretados pelas culturas de células. Este sistema pode também, revelar-se de grande utilidade na obtenção de alguns compostos tóxicos, constituintes dos óleos essenciais (Bisson *et al.*, 1983; Witte *et al.*, 1983; Charlwood *et al.*, 1988; Cormier e Do, 1988). Esta metodologia pode ainda ser útil para a obtenção de metabolitos que se degradem ou volatilizem facilmente (Beiderbeck e Knoop, 1987).

O sistema de duas fases, por vezes utilizado nas culturas de células vegetais, contém o meio de cultura (fase aquosa) e uma pequena quantidade quer de material lipófilo, sob a forma líquida ou sólida, quer de adsorventes polares. Estes últimos podem ser constituídos por resinas numa base de poliestireno, por carvão activado, por polivinilpirrolidona insolúvel, ésteres do ácido acrílico, por silicato de alumínio e por sódio sintético (Beiderbeck e Knoop, 1987).

Os adsorventes sólidos reduzem, geralmente, o crescimento celular, quer por alterarem o pH do meio de cultura quer por removerem alguns componentes essenciais do meio de cultura (Beiderbeck e Knoop, 1987). A adição do adsorvente sólido apolar Lichroprep RP-8, às culturas de *Mentha piperita*, permitiu a acumulação de monoterpenos, embora em concentração reduzida (Cormier e Do, 1988), e de anetol, nas culturas de *Pimpinella anisum* (Mulder-Krieger *et al.*, 1988). Em muitos casos, a adição de Miglyol (adsorvente líquido apolar), ao meio de cultura, foi o processo que melhores resultados deu na produção e quantificação de óleos essenciais, excretados para o meio, como, ainda, na detecção de terpenos que, pela sua volatibilidade, não são normalmente isolados (Bisson *et al.*, 1983; Berlin *et al.*, 1984; Charlwood *et al.*, 1988; Mulder-Krieger *et al.*, 1988). O aumento da quantidade destes metabolitos parece dever-se à sua maior acumulação no Miglyol e não a uma síntese *de novo*. Segundo Cresswell *et al.* (1989), o aumento da produção dos terpenos, na presença de Mygliol, deve-se à protecção dos voláteis que, de outro modo, estariam sujeitos às condições aquosas e oxidativas que ocorrem "in vitro", à diminuição das reacções de *retro*-inibição ou à desrepressão do genoma. O crescimento celular pode ser afectado pela adição de Miglyol ao meio de cultura, dependendo da espécie em estudo. Embora Figueiredo (1992), não tenha verificado qualquer alteração no crescimento das culturas de células em suspensão de *Achillea millefolium*, em consequência da adição de Miglyol, esta metodologia permitiu aumentar o rendimento da produção de terpenos.

1.3.10. ELICITAÇÃO

Para além da suberina, da cutina, dos inibidores pré-infeccionais, da formação de calose, de aglutininas e de inibidores enzimáticos, as plantas possuem, ainda, mecanismos de defesa que actuam ao menor sinal de dano físico, desorganização de um tecido ou ataque de um microrganismo (Kuc e Rush, 1985; Barz *et al.*, 1988a). Neste grupo incluem-se as fitoalexinas, compostos de baixo peso molecular com actividade antimicrobiana, sintetizados *de novo* em resposta à infecção por um microrganismo (Kuc e Rush, 1985). As fitoalexinas acumulam-se no local da infecção e nas células dos tecidos circundantes de forma rápida e em concentração suficientemente alta para impedir o crescimento do invasor (Darvill e Albersheim, 1984; Kuc e Rush, 1985).

As fitoalexinas surgem, geralmente, nas dicotiledóneas e angiospérmicas, raramente nas gimnospérmicas e monocotiledóneas. Não se conhecem referências sobre a sua ocorrência em plantas não vasculares (Kuc e Rush, 1985).

A estrutura das fitoalexinas parece ser característica de género e mais frequentemente de família. As plantas pertencentes às Leguminosae, Solanaceae, Asteraceae e Convolvulaceae produzem, principalmente, isoflavonóides, sesquiterpenos, poliacetilenos e furanosesquiterpenos, respectivamente (Kuc e Rush, 1985; Barz *et al.*, 1988a; Barz *et al.*, 1988b). Contudo, isto não constitui uma regra, pois, os estilbenos não estão associados a qualquer família em particular (Stoessl, 1982).

A síntese das fitoalexinas é desencadeada por moléculas a que se dá o nome de elicitadores. Os elicitadores podem ser classificados em bióticos, quando têm uma origem biológica, e abióticos se resultam de um "stress" físico ou químico (radiação ultravioleta, exposição ao calor ou ao frio, etileno, fungicidas, antibióticos, sais de metais pesados, altas concentrações de sais) (Deverall, 1982; Eilert, 1987).

Embora tenha sido sugerido no Sixth International Congress for Plant Tissue and Cell Culture (1986) que o termo elicitador se utilizasse apenas para os compostos de origem biológica, os restantes denominar-se-iam agentes de "stress" abióticos (Eilert, 1987), neste trabalho, continuar-se-à a utilizar a terminologia clássica (elicitadores bióticos e abióticos). Assim, os elicitadores bióticos podem ter origem tanto nos microrganismos como na própria planta, denominando-se, neste caso, elicitadores endógenos (Bailey, 1982; Darvill e Albersheim, 1984).

Do ponto de vista químico, os elicitadores podem ser polissacáridos; proteínas; glicoproteínas; ácidos gordos insaturados, provenientes de fungos ou bactérias ou fragmentos pécticos da parede celular de plantas (oligossacáridos contendo resíduos de ácido galacturónico) (Darvill e Albersheim, 1984; Kuc e Rush, 1985; Barz *et al.*, 1988b).

Na elicitação podem considerar-se três tipos diversos de interacção planta-microrganismo: 1) libertação do elicitor pelo microrganismo e consequente reconhecimento pela planta, devido à presença de um receptor a nível do plasmalema; 2) libertação de elicitadores endógenos pela acção de enzimas microbianas que actuam sobre a parede celular do hospedeiro; 3) libertação de elicitadores exógenos pela acção de enzimas produzidas pelo hospedeiro que actuam sobre a parede celular do microrganismo (Eilert, 1987).

Sabendo que as células vegetais respondem a elicitadores de estrutura diversa com a activação dos mesmos genes, Scheel e Parker (1990) propuseram dois modelos hipotéticos para explicar o fenómeno. No primeiro modelo, elicitadores com estruturas diversas são libertados pelo microrganismo ligando-se de seguida ao mesmo receptor, localizado à superfície da membrana plasmática da célula vegetal. Daqui resulta uma única cadeia de sinais que leva a que os diversos genes de defesa respondam de forma adequada. No segundo modelo, considera-se a existência de receptores específicos para cada elicitor e portanto sinais individuais diversos, aos quais o núcleo tem de responder.

Após o reconhecimento do elicitor, pela célula hospedeira, inicia-se o processo de activação do gene. Para tal, parece ser necessária a presença de cálcio, porquanto na expressão dos genes intervêm cinases cálcio-dependentes (Eilert, 1987; Barz *et al.*, 1988b; Constabel, 1989; Scheel e Parker, 1990).

A aplicação de elicitadores a células vegetais afecta o metabolismo a diversos níveis. Para além dos genes responsáveis pela síntese de fitoalexinas, outros genes são activados, levando à síntese "de novo" de enzimas envolvidas na formação de polisacáridos, nomeadamente a calose; glicoproteínas ricas em hidroxiprolina; lenhina e polifenóis, que se depositam nas paredes celulares; quitinase; inibidores de proteínases e proteínas relacionadas com a patogénese "pathogenesis-related proteins". Ocorrem ainda, alterações na estrutura do plasmalema, na actividade respiratória, no metabolismo proteico e do fósforo e na produção de etileno (Barz *et al.*, 1988a).

A síntese e a acumulação de metabolitos secundários, por cultura de células vegetais, pode ser melhorada recorrendo ao emprego de elicitadores. Quando as culturas reagem ao elicitor, esta técnica pode ser vantajosa por: 1) o tempo necessário para obter o produto é, em geral, reduzido; 2) não haver necessidade de introduzir alterações à composição do meio de cultura; 3) os metabolitos serem, em muitos casos, excretados para o meio de cultura, permitindo extrair o produto sem danificar as células; 4) a reelicitação poder levar a um processo de produção semicontínuo; 5) as células elicidadas poderem ser usadas em ensaios de biotransformação; 6) em alguns sistemas se verificar a produção de compostos novos, não detectados na planta (Eilert, 1987; Constabel, 1990).

O metabolismo secundário das células em cultura pode ser despoletado pela adição de preparados complexos de elicitadores obtidos a partir de vírus, bactérias ou fungos. Tais homogeneizados apresentaram, em muitos casos, actividade superior à dos compostos activos isolados, devido ao efeito sinérgico dos elicitadores (Eilert, 1987). Na Tabela 1.2 estão representados vários exemplos de elicitadores utilizados em cultura de células vegetais:

Tabela 1.2. Elicitadores geralmente utilizados para induzir a acumulação de metabolitos secundários em cultura de células vegetais

Elicitador	Preparação
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Filtrados, extractos e homogenados
<i>Eurotium rubrum</i>	Filtrados e extractos
<i>Micromucor isabellina</i>	Filtrados e extractos
<i>Chrysosporium palmorum</i>	Filtrados e extractos
<i>Botrytis</i> sp.	Homogenados
<i>Dendryphion</i> sp.	Extractos
<i>Aspergillus niger</i>	Homogenados
<i>Candida albicans</i>	Células autoclavadas
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Micélio autoclavado
Levedura	Preparação de hidratos de carbono
Nigerano	-

1.4. OBJECTIVOS DO TRABALHO

As Solanaceae e Leguminoseae são, do ponto de vista económico, duas das famílias mais importantes de plantas com flores. As suas espécies fornecem numerosos alimentos, forragens, corantes, gomas, óleos e resinas, sendo igualmente cultivadas como ornamentais. Além disso, é também nestas famílias que se encontram algumas das espécies de plantas medicinais com largo emprego, quer em Medicina tradicional, quer em preparados officinais.

Sabendo-se que, em condições de stress, muitos dos compostos produzidos pelas culturas de células vegetais possuem actividade bactericida e/ou fungicida, no presente trabalho teve-se como objectivo principal a produção de metabolitos de stress por cultura de células em suspensão de espécies da flora espontânea de Portugal: *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* (Leguminoseae) e *Hyoscyamus albus* (Solanaceae).

Para a elaboração dos correspondentes protocolos, teve-se em atenção os seguintes objectivos específicos:

- 1- Obtenção de culturas de células em suspensão e definição das condições de cultura necessários à obtenção de biomassa;
- 2- Identificação dos metabolitos produzidos pelas culturas, em condições de stress;

3- Definição das condições de cultura conducentes a uma produção aumentada dos compostos maioritários.

B. Ononis Natrix

Aspectos Gerais,

Estudo da Influência de Diversos Factores no Crescimento das Culturas de Células em Suspensão e na Acumulação de Medicarpina e Maackiaina

I. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS, DISTRIBUIÇÃO E UTILIZAÇÃO

Ononis natrix é uma espécie vivaz, da família das Leguminoseae que floresce durante todo o Verão. Possui uma corola papilionácea bem marcada, de cor amarela, frequentemente com nervuras vermelhas ou violáceas. Os caules, com 20-60 cm, apresentam tricomas glandulosos, por vezes, à mistura com tricomas não glandulosos. As vagens, com cerca de 10-25 mm de comprimento encerram sementes castanho escuras (Franco, 1984). Esta espécie aparece, tal como a sua congénere *Ononis spinosa*, nas pastagens e terrenos incultos da Europa (exceptuam-se o Norte da Europa e regiões montanhosas), África do Norte e Próximo Oriente (Font Quer, 1981; Kermalvezin, 1988). Em Portugal, encontra-se difundida no vales do Douro e do Tejo, no distrito de Lisboa em solo calcário ou basáltico, sudoeste e sudeste meridional (Franco, 1984).

Os princípios activos de *Ononis natrix* são idênticos aos de *Ononis spinosa* (Feliciano *et al.*, 1983). Encontram-se nas raízes e possuem propriedades essencialmente diuréticas. Neste órgão encontram-se também saponinas, tanino e ácido cítrico. A planta já era conhecida na Antiguidade, sendo utilizada como diurética, no tratamento de cálculos renais. Alguns autores recomendam-na, ainda, para o tratamento do reumatismo articular, doenças da bexiga e das vias urinárias, na icterícia e no combate à formação de cálculos urinários (Font Quer, 1981; Bianchini e Corbetta, 1978). A sua administração pode fazer-se sob a forma de infusão, à qual se junta, por vezes, funcho. Considerando alguns autores que grande parte dos princípios activos, é eliminada por evaporação, aconselha-se por isso, o seu emprego sob a forma de um extracto fluido ou em xarope (Font Quer, 1981; Bianchini e Corbetta, 1978).

1.2. A ACUMULAÇÃO DE FITOALEXINAS NA FAMÍLIA LEGUMINOSEAE

A família Leguminoseae está dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae (confinadas aos trópicos e subtropicais) e Papilionoideae (confinada essencialmente nas zonas temperadas) (Ingham, 1982a).

Uma das espécies da subfamília Papilionoideae é a produção de isoflavonóides, um grupo de compostos esporadicamente encontrado em espécies não pertencentes a esta subfamília.

Os isoflavonóides são compostos constitutivos, ou são produzidos em resposta a um factor de stress (fungo patogénico ou extracto de fungo, virose, radiação ultra-

violeta e sais de metais pesados) (Ingham, 1981a; Ingham, 1982a; Smith e Banks, 1986).

Todos os isoflavonóides possuem um esqueleto 1,2-difenilpropano (Fig. 1.1) que, salvo no caso raro das α -metildesoxibenzoínas constitutivas, se modifica para dar origem a um anel O-heterocíclico central (pirano). Deste modo, os isoflavonóides podem ser considerados como compostos derivados do 3-fenilcromano (Fig. 1.2) (Ingham, 1982a).

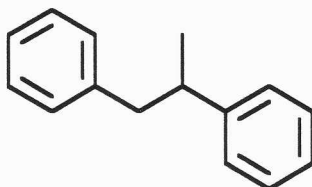


Fig. 1.1. Esqueleto 1,2-difenilpropano, comum a todos os isoflavonóides.

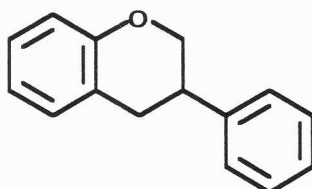


Fig. 1.2. Esqueleto 3-fenilcromano presente na maioria dos isoflavonóides.

Os isoflavonóides podem dividir-se em seis grandes classes atendendo ao grau de oxidação dos anéis heterocíclicos da molécula: isoflavonas, isoflavanonas, isoflavanos (Fig. 1.3), pterocarpanos, pterocarpenos e cumestanos (Fig. 1.4). Estes compostos podem apresentar graus diversos de hidroxilação, metilação e prenilação (Smith e Banks, 1986; Dewick, 1991).

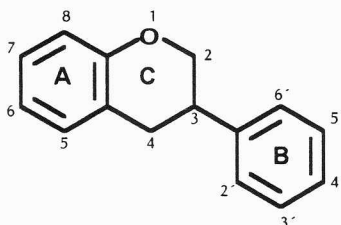


Fig. 1.3. Esqueleto comum das isoflavonas, isoflavanonas e isoflavanos.

Todas as fitoalexinas isoflavonóides, encontradas nas leguminosas, são oxigenadas nos carbonos C-7 e C-4', no caso das isoflavanonas, isoflavonas e isoflavanos, e nos carbonos C-3 e C-9, nas restantes classes (Ingham, 1982a).

Um pequeno número de espécies produz fitoalexinas não pertencentes ao grupo dos isoflavonóides: benzofuranos, cromonas, flavanonas, furanoacetilenos e estilbenos (Ingham, 1982a). Em alguns casos (*Lablab niger*, *Lathyrus odoratus* e *Vicia faba*) verifica-se a coexistência dos dois tipos de fitoalexinas. Noutros, porém, (*Arachis* e membros do género *Vicia*, excluindo *V. faba*) não se conhecem a síntese de isoflavonóides (Ingham, 1982a).

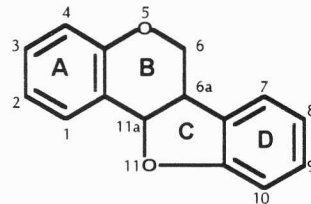


Fig. 1.4. Esqueleto comum dos pterocarpanos, pterocarpenos e cumestanos.

Isoflavonas- De um modo geral, as isoflavonas não são consideradas fitoalexinas, porquanto são metabolitos secundários constitutivos de diversas espécies (Stoessl, 1982).

Isoflavanonas- A kievitona é provavelmente o composto melhor conhecido, de entre as várias fitoalexinas, pertencentes a esta classe. Admite-se que as isoflavanonas se formem por redução das isoflavonas (Stoessl, 1982).

Pterocarpanos e isoflavanos- Muitas das fitoalexinas descritas pertencem a esta classe de compostos. Devido à sua relação biogenética, os pterocarpanos e isoflavanos surgem sempre descritos em conjunto. Em algumas espécies, os dois tipos de compostos ocorrem em simultâneo, podendo, nalguns casos, haver mesmo interconversão "in vivo" (Stoessl, 1982).

A medicarpina e a maackiaina são dois pterocarpanos isolados de várias espécies de Leguminosae. A medicarpina é, no entanto, o pterocarpano mais largamente difundido na natureza (Williams e Harborne, 1989). Estes dois compostos foram detectados em, pelo menos, 15 espécies de *Cicer* (Ingham, 1981a; Jaques *et al.*, 1987) elicítadas com fungo. Foram igualmente detectados em mais de 55 espécies de *Trifolium*, elicítadas com suspensões de esporos de *Helminthosporium carbonum* (Ingham, 1976a; Ingham, 1978; Ingham, 1990), em várias espécies de *Caragana*, *Trigonella* (Ingham, 1979a; Ingham, 1981b), *Medicago* (Ingham, 1979b), *Tephrosia* (Ingham e Markham, 1982) e em *Parochetus communis* e *Factorovskia ascherisoniana* (Ingham, 1979c). Em espécies de *Passaea* e *Ononis* a medicarpina e maackiaina foram detectadas apenas em folhas jovens sujeitas a radiação UV (254 nm) (Ingham, 1982b).

Os isoflavanos, vestitol e sativano, são duas fitoalexinas com elevada actividade antifúngica. Estudos recentes revelaram que a genisteína e outros isoflavanos com dois grupos hidroxilo e um grupo metoxilo, possuem forte actividade fungitóxica, enquanto isoflavanos com dois ou três grupos metoxilo são praticamente inactivos (Weidenborner *et al.*, 1990).

Pterocarpenos- Estes compostos caracterizam-se por possuírem um espectro de absorção no UV similar ao dos estilbenos. Ericristagalina é um exemplo de um pterocarpeno com actividade antimicrobiana, detectada nas raízes de *Erythrina cristagalli* (Williams e Harborne, 1989).

Cumestanos- O estatuto destes compostos, como fitoalexinas, é incerto, porque, embora tenha sido descrita a sua acumulação na sequência de infecções, não se lhes reconheceram propriedades antifúngicas. No entanto, são-lhes atribuídas propriedades bactericida e nematodocida. (Stoessl, 1982).

Dentro dos isoflavonóides, os cumestanos são os compostos que apresentam níveis mais elevados de oxidações. O cumestrol é o composto melhor conhecido e estudado dentro desta classe, ocorrendo na natureza, com pelo menos mais trinta e um outros cumestanos de estrutura conhecida. Estes compostos aparecem numa grande variedade de tecidos vegetais e parecem ser em resposta a situações de stress (Williams e Harborne, 1989).

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

O trabalho foi efectuado em cultura de células em suspensão de *Ononis natrix* obtidas a partir de *calli*. Os *calli* foram obtidos, quer de folíolos ou secções de pecíolos, de plantas recolhidas na Costa da Caparica, costa Oeste de Portugal, quer de secções de hipocótilos de germinantes obtidos assepticamente. As sementes utilizadas foram também colhidas na Costa da Caparica.

Em alguns ensaios de elicitação utilizaram-se preparados obtidos de micélio de *Phytophthora cinnamomi* e de células de *Candida albicans*.

1.2. REAGENTES E SOLVENTES

Excepto o hipoclorito de cálcio, utilizado na esterilização do material vegetal, todos os outros reagentes bem como os solventes empregues foram de qualidade analítica ou purificados pelas técnicas habituais.

Na cromatografia em camada delgada analítica utilizaram-se placas de gel de sílica 60 F₂₅₄, em suporte de alumínio (Merck n^o 5564) e na cromatografia de camada delgada preparativa utilizaram-se placas de gel de sílica 60 F₂₅₄, em suporte de vidro (Merck n^o 5717) ou de alumínio.

2. MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DE CALLI E DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.1.1. GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *ONONIS NATRIX*

As vagens foram desinfectadas superficialmente com uma solução de hipoclorito de cálcio comercial a 10 % (p/v), durante 20 min, com agitação, tendo-se seguido uma lavagem cuidadosa com água destilada e esterilizada. As sementes foram então removidas, colocadas em água destilada e esterilizada, durante 3-4 h, e desinfectadas com uma solução de hipoclorito de cálcio comercial 10 % (p/v), durante 20 min. Seguiu-se uma lavagem com água destilada e esterilizada.

As sementes foram inoculadas em meio Schulz (1981) (Tabela 2.1) ou em meio base MS (Murashige e Skoog, 1962) (Tabela 2.2), solidificado com 0,8 g/l de agar.

As sementes inoculadas foram mantidas às escuras, a 24 ± 1 °C até à eclosão dos cotilédones, tendo em seguida sido transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h ($37 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - lâmpadas fluorescentes "day-light") a 24 ± 1 °C.

Tabela 2.1. Meio de Shulz (1981)

Nutrientes	mg/ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$	250
KCl	250
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1000
EDTA, 2Na	20
Agar	8000

2.1.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE *CALLI*

Para a obtenção de *calli*, utilizaram-se, como explantes primários, folíolos e secções de pecíolo, com 0,5 cm comprimento, e de hipocótilos, obtidos de plantas germinadas *in vitro*.

No caso do material colhido no campo, procedeu-se a uma desinfecção prévia com uma solução de hipoclorito de cálcio 6 % (p/v), durante 10-15 min, com agitação. Depois de lavados com água destilada e esterilizada, os explantes foram inoculados em diferentes meios de cultura (Tabela 2.2). Em qualquer dos casos, os meios foram suplementados com 20 g/l de sacarose, 20 mg/l de ácido ascórbico (anti-oxidante) e com as regulações hormonais referidas na Tabela 2.3. O pH foi ajustado para 5,7 depois de se ter adicionado o agar (0,8 g/l).

2.1.3. OBTENÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

As culturas de células em suspensão foram iniciadas por transferência de 2-3 *calli* friáveis, com 3 semanas de subcultura, mantidos em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, para erlenmeyers de 250 ml, contendo 50 ml de meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin. Em ambos os casos, o ácido ascórbico foi substituído por 50 mg/l de cisteína, a qual foi suprimida do meio após 3-4 repicagens. As culturas foram mantidas às escuras, a 24 ± 1 °C, sob agitação orbital.

As primeiras repicagens foram efectuadas, com intervalos de 8 dias, por decantação do meio de cultura e sua substituição por 50 ml de meio fresco. Após o estabelecimento das suspensões, as repicagens subsequentes foram efectuadas com intervalos de 12 dias, pelo método da pipetagem. A 50 ml de meio de cultura fresco adicionaram-se 10 ml da suspensão de células devidamente homogeneizada.

As suspensões estabelecidas foram utilizadas em diversos ensaios. Sempre que, nesses ensaios se introduziram alterações à composição do meio de cultura, os correspondentes registos só foram efectuados após 3-4 repicagens nas novas condições. Por outro lado, todos os ensaios decorreram às escuras, a 24 ± 1 °C, sob agitação orbital.

Tabela 2.2. Meios de cultura ensaiados na indução de *calli**

Nutrientes (mg/l)	MS	SH	B5
<u>Macronutrientes</u>			
NH ₄ NO ₃	1650	-	-
KNO ₃	1900	2500	3000
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	200	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	400	500
KH ₂ PO ₄	170	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	-	150
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	300	-
KCl	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	134
<u>Micronutrientes</u>			
MnSO ₄ .H ₂ O	22,300	10,000	10,000
H ₃ BO ₃	6,200	5,000	3,000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600	1,000	2,000
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250	0,100	0,250
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,200	0,025
KI	0,830	1,000	0,750
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,100	0,025
<u>Fonte de Ferro</u>			
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	37,3	20	37,3***
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,7	15	27,7***
<u>Aditivos</u>			
Mio-inositol	100,0	1000,0	100,0
Tiamina.HCl	0,1	5,0	10,0
Ácido nicotínico	0,5	5,0	1,0
Piridoxina.HCl	0,5	0,5	1,0
Cistefina	50,0	-	50,0
Glicina	2,0	-	-
<u>Fonte de carbono</u>			
Sacarose	20**	30	20
pH	5,7	5,9	5,5

* Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem, a 1 atm, 120 °C, durante 20-25 min.

** Alteração da quantidade de sacarose de 30 g/l para 20 g/l.

*** Alteração à fonte de ferro do meio B5.

Tabela 2.3. Meios base e combinações de reguladores de crescimento usados na indução de *calli* de *Ononis natrix*

	2,4-D mg/ml	NAA mg/ml	BA mg/ml	Kin mg/ml
Meio MS	1,0	-	-	1,0
	1,0	-	1,0	-
	-	1,0	1,0	-
	0,5	-	-	1,0
Meio SH	1,0	-	-	1,0
	1,0	-	1,0	-
	-	1,0	1,0	-
Meio B5	1,0	-	-	1,0

As inoculações primárias e bem assim os *calli* foram mantidos em fotoperíodo de 16 h, a 24 ± 1 °C. Os *calli* foram subcultivados com intervalos de 30-40 dias.

2.1.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.1.4.1. Determinação do crescimento celular pelo método do peso seco

As amostras de células em suspensão, de 2 erlenmeyers, foram filtradas sob vácuo, em intervalos de tempo regulares, congeladas durante 12 horas e o peso seco determinado após liofilização a uma pressão de 10^{-1} mbar, a -42 °C, durante 48 horas.

2.1.4.2. Determinação do crescimento pelo método de dissimilação

Da fonte de carbono utilizada nas culturas de células heterotróficas, uma parte é convertida em biomassa e a outra é dissimilada, após degradação para obtenção de energia. Por cada mole de CO₂ formada é consumida uma mole de oxigénio. A libertação de dióxido de carbono para a atmosfera, como resultado da dissimilação, provoca, ao longo do tempo, a diminuição de peso das culturas, que pode ser utilizada para seguir o crescimento das células. Este método requer, contudo, condições especiais: só podem ser utilizadas rolhas com poro de dimensão reduzida e controlada (rolhas de silicone T-32 Shin-Etsu Polymer-Silicosen, Freudenberg Simrit, Holanda) e balança de precisão (Sartorius L420S-*RC, gama 0-420 g, precisão 1 mg). A necessidade de se utilizarem rolhas de poro controlado deve-se ao facto de ser necessário introduzir um factor de correcção para a perda de água por evaporação (Schripsema *et al.*, 1990).

Durante o ciclo de crescimento celular há um período de tempo (fase exponencial) em que a velocidade de aumento de biomassa por unidade de concentração de biomassa (taxa específica de crescimento) é constante e mensurável.

Teoricamente, num curto intervalo de tempo, a taxa de variação de biomassa no tempo (dx/dt) é proporcional à própria quantidade de biomassa, segundo a equação: $dx/dt = \mu x$, em que x = biomassa no tempo t ; μ = taxa específica de crescimento ou velocidade de crescimento por unidade de biomassa. Por integração, obtém-se a equação: $x = x^0 \cdot e^{\mu t}$. Da logaritmização desta equação obtém-se a equação da recta: $\ln x = \mu t + \ln x^0$, a partir da qual se determina a taxa específica de crescimento μ .

O intervalo de tempo necessário para duplicar a quantidade de biomassa inicial designa-se por tempo de duplicação (t_d). Este parâmetro de crescimento é determinado de acordo com a equação $t_d = \ln 2 / \mu$.

Os erlenmeyers, com 50 ml de meio de cultura esterilizado por autoclavagem, foram colocados na agitadora orbital a 115 rpm, a 24 ± 1 °C, durante 6 dias, a fim de estabilizar a perda de água por evaporação.

No interior da câmara de fluxo laminar, os erlenmeyers foram tarados, antes de se proceder à inoculação, e as células (2 g/50 ml, p. f.), filtradas assepticamente, sob vácuo.

Decorridos 60 minutos após a inoculação, os erlenmeyers foram pesados, já na sala de cultura, constituindo esta pesagem o valor do tempo 0 do ensaio. Para controlar a perda de peso por evaporação de água (branco), utilizaram-se 2 erlenmeyers contendo apenas meio de cultura.

As curvas de crescimento apresentadas correspondem à média de pelo menos 4 erlenmeyers.

2.1.4.3. Dimensão das células em suspensão

A dimensão das células em suspensão foi determinada, com base na média de, pelo menos, 20 medições aleatórias, usando para tal um micrómetro objectivo.

2.1.4.4. Viabilidade celular

A viabilidade das células foi determinada com diacetato de fluoresceína (FDA), segundo Larkin (1976). As células viáveis apresentam fluorescência amarelo-esverdeada, devido à acumulação de fluoresceína resultante da degradação do FDA, pelas esterases intracelulares.

A uma gota de suspensão de células adicionou-se uma gota de diacetato de fluoresceína a 0,5 % (p/v) em acetona, preparada no momento. Após 5 min à temperatura ambiente, as células foram observadas num microscópio de *epi*-fluorescência Leitz Wetzlar SM-Lux com filtro BG-12, na banda dos ultravioleta.

A percentagem de células viáveis foi determinada segundo a equação:

$$V \% = ncf \times 100 / nct$$

V%- percentagem de células viáveis

ncf- número de células fluorescentes

nct- número de células totais

2.1.4.5. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura

O estudo de mobilização dos hidratos de carbono foi efectuado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Amostras de 2 erlenmeyers foram colhidas, em intervalos de tempo regulares, e as células separadas do meio de cultura por filtração sob vácuo. Um mililitro de meio de cultura foi diluído 25 vezes em água destilada ultra pura e feito passar por um cartucho Sep Pak C-18 - Millipore. Vinte microlitros de amostra, assim preparada, foram, então, analisados por HPLC.

Para as culturas suplementadas com 50 e 80 mg/l de sacarose a diluição, previamente referida, foi de 1:50 e de 1:80, respectivamente.

2.1.4.5.1. Condições de análise

As análises foram efectuadas num cromatógrafo equipado com um detector de índice de refração, uma coluna Sugar-Pak I 300 mm x 6,5 d. i., instalada em forno a 90 °C, e um integrador. Como eluente utilizou-se uma solução de EDTA 0,05 g/l (p/v), com um fluxo de 0,5 ml/min. O eluente foi desgaseificado em banho de ultra-sons.

O teor em hidratos de carbono foi determinado pelo método do padrão externo, com um único ponto. Para o efeito, utilizaram-se 20 µl de uma solução de sacarose, frutose ou glucose na concentração de 0,506 mg/l, 0,236 mg/l e 0,219 mg/l, respectivamente. A média das leituras e o factor de correcção foram determinados com base em, pelo menos, 6 injeções.

Como a resposta do detector de índice de refração varia com a temperatura, procedeu-se em intervalos de 2 h, à injeção da solução padrão e de uma amostra de referência de concentração conhecida, a fim de avaliar possíveis alterações.

Para o tempo 0, utilizou-se meio de cultura esterilizado e não inoculado.

Os valores apresentados representam o valor médio de 2 injeções de um ensaio realizado em duplicado.

2.1.4.6. Mobilização do nitrato do meio de cultura

O estudo da mobilização do nitrato foi efectuado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Amostras de 2 erlenmeyers foram colhidas em intervalos de tempo regulares, e as células separadas do meio de cultura por filtração sob vácuo. O meio foi, em seguida, centrifugado a 10000 g, durante 10 min, e filtrado com filtro Millipore tipo HA, com poro com dimensão 0,45 µm diâmetro. Cinco microlitros de amostra, previamente diluídos 20 vezes, em água destilada ultra pura, foram analisadas por HPLC.

2.1.4.6.1. Condições de análise

As análises foram efectuadas num cromatógrafo, equipado com detector UV-VIS (210 nm), uma coluna aminopropil (Carbohydrate analysis, Waters) 300 mm x 3,9 mm d. i, de aço inoxidável, com partículas de diâmetro 10 µm, acoplado a um registador.

Como eluente utilizou-se uma solução de KH_2PO_4 (10 g/l p/v), ajustado para pH 3 com H_3PO_4 , com um fluxo de 2 ml/min.

O teor em nitratos foi determinado pelo método do padrão externo com um único ponto. Para tal, injectaram-se 5 µl de uma solução de KNO_3 e NH_4NO_3 (1,9 g/l e 1,65 g/l, respectivamente), diluídos 20 vezes com água destilada ultra pura.

A média das leituras e o factor de correcção foram determinados com base em, pelo menos, 6 injeções.

Para avaliar possíveis alterações das condições analíticas, no que diz respeito à resposta do detector, procedeu-se, entre cada 10-15 análises, à injeção da solução padrão e de uma amostra de referência de concentração conhecida.

Para a determinação do teor em nitrato, no tempo 0, utilizou-se meio de cultura esterilizado e não inoculado.

Os valores apresentados correspondem ao valor médio de 2 injeções de um ensaio realizado em duplicado.

2.1.4.7. Mobilização do amónio do meio de cultura

Neste estudo utilizou-se o método colorimétrico de doseamento do amónio, que se baseia na detecção, a 625 nm, do indofenol formado como produto da reacção fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967).

Amostras de 2 erlenmeyers foram colhidas, em intervalos de tempo regulares, e as células separadas do meio de cultura por filtração sob vácuo. Cem microlitros foram diluídos 100 vezes em água destilada ultra pura. A 1 ml desta amostra adicionaram-se 5 ml da solução A, e agitou-se vigorosamente, num vórtex, durante 1 min. Seguidamente, adicionaram-se 5 ml da solução B, agitou-se vigorosamente e deixou-se repousar, à temperatura ambiente, durante, pelo menos, 40 min. Findo este período, procedeu-se à leitura da absorvência a 625 nm, num espectrofotómetro.

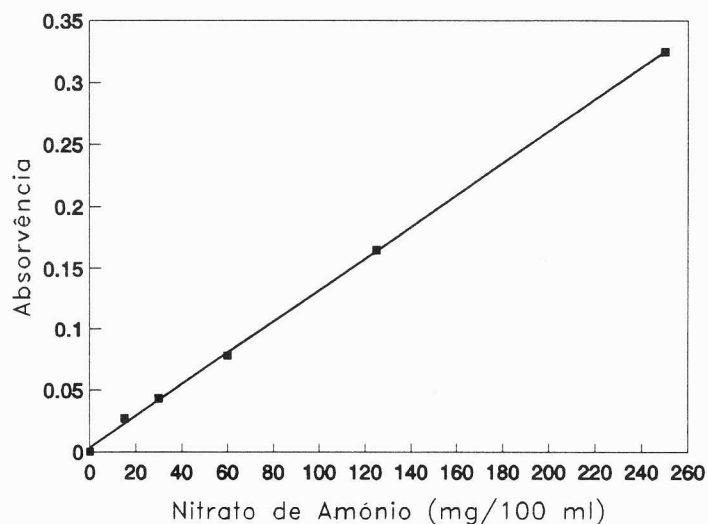


Fig. 2.1. Curva padrão da quantidade de nitrato de amónio.

Solução A: Solução de fenol a 1 % (p/v) em água destilada ultra pura, contendo 0,005 % (p/v) de nitroprussiato de sódio;

Solução B: Solução de hidróxido de sódio a 0,5 % (p/v) em água destilada ultra pura, contendo 0,84 % (p/v) de hipoclorito de sódio a 10 %.

As soluções devem ser preparadas de fresco e mantidas em frascos escuros.

Para a determinação da curva de calibração, utilizaram-se soluções de NH_4NO_3 de concentrações diversas (0 - 250 mg/100 ml; p/v). Em todos os casos, as soluções foram diluídas 100 vezes em água destilada ultra pura.

Pela regressão linear, pelo método dos mínimos quadráticos, dos valores do gráfico da Figura 2.1. permitiu obter a equação da recta:

Absorvência = $0,01287 \text{ mg}/100 \text{ ml NH}_4\text{NO}_3 + 0,003368$, com coeficiente de correlação $R=0,9997$.

2.1.5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.1.5.1. Densidade de inóculo

Nestes ensaios utilizaram-se duas densidades de inóculo: 2 g/50 ml e 2,5 g/50 ml (p. f.). O inóculo, obtido após filtração asséptica sob vácuo, foi inoculado em erlenmeyers contendo 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ou 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

O crescimento celular foi seguido pelo método de dissimilação.

2.1.5.2. Tempo de subcultura

O efeito do tempo, entre repicagens, sobre o crescimento celular, foi estudado utilizando culturas com 12, 16 e 21 dias de subcultura. As células (2 g/50 ml; p.f.) obtidas de culturas com 12 e 16 dias de subcultura foram inoculadas em 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. As células (2 g/50 ml; p. f.) com 12 e 21 dias de subcultura foram inoculadas em 50 ml de meio líquido MS suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

O crescimento celular foi seguido pelo método de dissimilação.

2.1.5.3. Fonte de carbono

A influência da fonte de carbono, no crescimento das células, foi testada, transferindo 2 g (p. f.) de células, obtidas por filtração asséptica sob vácuo para erlenmeyers com 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 1) 20 g/l sacarose, 2) 20 g/l glucose ou 3) 20 g/l frutose.

Estas culturas foram também utilizadas em estudos de mobilização de hidratos de carbono, nitratos e amónio do meio de cultura.

O crescimento foi seguido pelos métodos de dissimilação e peso seco.

2.1.5.4. Concentração de sacarose

A influência da concentração de sacarose, no crescimento das células, foi testada, transferindo 2 g (p. f.) de células, obtidas por filtração asséptica sob vácuo, para erlenmeyers contendo 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. As concentrações de sacarose ensaiadas foram: 1) 10 g/l; 2) 20 g/l; 3) 30 g/l; 4) 40 g/l; 5) 50 g/l; 6) 60 g/l; 7) 80 g/l.

O crescimento celular foi seguido pelo método de dissimilação. Nas culturas mantidas em meio suplementado com 20, 50 e 80 g/l de sacarose utilizou-se, ainda, o método do peso seco.

As culturas mantidas em meio suplementadas com 10, 20, 50 e 80 g/l de sacarose foram, ainda, alvo de estudo no que diz respeito à mobilização de açúcares (sacarose, glucose e frutose) e azoto (amónio e nitratos) do meio de cultura.

2.1.5.5. Concentração da fonte de azoto

A influência da concentração da fonte de azoto, no crescimento das células, foi testada, transferindo 2 g (p. f.) de células, obtidas por filtração asséptica sob vácuo, para erlenmeyers contendo 50 ml de meio líquido MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin. As concentrações ensaiadas foram: 1) variação A: 1,9 g/l KNO_3 e 1,65 g/l NH_4NO_3 ; 2) variação B: 1,9 g/l NH_4NO_3 e 1,65 g/l KNO_3 ; 3) variação C: 4 g/l KNO_3 ; 4) variação D: 3,2 g/l NH_4NO_3 .

O crescimento celular foi seguido pelos métodos de dissimilação e peso seco.

Nestas culturas procedeu-se ao estudo de mobilização dos açúcares, amónio e nitrato do meio de cultura.

2.1.5.6. Regulação hormonal

Nestes ensaios, inocularam-se 2 g (p. f.) de células em 50 ml de meio líquido MS suplementado com 20 g/l de sacarose e uma das seguintes combinações hormonais: 1) 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin; 2) 0,5 mg/l NAA; 3) 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin; 4) 1 mg/l Kin; 5) 0,5 mg/l 2,4-D; 6) 0,5 mg/l IBA e 1 mg/l Kin; 7) 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l BA.

O crescimento celular foi seguido pelo método de dissimilação.

As culturas mantidas nas condições referidas nas alíneas 1), 2), 3), 4) e 5) foram também utilizadas em estudos de mobilização dos hidratos de carbono, nitrato e amónio.

2.1.5.7. Concentração de CuSO_4

Dois gramas (p. f.) de células foram inoculadas em 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ao qual se adicionaram 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

O crescimento celular foi seguido pelos métodos de dissimilação.

2.2. MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO E NA PLANTA

2.2.1. ACUMULAÇÃO DE MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.2.1.1. Extração da medicarpina e da maackiaina do meio de cultura

O meio de cultura (100 ml) das suspensões, mantidas em meio MS suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em fase estacionária, foi separado das células, por filtração sob vácuo e extraído, por três vezes, com alíquotas de 25 ml de acetato de etilo. As frações orgânicas foram juntas e evaporadas à secura em evaporador rotativo, a 40 °C. O resíduo foi retomado com acetato de etilo, transferindo para um frasco de derivatização e o solvente evaporado sob uma ligeira corrente de azoto.

2.2.1.2. Purificação da medicarpina e da maackiaina por cromatografia em camada delgada semipreparativa

O resíduo obtido em 2.2.1.1. foi retomado com cerca de 1 ml de clorofórmio e a solução aplicada, em risco contínuo sobre uma placa de sílica gel Merck 60 F₂₅₄, com suporte de vidro e com 1 mm de espessura de camada adsorvente. A placa foi eluída, por 8 vezes, com uma mistura de *n*-pentano : éter etílico : ácido acético (75 : 25 : 1), em câmara de desenvolvimento ascendente com saturação.

A mancha maioritária correspondente à medicarpina e à maackiaina foi recuperada, por raspagem da camada adsorvente, e a sílica extraída, por 5 vezes, com alíquotas de 20 ml de metanol. Em cada extração, a sílica foi separada do metanol por centrifugação a 6000 g, durante 10 min. As frações obtidas, foram juntas e evaporadas à secura, em evaporador rotativo a 40 °C. O resíduo foi retomado com clorofórmio e utilizado nos ensaios subsequentes: GC, GC-MS, UV, ¹H-NMR.

2.2.1.3. Identificação da medicarpina e da maackiaina

2.2.1.3.1. Detecção de fenóis em placa

A amostra obtida em 2.2.1.1. foi aplicada, pontualmente, sobre uma placa de sílica gel 60 F₂₅₄ com suporte de alumínio, 5 x 10 cm, com 0,25 mm de espessura de camada adsorvente e eluída como descrito em 2.2.1.2.. Depois de seca sob uma corrente de ar quente, a placa foi revelada com *p*-nitroanilina diazotizada.

2.2.1.3.1.1. *Preparação de nitroanilina diazotizada*

Foram misturados, a frio, 5 ml de uma solução de 4-nitroanilina 0,5 % (p/v) em HCl 2 M, 0,5 ml de uma solução aquosa de nitrito de sódio 5 % (p/v) e 15 ml de uma solução aquosa de acetato de sódio 20 % (p/v).

2.2.1.3.2. Derivatização das amostras

Acetilação

Num frasco de derivatização, de paredes espessas, adicionaram-se 5 µl de piridina e 5 µl de anidrido acético a 100 µg de amostra obtida em 2.2.1.2.. Esta mistura foi aquecida, durante 1 h, 120 °C. Depois de arrefecida à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob uma ligeira corrente de azoto, o resíduo retomado com acetato de etilo e analisado por CG-MS.

Trimetilsililação

Num frasco de derivatização, de paredes espessas, adicionaram-se 5 µl de piridina e 5 µl de BSTFA a 100 µg de amostra obtida em 2.2.1.2.. A mistura foi deixada a reagir, durante 30 min, a 80 °C. Depois de arrefecida à temperatura ambiente, a mistura foi usada directamente em ensaios de GC-MS.

Metilação

Num frasco de derivatização, de paredes espessas, dissolveram-se 100 µg de amostra obtida em 2.2.1.2. em 5 µl de metanol. Em seguida, adicionou-se, em excesso, uma solução etérea de diazometano. A mistura foi deixada a reagir à temperatura ambiente, durante 5 dias. Findo este período, o solvente foi evaporado sob

uma ligeira corrente de azoto, o resíduo retomado com acetato de etilo e analisado por GC-MS.

2.2.1.3.2.1. *Preparação do diazometano*

Foram dissolvidos, em banho de gelo, 2,14 g de N-metil-N-nitrosotolueno-4-sulfonamida em 300 ml de éter etílico. Seguidamente foram adicionados 10 ml de uma solução de KOH a 4 % (p/v) em etanol a 96 % (v/v). Os precipitados formados foram dissolvidos, adicionando pequenos volumes de etanol. A mistura foi deixada a reagir, à temperatura ambiente, durante 5 min, e a fracção etérea destilada em banho-maria. Na destilação do diazometano não foram utilizados reguladores de ebulição conhecida que é a facilidade de decomposição do diazometano em contacto com superfícies rugosas.

2.2.1.3.3. Condições de análise

2.2.1.3.3.1. *Cromatografia gás líquido acoplada a espectrometria de massa*

A amostra obtida em 2.2.1.2., bem como os respectivos derivados foram analisados por cromatografia gás líquido / espectrometria de massa (GC-MS). Nestes ensaios, utilizou-se um cromatógrafo Carlo Erba 6000 Vega equipado com uma coluna de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, DB-1, (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 µm espessura de filme; J & W Scientific Inc.) acoplada a um detector de captura iónica Finnigan MAT 800 (Ion Trap Detector).

Condições de operação

- A temperatura do forno foi programada de 220 a 280 °C, com incrementos de 5 °C / min. Atingidos os 280 °C, a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min.
- Temperatura do injector, 300 °C.
- Temperatura da linha de transferência, 290 °C.
- Temperatura da fonte de ionização, 220 °C.
- Gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm / s.
- Corrente de ionização, 60 µA.
- Tempo de varrimento, 1s.
- Relação de repartição de fluxo, 1:40.
- Volume de amostra injectado, 0,2-0,4 µl.

2.2.1.3.3.2. *Espectrofotometria ultravioleta*

A amostra obtida em 2.2.1.2. foi injectada num cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), equipado com uma coluna semipreparativa μ Bond Pak RP18 (250 mm x 4 mm, 10 μ m), um detector de matriz de díodo Waters, tipo LCD 725, a operar entre os 200 nm e 400 nm, e a um sistema computadorizado de aquisição de dados. Utilizou-se um gradiente linear de 20 % de acetonitrilo até 50 %, em ácido fosfórico 0,5 %, durante 50 min. O fluxo utilizado foi de 0,8 ml/min.

2.2.1.3.3.3. *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão ($^1\text{H-NMR}$)*

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos num espectrómetro Bruker WM-300, equipado com um sistema de análise de dados Aspect 2000, a operar a 300 MHz. As amostras foram dissolvidas em Clorofórmio Deuterado, contendo 1 % de tetrametilsilano (TMS), como padrão interno.

2.2.1.4. **Extracção e quantificação da medicarpina e da maackiaina**

2.2.1.4.1. Extracção e quantificação da medicarpina e da maackiaina extracelulares

Em intervalos de tempo regulares, durante o ciclo de crescimento celular, retiraram-se dois erlenmeyers e separaram-se as células do meio de cultura por filtração sob vácuo. A 20 ml de meio de cultura, adicionaram-se 0,2 ml de ácido acético e 0,4 ml de uma solução metanólica de padrão interno (7-acetoxi-4-metilumbeliferona) a 0,075 % (p/v). A solução foi, então, passada por um cartucho Sep-Pak C18-Waters Millipore. Depois de lavado com 10 ml de água destilada, o cartucho foi eluído, por duas vezes, com 10 ml de metanol. A solução metanólica foi evaporada à secura, em evaporador rotativo a 40 °C, o resíduo recuperado com clorofórmio e a solução concentrada sob uma ligeira corrente de azoto, e analisada por GC.

Os ensaios foram feitos em duplicado e os valores obtidos correspondem a, pelo menos, 3 injeções de cada amostra.

2.2.1.4.2. Extracção e quantificação da medicarpina e da maackiaina intracelulares

As células obtidas em 2.2.1.4.1. foram liofilizadas, durante 48 h, pesadas e postas a macerar em 40 ml de metanol (1 g células : 40 ml), durante 48 horas, com agitação ocasional. As células foram, em seguida, separadas do macerado metanólico, por filtração, sob vácuo. Adicionaram-se 0,2 ml de uma solução metanólica do

padrão interno (acetoxi-4-metilumbeliferona) a 0,075 % a 10 ml do macerado e fez-se passar por um cartucho Sep-Pak C18-Waters Millipore. Depois de lavado com 10 ml de água destilada, o cartucho foi eluído, por duas vezes, com 10 ml de metanol. A solução metanólica foi evaporada à secura, em evaporador rotativo a 40 °C, o resíduo recuperado com clorofórmio e a solução concentrada sob uma ligeira corrente de azoto e analisado por GC.

Os ensaios foram feitos em duplicado e os valores obtidos correspondem a, pelo menos, 3 injeções de cada amostra.

2.2.1.4.3. Extracção dos glicoconjugados da medicarpina e da maackiaina intracelulares

As células de culturas mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, com 6 dias de subcultura, foram separadas do meio de cultura, por filtração sob vácuo, liofilizadas a uma pressão de 10^{-1} mbar, a -42 °C, durante 48 h, e extraídas por duas vezes, com acetona, a -20 °C, e uma vez com uma mistura de metanol : acetona 1:1 (v/v). O extracto foi evaporado à secura em evaporador rotativo a 40 °C e o resíduo retomado com metanol, dividido em volumes iguais, e o solvente evaporado em evaporador rotativo a 40 °C.

2.2.1.4.3.1. *Hidrólise*

Um dos resíduos obtido em 2.2.1.4.3., foi dissolvido em 10 ml de uma solução aquosa de NaOH 1 M, e deixado em repouso, durante 30 min, à temperatura ambiente. Findo este período, a mistura foi neutralizada com uma solução de HCl 1 M. Seguidamente adicionaram-se 5 ml de uma solução de β -glucosidase (4.5 EU, Serva, Heidelberg FRG) a 0,025 % em tampão acetato 100 mM, pH 5, e a mistura foi deixada a reagir, durante 30 min, a 30 °C. Esta mistura bem como o outro resíduo obtido em 2.2.1.4.3. foram extraídos como descrito em 2.2.1.4.2., depois de se lhes adicionar o padrão interno.

2.2.1.4.4. Síntese de 7- acetoxi-4-metilumbeliferona (padrão interno)

Dissolveram-se, num tubo de ensaio, 100 mg de 4-metilumbeliferona, em 5 ml de uma solução de KOH 3 M. Em seguida, adicionaram-se 0,15 ml de anidrido acético, agitou-se vigorosamente, durante 30 s, num vórtex, e deixou-se em repouso, durante 30 min. Findo este período, o precipitado foi recuperado, por centrifugação, e lavado com uma solução de KOH 3 M e depois, abundantemente, com água

destilada, até completo desaparecimento do cheiro a ácido acético. O produto foi, então, recristalizado, por duas vezes, de metanol / água, separado das águas-mães, por centrifugação, e guardado num exsiccador, sob vácuo.

2.2.1.4.5. Cálculo do factor de resposta relativo da maackiaina

O factor de resposta relativo (K) foi calculado segundo a fórmula: $K = MA \times AP / MP \times AA$, utilizando-se o composto acetoxi-4-metilumbeliferona como padrão interno (AA=área da amostra; AP= área do padrão; MP=massa do padrão; MA=massa da amostra).

Num frasco de derivatização, dissolveram-se 0,6 mg de padrão interno (7-acetoxi-4-metilumbeliferona e 0,4 mg de maackiaina em 50 µl de acetato de etilo. O valor encontrado para o factor de resposta (K=1,20) corresponde ao valor médio de, pelo menos, 5 injeções.

Atendendo à analogia química entre a medicarpina e a maackiaina, o factor de resposta calculado para a maackiaina foi também utilizado para a determinação da concentração da medicarpina nas amostras.

2.2.1.4.6. Condições de análise

2.2.1.4.6.1. *Cromatografia gás-líquido de alta resolução*

As análises cromatográficas foram efectuadas num cromatógrafo Perkin Elmer 8600, equipado com um detector de ionização de chama, um sistema de tratamento de dados e uma coluna de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, DB-1 (30 m x 0,25 mm d. i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.)

Condições de operação

- A temperatura do forno foi programada de 220 a 300 °C, com incrementos de 5 °C/min. Atingidos os 300 °C, a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min.
- Temperatura do injector e detector, 300 °C.
- Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s.
- Relação de repartição de fluxo, 1:50.

2.2.1.5. **Influência de diversos factores na acumulação da medicarpina e da maackiaina nas culturas de células em suspensão**

2.2.1.5.1. Fonte de carbono

Foi estudado o efeito de três fontes de carbono diversas. Para o efeito, utilizou-se meio de cultura líquido MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, e 1) sacarose; 2) frutose ou 3) glucose.

2.2.1.5.2. Concentração de sacarose

Foi testado o efeito de três concentrações de sacarose: 20, 50 e 80 g/l.

2.2.1.5.3. Concentração da fonte de azoto

Nestes ensaios, estudou-se o efeito das variações referidas em 2.1.5.5..

2.2.1.5.4. Regulação hormonal

Estudou-se o efeito de quatro suplementações hormonais: 1) 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin; 2) 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin; 3) 0,5 mg/l IBA e 1 mg/l Kin; 4) 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l BA.

2.2.1.5.5. Concentração de CuSO_4

Foram testadas duas concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1) 0,025 mg/l; 2) 125 mg/l.

2.2.1.5.6. Adição de fenilalanina e acetato de sódio ao meio de cultura

Dois gramas (p. f.) de células foram inoculadas em 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ao qual se adicionaram 50 mg/l de acetato de sódio e 50 mg/l de fenilalanina. A fenilalanina foi adicionada aquando da subcultura, utilizando 2 ml de uma solução padrão a 0,125 % (p/v), filtrada por filtros Millipore com dimensão de poro de 0,2 μm .

2.2.1.5.7. Adição de elicitadores bióticos

2.2.1.5.7.1. Adição de *Candida albicans*

Pipetaram-se, assepticamente, 2 ml de uma suspensão de células de *C. albicans* a 5 % (p/v), em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose, para erlenmeyers contendo cerca de 50 ml de culturas de células em suspensão com 4, 7 e 14 dias de subcultura. As culturas foram mantidas às escuras, durante 3 dias, a 24 ± 1 °C e com agitação orbital (115 rpm).

2.2.1.5.7.1.1. Preparação do elicitador

As culturas de *Candida albicans* foram estabelecidas em meio líquido contendo 10 g/l de bactopectona, 20 g/l de glucose e 0,04 g/l de cloranfenicol. Dez mililitros de uma suspensão de *C. albicans* foram inoculados em 4 l de meio de cultura fresco e as culturas foram mantidas às escuras, à temperatura de 24 ± 1 °C, com agitação orbital (115 rpm). Logo que se obteve uma suspensão bastante turva, as culturas foram autoclavadas e decantadas. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado, por três vezes, com água destilada, e liofilizado. Do liofilizado, preparou-se uma suspensão a 5 % (p/v), em meio utilizado nas culturas das células vegetais, que foi autoclavada antes de ser inoculada.

2.2.1.5.7.2. Adição de *Phytophthora cinnamomi*

Pipetaram-se, assepticamente, 2 ml de uma suspensão de *Phytophthora cinnamomi* a 1,25 % (p/v), em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose, para erlenmeyers contendo cerca de 50 ml de culturas de células em suspensão com 14 dias. As culturas foram mantidas às escuras, durante 3 dias, a 24 ± 1 °C, com agitação orbital (115 rpm).

2.2.1.5.7.2.1. Preparação do elicitador

As culturas de *Phytophthora cinnamomi* foram estabelecidas em meio líquido contendo 20 g/l de sacarose e água da decocção de 250 g/l de ervilhas. As culturas foram mantidas às escuras, à temperatura de 24 ± 1 °C, sob agitação orbital (115 rpm). Logo que se obteve uma suspensão densa, as culturas foram autoclavadas e decantadas. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado, por 3 vezes, com água destilada, e liofilizado. Do liofilizado, preparou-se uma suspensão a

1,25 % (p/v), em meio utilizado nas culturas das células vegetais, que foi autoclavada antes de ser inoculada.

2.2.1.5.7.3. Adição de celulase

As culturas de células em suspensão (50 ml), com 14 dias de subcultura, foram inoculadas com 2 ml de uma solução aquosa de celulase (0,02 unidades/mg, extraído de *Trichoderma viride*, BDH) a 0,025 %, esterilizada por filtração com filtros Millipore, com poro de 0,2 µm de diâmetro.

Os processos de extracção e quantificação da medicarpina e da maackiaina, intra- e extracelulares, dos ensaios 2.2.1.5.1. a 2.2.1.5.6. e 2.2.1.5.7.1. a 2.2.1.5.7.3. foram idênticos aos previamente descritos em 2.2.1.4.1. e 2.2.1.4.2..

2.2.2. MEDICARPINA E MAACKIAINA NA PLANTA

2.2.2.1. Extracção e quantificação da medicarpina e maackiaina da planta

A parte aérea da planta, liofilizada (10 g p. s.), foi macerada à temperatura ambiente, por períodos de 24 h (3 vezes), com alíquotas de 50 ml de metanol. Os macerados foram juntos e extraídos com alíquotas de 50 ml de hexano até se tornarem, praticamente, incolores. A fracção metanólica foi evaporada à secura em evaporador rotativo, a 40 °C, e o resíduo retomado com de 20 ml de acetato de etilo. Esta fracção foi sujeita a extracção líquido-líquido com alíquotas de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 M. A fracção aquosa foi acidificada, até pH 4, com ácido acético, e sujeita a nova extracção com alíquotas de 20 ml de acetato de etilo. As fracções orgânicas, às quais foi adicionado 0,2 ml de uma solução metanólica de 7-acetoxi-4-metilumbeliferona (padrão interno) a 0,075 % (p/v), foram juntas e evaporadas à secura em evaporador rotativo a 40 °C. O resíduo foi recuperado com clorofórmio e analisado por GC e GC-MS.

2.2.3. ENSAIOS DE ACTIVIDADE

A actividade bactericida do extracto obtido em 2.2.1.2. foi ensaiada pelo método de inibição de crescimento de *Bacillus subtilis*.

Numa caixa Petri introduziram-se 10 ml de meio de crescimento, constituído por 10 g/l de sacarose, 5 g/l de Bacto peptona e 1,5 g/l Bacto extracto de levedura, fundido e mantido à temperatura de 46 °C, ao qual se adicionaram 0,1 ml de suspensão

de *B. subtilis*. Discos de papel de filtro, com 0,5 cm de diâmetro, foram embebidos com soluções etanólicas 50 % (v/v) em água do extracto obtido em 2.2.1.2. e colocados sobre as placas contendo o microrganismo. As placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 30 min e em seguida incubadas a 37 °C, em posição invertida.

Nos ensaios de controlo utilizaram-se discos embebidos com etanol 50 % (v/v).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS *IN VITRO*

1.1. OBTENÇÃO DE CALLI

1.1.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Os meios Schulz e MS, sem fitohormonas, revelaram-se igualmente eficientes para a germinação das sementes de *Ononis natrix*, tendo-se atingido taxas de germinação da ordem dos 70 %. Tal como na maioria das sementes das dicotiledóneas (Schenk e Hildebrandt, 1972; Gamborg, 1982), neste caso também não foi necessário utilizar reguladores de crescimento para a germinação *in vitro*.

1.1.2. SELECÇÃO DO EXPLANTE

Embora para o estabelecimento de culturas de *calli* se possa recorrer a explantes de origem diversa (raízes, embriões, sementes, folhas, flores, endosperma, pólen), reconhecida que é a totipotência celular, em *O. natrix* a resposta foi diversa consoante o explante usado. Os explantes de hipocótilos, obtidos por germinação asséptica das sementes, foram os que melhor reagiram à calogénese. Os folíolos e as secções de pecíolos oxidavam rapidamente, principalmente a nível das extremidades de corte, pese embora a utilização de ácido ascórbico como anti-oxidante.

Duas razões podem ser apontadas para a reacção diversa dos explantes às condições *in vitro*: 1) modificação do DNA dos explantes com tecidos diferenciados pode levar à perda de totipotência e 2) o tempo necessário à desdiferenciação dos explantes pode ser limitante, porquanto as células podem degenerar antes de se iniciar a divisão celular, necessária à formação do tecido caloso (Figueiredo, 1992). Além disso, a resposta do explante às condições *in vitro* depende do estágio fisiológico do tecido que, por sua vez, depende do balanço hormonal interno, da actividade metabólica em geral e da presença de certas moléculas inibidoras do crescimento, de ocorrência sazonal (Yeoman e Forche, 1980; Augé, 1982; Dixon, 1985). Neste contexto, a utilização de hipocótilos de germinantes, obtidos assepticamente, como explantes primários, é vantajosa pois, para além de se ultrapassarem os problemas de contaminação, está a empregar-se material com elevado potencial calogénico, atendendo à elevada actividade mitótica das células.

1.1.3. SELECÇÃO DO MEIO DE CULTURA E REGULAÇÃO HORMONAL

A composição do meio de cultura empregue na indução de *calli* é, para além da natureza e do tamanho do explante, um factor determinante. O meio de cultura é constituído, basicamente, por uma mistura de sais minerais, combinando os macro- e micronutrientes essenciais, e uma fonte de carbono, geralmente a sacarose. Além disso, aditivos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento são, na generalidade dos casos, essenciais à cultura de células vegetais (Carew e Staba, 1965; Yeoman e MacLeod, 1977).

Dos meios ensaiados para a indução de tecido caloso em *O. natrix*, apenas o meio MS, suplementado com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, se revelou eficiente. Os explantes inoculados nos restantes meios oxidavam rapidamente, necrosando antes de se verificar qualquer desdiferenciação. Os *calli* obtidos em meio MS apresentavam, contudo, uma ligeira oxidação e, conseqüentemente, um crescimento lento, pese embora a presença de ácido ascórbico.

Embora o meio SH se tenha revelado favorável à indução de *calli* em diversas espécies de dicotiledóneas, devido à relação carbono / azoto (C / N) elevada (Schenk e Hildebrandt, 1972), o mesmo não se verificou com *O. natrix*. No caso vertente, a elevada relação C / N pode ter sido determinante da oxidação acentuada, verificada nos explantes. A concentração elevada de sacarose (30 g/l) pode ter conduzido o metabolismo celular no sentido da síntese de compostos fenólicos (Phillips e Henshaw, 1977).

O meio B5 é caracterizado por uma relação nitrato / amónio relativamente elevada (30 / 1 mM). Por outro lado, a concentração de sacarose (20 g/l) é inferior à da dos restantes meios. Apesar da menor concentração deste açúcar e da menor relação C / N, a oxidação e necrose dos explantes permaneceram. Embora a menor concentração de amónio, neste meio, tenha sido considerada por Figueiredo (1992) como factor estimulante em *Achillea millefolium*, o mesmo não pode dizer-se em relação às culturas de *O. natrix*.

O meio MS, com uma relação nitrato / amónio mais equilibrada (29 / 31 mM) e com uma concentração de fosfato considerada mais adequada para a propagação vegetativa ou manutenção de *calli*, foi o que permitiu obter melhores resultados. Uma resposta mais rápida dos explantes de *Cynara cardunculus* e *Achillea millefolium* em meio MS foi também observada por Figueiredo (1987, 1992). O acastanhamento progressivo, verificado ao longo das sucessivas repicagens dos *calli* de *O. natrix*, pode dever-se à elevada concentração de amónio, inibidor de algumas enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Gamborg *et al.*, 1968). No entanto, como este meio apresenta também uma concentração relativamente elevada de sacarose (30 g/l), o

acastanhamento pode ter ficado a dever-se à alteração do metabolismo para a síntese de fenóis. Só foi possível manter culturas com crescimento activo quando se diminuiu a concentração de sacarose para 20 g/l e, simultaneamente, se fizeram inoculações em meio líquido.

Das combinações de fitorreguladores ensaiadas com o meio MS, a combinação 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin foi a que permitiu obter melhores resultados. Com efeito, a mistura 2,4-D / Kin tem sido considerada, por diversos autores, como a combinação mais eficiente para a indução de *calli* (Stafford *et al.*, 1986; Sakuta e Komamine, 1987; Mizukami *et al.*, 1988; Nigra *et al.*, 1989; Pintão, 1989; Figueiredo e Pais, 1991; Figueiredo, 1992).

Embora existam espécies vegetais que não necessitam de reguladores de crescimento exógenos para o estabelecimento das culturas de células, na generalidade dos casos é necessário fornecer auxinas e citocininas ao meio de cultura (Aitchison *et al.*, 1977). A presença de auxinas no meio é indispensável para estimular a síntese de RNA (mRNA, tRNA e rRNA) e, conseqüentemente, de proteínas necessária ao alongamento celular (Goodwin, 1983). Por seu turno, as citocininas promovem a divisão celular (Shah *et al.*, 1976), actuando como activadores específicos da mitose, da diferenciação, e retardam os processos de senescência (Goodwin, 1983).

1.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *ONONIS NATRIX*

As culturas de células em suspensão de *O. natrix* foram estabelecidas em meio líquido MS suplementado com 20 g/l de sacarose, 50 mg/l de cisteína, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin. A substituição do ácido ascórbico, utilizado nas culturas de *calli*, pela cisteína, deve-se ao facto de este composto, ser um anti-oxidante mais eficaz nas culturas em suspensão, inibindo a actividade das polifenoloxidasas, evitando assim o acastanhamento provocado pela acumulação dos produtos de oxidação dos fenóis (Anosike e Ojimetukwe, 1982). Além disso, o ácido ascórbico degrada-se rapidamente, no meio de cultura, com a autoclavagem, na presença de luz e em erlenmeyers sujeitos a agitação (Elmore *et al.*, 1990).

Em ambas as culturas, as células apresentavam-se isoladas ou formando pequenos agregados, com elevada viabilidade (95-98 %). As células eram, geralmente, alongadas com $112,5 \mu\text{m} \pm 13,6$ de comprimento e $32,5 \mu\text{m} \pm 2,3$ de largura e possuíam diversos amiloplastos. A proliferação dos amiloplastos pode dever-se, segundo Mingo-Castel *et al.* (1991), à presença de cinetina no meio de cultura.

As dimensões das células atrás referidas são ligeiramente superiores às descritas por Carew e Staba (1965) e Figueiredo (1992) noutras culturas, contudo, dentro dos

valores descritos por Scragg (1986), que refere como limites 40-200 μm de comprimento e 20-40 μm de diâmetro.

1.2.1. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DAS CULTURAS EM SUSPENSÃO DE *ONONIS MATRIX*

O crescimento celular, nas culturas de células vegetais em suspensão, pode ser aferido por vários métodos: volume celular, número de células, peso seco, peso fresco, teor em proteína, teor em DNA, condutividade do meio, viabilidade celular e índice mitótico (Dixon, 1985; Schripsema *et al.*, 1990). A curva de crescimento obtida é função directa do método utilizado (Schripsema *et al.*, 1991). Assim, refira-se por exemplo, que a curva de crescimento celular, determinada pelo método do peso seco atinge o seu máximo algum tempo antes da determinada pelo método do peso fresco. Tal facto parece estar intimamente associado ao alongamento e aumento do volume celulares, que ocorrem numa fase tardia. Já a curva, determinada com base na variação do número de células tem, regra geral, um perfil idêntico à do método do peso seco. Cada método apresenta limitações e problemas próprios, aos quais se juntam o elevado número de amostragens, geralmente necessário, e as contaminações, muito frequentes, por se tratarem de métodos invasivos.

O método baseado na determinação do número de células tem, como problema principal, a frequente ocorrência de agregados celulares nas culturas de células vegetais. No caso do método do peso fresco, é difícil evitar grandes flutuações, entre medições devidas à água do meio de cultura que adere às células. Deste modo, o método do peso seco é mais preciso e é, geralmente, mais utilizado. A determinação da condutividade do meio depende da concentração de nitrato, não podendo por isso, ser utilizada na comparação do crescimento de culturas mantidos em meios com formulação diversa.

Recentemente, Schripsema *et al.* (1990) desenvolveram um método não invasivo, para a determinação do crescimento celular. O método baseia-se, fundamentalmente, na perda de peso das culturas, por dissimilação da fonte de carbono. A diminuição do peso da cultura, ao longo do tempo é consequência da troca equimolar de oxigénio, utilizado na degradação dos açúcares, por dióxido de carbono.

Os estudos efectuados por Figueiredo (1992), com culturas de células em suspensão de *Achillea millefolium*, permitiram concluir que as curvas de crescimento, obtidas com base na variação do peso fresco ou na relação quantidade de proteína / peso seco apresentavam perfil idêntico às obtidas pelo método de dissimilação. Por outro lado, verificou, ainda, que o consumo dos açúcares do meio de cultura coincidia

com o atingir da fase estacionária, segundo o método de dissimilação. Dado tratar-se, ainda, de um método expedito e isento de riscos de contaminações, em alguns dos ensaios subsequentes, o crescimento celular das culturas em suspensão de *O. natrix*, foi determinado pelo método da dissimilação.

1.2.2. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *ONONIS NATRIX*

1.2.2.1. Densidade de inóculo

Nas culturas de células vegetais, o crescimento celular depende, de entre outros factores, da concentração de inóculo inicial (Figueiredo *et al.*, 1987; Sakuta e Komamine, 1987; Pedro *et al.*, 1990; Figueiredo e Pais, 1991). A densidade de inóculo inicial mais adequada, depende, ainda, da espécie em estudo, do meio de cultura base e regulação hormonal utilizados (Street, 1977). Por exemplo, culturas de células em suspensão de *Cynara cardunculus*, mantidas em meio T(NO₃)⁻ (Tulecke, 1966), necessitavam de um volume de inóculo inicial de 30 x 10³ cél./ml (Lima Costa, 1987), enquanto as culturas mantidas em meio B5 necessitavam apenas de 7 x 10³ cél./ml (Figueiredo, 1987).

Das duas concentrações ensaiadas (2 g/50 ml e 2,5 g/50 ml), para as culturas de *Ononis natrix*, verificou-se que quer nos meios suplementados com 2,4-D/Kin, quer com NAA/Kin, o inóculo de 2 g/50 ml era o que melhor crescimento celular induzia (Tabela 1.1).

Tabela 1.1. Tempos de duplicação das culturas de células em suspensão de *O. natrix* estabelecidas com diferentes quantidades de inóculo inicial e diferentes combinações de reguladores de crescimento

Densidade de inóculo g/50 ml (p. f.)	NAA/Kin Tempos de duplicação (h)	2,4-D/Kin Tempos de duplicação (h)
2,0	42,9	43,4
2,5	48,6	50,3

Ambas as concentrações de inóculo ensaiadas estão dentro dos valores geralmente utilizados noutras culturas (Bailey e Ollis, 1977; Figueiredo, 1992).

1.2.2.2. Tempo de subcultura

O intervalo de tempo entre repicagens é outro factor determinante do crescimento das células vegetais em suspensão.

As culturas em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS suplementado 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, e repicadas com intervalos de 12 dias apresentaram melhores taxas de crescimento ($0,0134.h^{-1}$) em relação às culturas repicadas com intervalos de 16 dias ($0,0105.h^{-1}$). Estas atingem também a fase estacionária cerca de 70 h mais tarde do que as primeiras (Fig. 1.1). Em ambas as culturas não se observou a fase de latência (Fig. 1.1). As diferenças encontradas parecem ficar a dever-se a uma necrose celular mais elevada nas culturas subcultivadas todos os 16 dias.

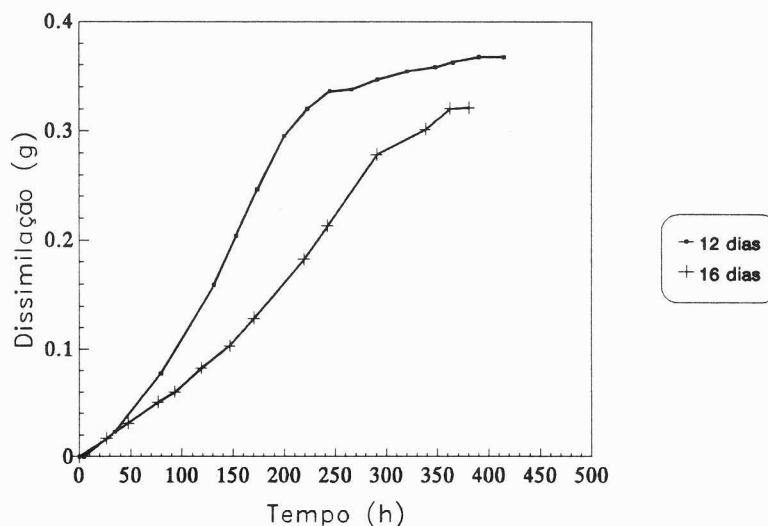


Fig. 1.1. Curvas de dissimilação das culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin com diferentes tempos de subcultura.

Nas culturas suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, e repicadas com intervalos de 12 ou 21 dias apresentaram também comportamentos diversos (Fig. 1.2). As últimas apresentaram uma perda de peso, por dissimilação, inferior às culturas repicadas em intervalos de tempo mais curtos (12 dias). Em ambos, a fase estacionária foi atingida, praticamente, ao mesmo tempo (Fig. 1.2). Nas culturas repicadas com intervalos de 21 dias era nítida uma fase de latência de 24-30 h (Fig. 1.2), contrariamente ao verificado nas restantes culturas.

A presença da fase de latência bem como a sua extensão dependem, essencialmente, da composição do meio de cultura, da idade e do tamanho do inóculo (Bailey e Ollis, 1977). Quanto mais velho for o inóculo, mais longa é a fase de latência (Bailey e Ollis, 1977). A transferência de um inóculo com um crescimento pratica-

mente nulo, devido à depleção de nutrientes e/ou acumulação de toxinas, para um meio novo, leva a uma fase de latência longa. Esta fase corresponde ao tempo que as células levam a reactivar ou a desreprimir o seu metabolismo, o que parece estar associado à difusão de substâncias tóxicas ou inibidores do crescimento das células velhas para o meio de cultura fresco (Bailey e Ollis, 1977).

As culturas repicadas com intervalos de 12 dias não apresentaram fase de latência, muito provavelmente, por terem sido transferidas para meio fresco pouco tempo depois de terem atingido a fase estacionária (70-80 h) (Fig. 1.2). Além disso, o número de células necrosadas é, nestas culturas, menor do que o observado nas culturas repicadas com intervalos de 21 dias. King e Street (1977) referem mesmo que, para obter culturas mais estáveis, as repicagens devem ser feitas imediatamente antes do fim da fase exponencial de crescimento.

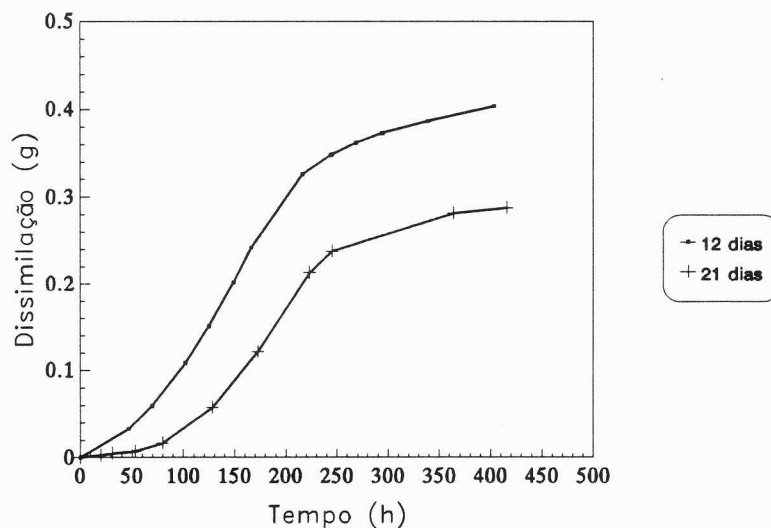


Fig. 1.2. Curvas de dissimilação das culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/Kin com diferentes tempos de subcultura.

1.2.2.3. Influência da concentração de sacarose no crescimento celular em diversas regulações hormonais

Para qualquer das combinações dos reguladores de crescimento utilizados, o crescimento celular foi manifestamente influenciado pela concentração de sacarose no meio de cultura (Tabela 1.2). Embora qualquer das combinações de fitorreguladores tivesse induzido o crescimento e mantido a integridade celulares, a combinação contendo NAA foi a que permitiu obter menores tempos de duplicação, independentemente da concentração de sacarose testada.

Embora o 2,4-D seja uma auxina que inibe a produção de metabolitos secundários, é frequentemente utilizado na cultura de células vegetais, por promover um crescimento celular superior ao de outras auxinas (Everett e Street, 1979; Lindsey e Yeoman, 1983a; Morris *et al.*, 1985; Morris, 1986; Robins *et al.*, 1986; Takeda, 1988). No entanto, quer em *O. natrix*, quer em *Centaurea calcitrapa* (Miguel, 1989), o NAA revelou-se uma auxina mais eficiente.

Tabela 1.2. Tempos de duplicação de culturas de *O. natrix* em suspensão crescendo em meio MS suplementado com 0,5 mg/l 2,4-D / 1 mg/l Kin e 0,5 mg/l NAA / 1 mg/l Kin, em diversas concentrações de sacarose

Concentração de sacarose (g/l)	Tempos de duplicação	
	NAA / Kin	2,4-D / Kin
10	45,0	54,6
20	40,6	51,8
25	41,2	43,4
30	45,7	46,0
40	36,3	51,4
50	49,4	55,1
60	47,5	67,7
80	64,9	82,0

No meio suplementado com NAA/Kin, o tempo de duplicação mais baixo (36,3 h) foi observado em culturas mantidas com 40g/l de sacarose. Por seu turno, no meio suplementado com 2,4-D/Kin, o melhor tempo de duplicação foi observado em culturas mantidas com 25 g/l de sacarose (Tabela 1.2). Estes resultados mostram claramente que, para uma mesma espécie, o efeito da concentração de sacarose, no crescimento celular depende também da combinação dos fitorreguladores empregues.

Para qualquer das combinações de fitorreguladores testadas, as culturas mantidas com 50, 60 e 80 g/l de sacarose apresentaram menor crescimento celular e um maior acastanhamento. Embora Battat *et al.* (1989) considerem o crescimento das células em suspensão independente da concentração de açúcar, vários autores referem resultados idênticos aos obtidos com as culturas de *O. natrix* (Carceller *et al.*, 1971; Westcott e Henshaw, 1976; Phillips e Henshaw, 1977; Drapeau *et al.*, 1986; Daie *et al.*, 1987; Wallace, 1987; Figueiredo e Pais, 1991). O acastanhamento verificado nestas culturas pode dever-se à elevada relação C / N do meio. Com efeito, a depleção do azoto do meio pode direccionar o metabolismo dos açúcares para a pro-

dução de compostos fenólicos (Amorim *et al.*, 1977; Phillips e Henshaw, 1977; Lips *et al.*, 1987; Takeda, 1988; Do e Cormier, 1991).

1.2.2.4. Efeito da ausência de auxina ou citocinina

Nas culturas de células vegetais utiliza-se, geralmente, uma combinação de fitorreguladores, constituída por uma auxina e uma citocinina, cuja concentração relativa varia de acordo com o fim em vista: calogénese, organogénese e produção de metabólitos secundários, entre outros.

Nas culturas de *O. natrix*, foi possível manter o crescimento celular em meio contendo NAA ou 2,4-D, como únicos fitorreguladores. No entanto, estas culturas apresentavam, ao fim de 4-5 repicagens, um crescimento inferior ao verificado nas culturas mantidas com auxina e citocinina (Fig. 1.3 e 1.4). De realçar que, as culturas mantidas só com NAA, se mostraram mais sensíveis à ausência de cinetina, do que as culturas mantidas só com 2,4-D (Fig. 1.3 e 1.4). Na Fig. 1.4 observa-se que, embora as culturas mantidas com 2,4-D, tenham um crescimento inicial mais lento, atingem, por volta das 250 h, valores de dissimilação idênticos aos das culturas mantidas com 2,4-D/Kin. As culturas mantidas em NAA, pelo contrário, apresentaram sempre valores de dissimilação inferiores aos das culturas mantidas com NAA / Kin (Fig. 1.3).

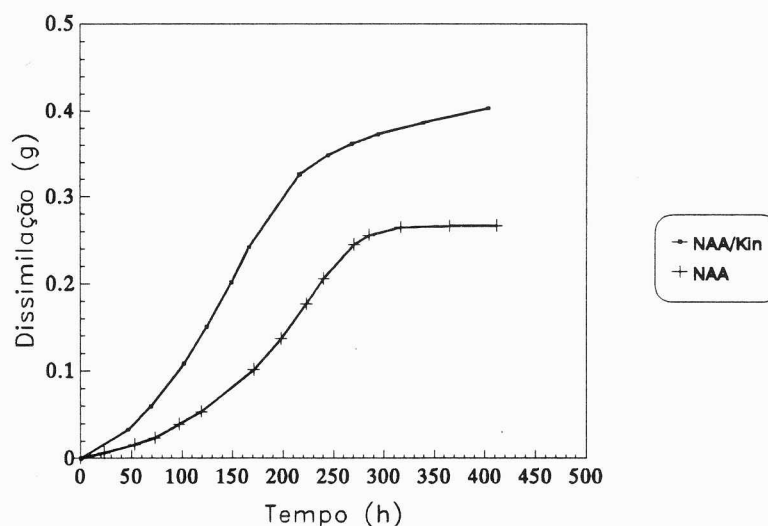


Fig. 1.3. Curvas de dissimilação de culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ou 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l NAA.

Os resultados obtidos sugerem que o crescimento celular das culturas de *O. natrix* é independente do fornecimento de citocininas exógenas. Resultados idênticos

têm sido descritos por diversos autores (Aitchison *et al.*, 1977) e justificados pela produção endógena de fitorreguladores. Ernst *et al.* (1984) verificaram a síntese de citocininas por culturas de células de *Pimpinella anisum* e, mais recentemente, De-Eknamkul e Ellis (1985a) observaram que a produção de biomassa, por culturas de células em suspensão de *Anchusa officinalis*, mantidas em meio desprovido de citocininas, era idêntico à das culturas mantidas em meio suplementado com 0,1 mg/l de cinetina. Segundo os últimos autores, observava-se um aumento lento da agregação celular, nas culturas sem citocininas, o que parece indicar que os níveis internos de citocinina são suficientes para manter o crescimento e expansão celulares, mas insuficientes para permitir obter uma cultura de células homogênea e finamente dividida.

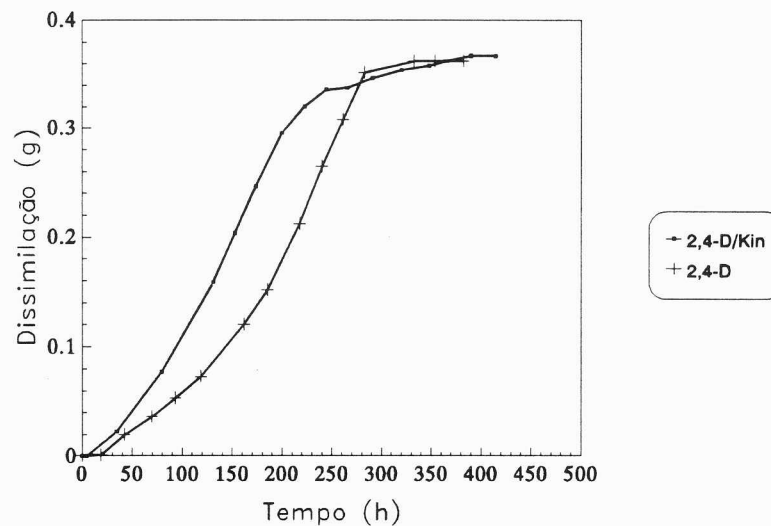


Fig. 1.4. Curvas de dissimilação de culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l 2,4-D.

As culturas mantidas com cinetina apresentaram crescimento celular similar ao das culturas mantidas com NAA/Kin (Fig. 1.5). Os valores de dissimilação encontrados para ambas as culturas foram bastante semelhantes, com as fases exponenciais praticamente sobreponíveis e o início das fases estacionárias atingidas simultaneamente, ao fim de 220-240 h (Fig. 1.5).

Resultados idênticos foram descritos por outros autores (Aitchison *et al.*, 1977), utilizando culturas de células de espécies diversas. Contudo, as culturas de *O. natrix* mantidas nas novas condições, há 3-4 repicagens, foram provenientes das culturas suplementadas com NAA/Kin ou 2,4-D/Kin. Níveis de auxina ou citocinina podem, ainda, estar presentes intracelularmente, e serem responsáveis pela independência das culturas de *O. natrix*, a curto prazo, a estes fitorreguladores exógenos.

Dos resultados obtidos e nas nossas condições experimentais, as culturas de células em suspensão de *O. natrix* mostraram-se mais sensíveis à ausência de cinetina do que à de NAA (Fig. 1.3 e 1.5).

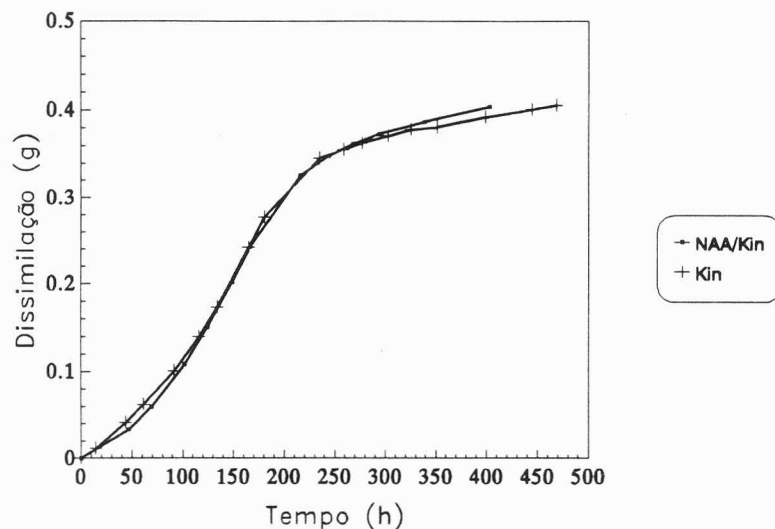


Fig. 1.5. Curvas de dissimilação das culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ou 20 g/l de sacarose e 1 mg/l Kin.

1.3. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO EM TERMOS DO CONSUMO DE AÇÚCARES, NITRATO E AMÔNIO

As culturas de células em suspensão de *O. natrix* foram caracterizadas, não só em termos de crescimento celular, mas também no que se refere à mobilização de açúcares, amônio e nitrato do meio de cultura.

1.3.1. INFLUÊNCIA DO TIPO DA FONTE DE CARBONO NA MOBILIZAÇÃO DOS AÇÚCARES

Nestes ensaios, as suspensões foram mantidas em meio MS suplementado com 0,5 mg/l de NAA, 1 mg/l de cinetina e 20 g/l de sacarose, frutose ou glucose. Embora as células tivessem utilizado qualquer das fontes de carbono ensaiadas, verificou-se, no entanto, que a glucose era mobilizada mais lentamente do que as restantes (Fig. 1.6). Enquanto, ao fim de oito dias, a sacarose e a frutose já tinham sido completamente consumidas do meio, a glucose só o foi ao fim de 12 dias (Fig. 1.6). Outros autores (Nigra *et al.*, 1990) testaram, também, diversas fontes de carbono (sacarose, glucose, frutose e maltose) em culturas de células em suspensão de

Solanum eleagnifolium Cav., tendo verificado a mobilização de qualquer das fontes, mas com crescimentos celulares e produção de metabolitos secundários diversos.

Os meios suplementados com sacarose apresentavam já glucose e frutose aquando da inoculação (fig. 1.7). A presença destas hexoses parece dever-se à degradação da sacarose, com a autoclavagem, processo usado na esterilização do meio de cultura. Resultados idênticos foram referidos por outros autores (Hsiao e Bornman, 1991; Owen *et al.*, 1991; Figueiredo, 1992). Para além da hidrólise da sacarose, por esterilização a quente dos meios de cultura, Owen *et al.* (1991) verificaram, ainda, alteração do pH do meio.

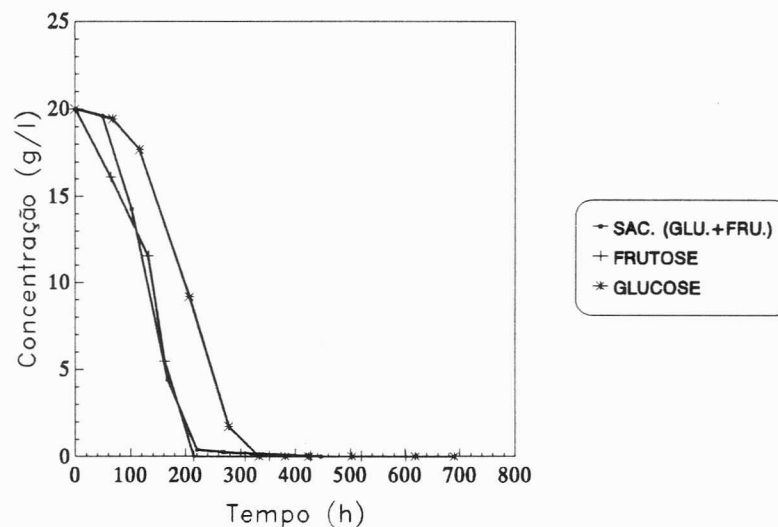


Fig. 1.6. Mobilização dos hidratos de carbono do meio, nas culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementadas com diversas fontes de carbono e 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

Nas culturas de *O. natrix* verificou-se que, a hidrólise da sacarose precedia a mobilização completa da correspondente glucose e frutose (fig. 1.7). Estes resultados estão de acordo com os referidos por alguns autores (Merillon *et al.*, 1984; Daie *et al.*, 1987; Grey *et al.*, 1987; Masuda *et al.*, 1988; McDonald e Jackman, 1989; Heijden, 1989; Goldner *et al.*, 1991; Schripsema *et al.*, 1991), alguns dos quais (Daie *et al.*, 1987; Masuda *et al.*, 1988; Goldner *et al.*, 1991) verificaram, noutras culturas, a presença de invertases ácidas na paredes celulares, responsáveis pela rápida hidrólise da sacarose; a mobilização das correspondentes hexoses ocorria ulteriormente. Contudo, Daie *et al.* (1987) verificaram a existência de um transportador da sacarose, a nível da membrana celular, que permitia a utilização directa da sacarose pelas células.

Embora nas culturas de *O. natrix* se registasse um aumento dos níveis de frutose e glucose no meio de cultura (Fig. 1.7), logo a seguir à repicagem, verificou-se o

consumo simultâneo de açúcares, traduzido, pela diminuição dos níveis de açúcares totais (Fig. 1.7). Estes resultados podem significar uma actividade das invertases superior ao consumo dos dois monossacáridos. Além disso, a hidrólise da sacarose, no tempo 0, não se traduziu em quantidades equimolares das correspondentes hexoses; a frutose aparecia sempre em maior concentração. Este facto pode dever-se a uma possível isomerização da glucose em frutose, pela acção do calor.

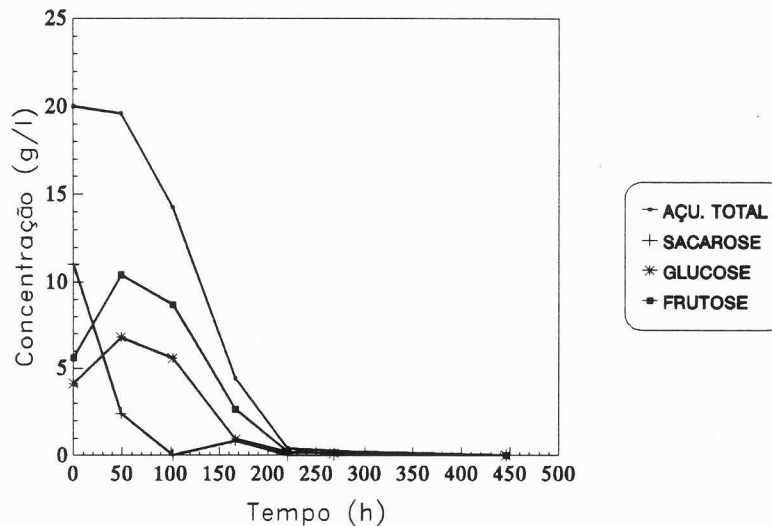


Fig. 1.7. Mobilização dos hidratos de carbono no meio, nas culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS e suplementadas com 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

Após a repicagem, a glucose parece ser a hexose preferencialmente consumida pelas células (Fig. 1.7). Noutras culturas, outros autores verificaram também um consumo preferencial da glucose em relação à frutose (McDonald e Jackman, 1989; Schripsema *et al.*, 1991; Figueiredo, 1992). No entanto, tal não se verificou nas culturas suplementadas com glucose, como única fonte de carbono (Fig. 1.6). Estes resultados ficam, pois por explicar.

Nas primeiras 50 h; após a repicagem, o aumento do teor em frutose foi ligeiramente superior ao da glucose. Contudo, a partir dessa altura, parece ter havido um consumo preferencial de frutose (Fig. 1.7). Do exposto, parece que, inicialmente, as células mostraram uma ligeira preferência pela glucose para posteriormente consumirem, de uma forma ligeiramente mais rápida, a frutose (Fig. 1.7).

Nas culturas suplementadas com glucose, como única fonte de carbono, a sua mobilização foi mais lenta, traduzindo-se por uma fase estacionária atingida mais tarde relativamente às restantes duas fontes de carbono (Fig. 1.8). No entanto, a produção de biomassa, expressa em peso seco, foi superior à da frutose (fig. 1.8).

Em conclusão, a sacarose foi a fonte de carbono que melhor induziu o crescimento das culturas de células de *O. natrix*, quer em termos de produção de biomassa, quer em termos de tempo necessário para atingir a fase estacionária (Fig. 1.8). Nas culturas mantidas em frutose, a fase estacionária foi atingida quase ao mesmo tempo da das mantidas em sacarose, mas mais cedo do que as culturas mantidas em glucose. Por outro lado, nas culturas mantidas com glucose, como única fonte de carbono, apesar de uma absorção inicial mais lenta (Fig. 1.6), verificou-se uma maior produção de biomassa, relativamente às culturas suplementadas com frutose (Fig. 1.8). Neste caso, a mobilização mais rápida da cetose levou a que se atingisse a fase estacionária mais cedo, sem, no entanto, se registar uma produção de biomassa superior ao verificado com as culturas mantidas em glucose. Sakamoto *et al.* (1993) verificaram que, em culturas de *Aralia cordata*, a frutose era, de entre a sacarose e a glucose, a fonte de carbono que menos induzia o crescimento celular, em termos de peso fresco.

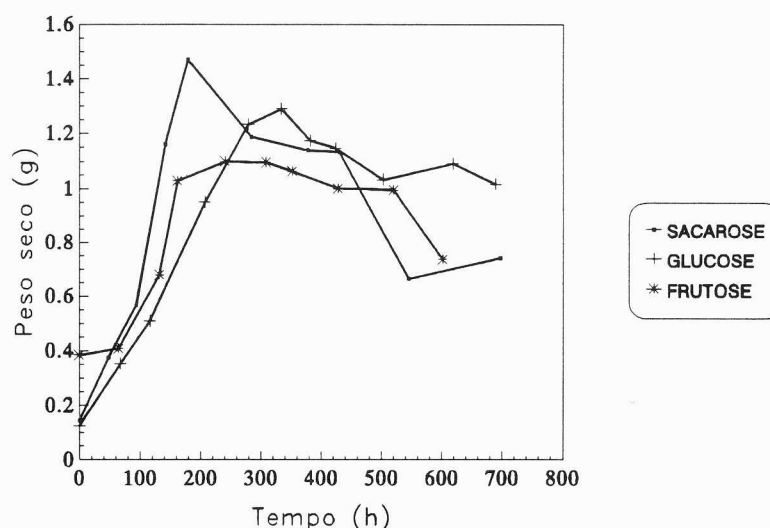


Fig. 1.8. Influência de fontes de carbono diversas no crescimento celular das culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 20 g/l de sacarose, glucose ou frutose.

1.3.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA MOBILIZAÇÃO DOS HIDRATOS DE CARBONO DO MEIO DE CULTURA

Para o estudo da mobilização dos hidratos de carbono, ensaiaram-se várias concentrações de sacarose (10, 20, 50 e 80 g/l) em culturas de *O. natrix*, mantidas em meio MS, e suplementado com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

A já referida hidrólise da sacarose, promovida pela autoclavagem, foi também verificada nas culturas suplementadas com 10, 50 e 80 g/l de sacarose (Fig. 1.9, 1.10 e 1.11).

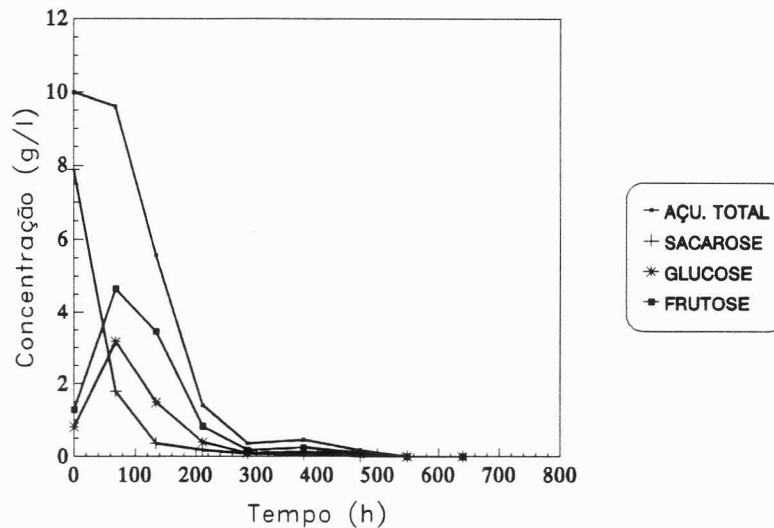


Fig. 1.9. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. nativix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 10 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

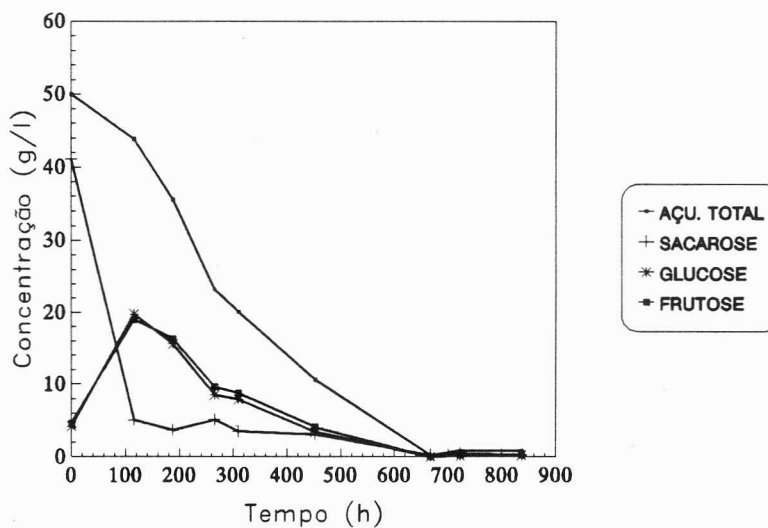


Fig. 1.10. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. nativix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 50 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

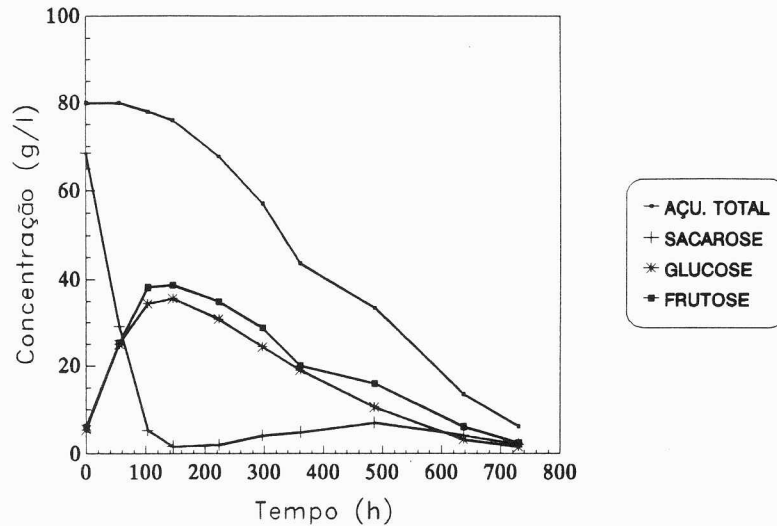


Fig. 1.11. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 80 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

Nas primeiras 60-80 h, para as culturas mantidas em 10 e 20 g/l de sacarose, e 100-120 h, para as culturas mantidas em 50 e 80 g/l de sacarose, a possível hidrólise da sacarose, pelas invertases, foi mais rápida do que o consumo das respectivas hexoses, uma vez que se observa um aumento daqueles monossacáridos no meio de cultura (Fig. 1.12 e 1.13). Nas culturas mantidas em 50 e 80 g/l de sacarose, o aumento dos teores em glucose e frutose, verificado até às 100-120 h, parece dever-se aos elevados níveis de dissacárido utilizados. Os nossos resultados sugerem que, enquanto houver sacarose no meio de cultura, a sua hidrólise é mais importante e mais rápida do que o consumo das correspondentes hexoses. Apesar da hidrólise da sacarose ser rápida em qualquer das concentrações ensaiadas (Fig. 1.14), ela é mais significativa nas culturas suplementadas com 50 e 80 g/l de sacarose. Nestas culturas, atingiram-se valores mínimos ao fim de 140 h, ou seja, cerca de 40 h mais tarde do que as culturas suplementadas com 10 e 20 g/l (Fig. 1.14). Nas culturas mantidas em 50 e 80 g/l de sacarose, verificou-se, a partir sensivelmente das 200 h, um aumento do teor deste dissacárido, atingindo um máximo às 260 h, para as culturas suplementadas com 50 g/l de sacarose, e às 500 h para as restantes (Fig. 1.14). Embora não sendo possível explicar estes resultados, importa referir que outros autores (McDonald e Jackman, 1989) obtiveram resultados semelhantes, com culturas de células em suspensão de *Medicago sativa*.

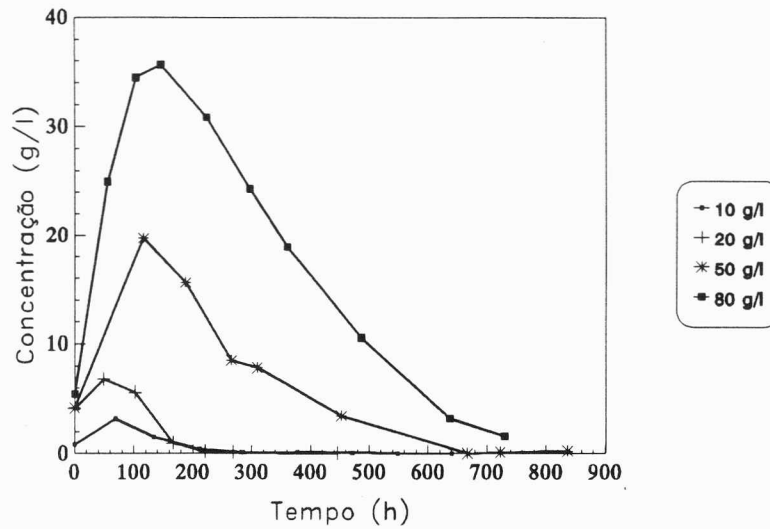


Fig. 1.12. Mobilização da glucose do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com concentrações diversas de sacarose e 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

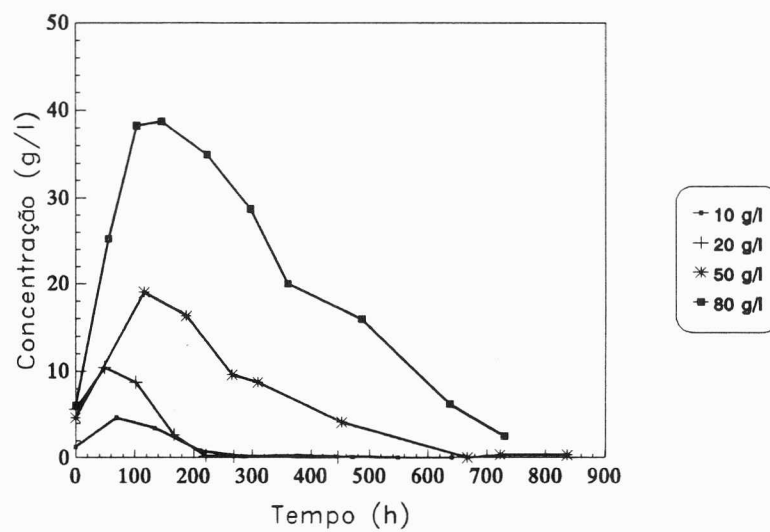


Fig. 1.13. Mobilização da frutose do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com concentrações diversas de sacarose e 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

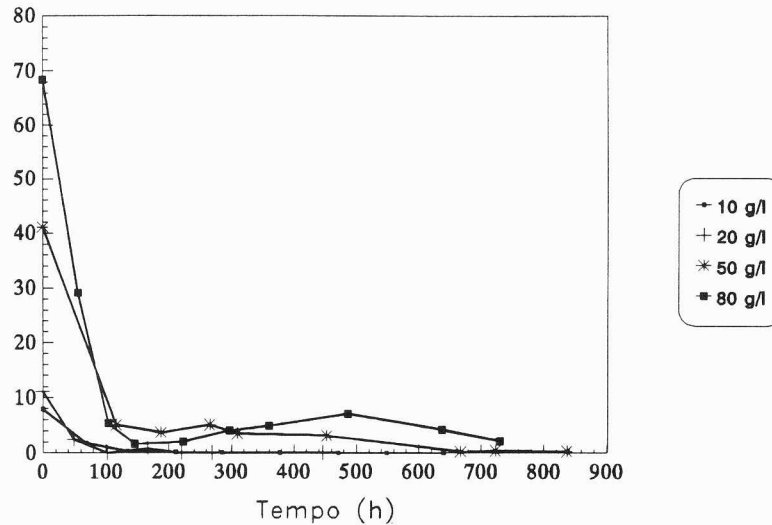


Fig. 1.14. Mobilização da sacarose do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com concentrações diversas de sacarose e 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

As culturas suplementadas com 10 g/l de sacarose consumiram preferencialmente a glucose nas primeiras 140 h, e só depois a frutose (Fig. 1.9). Por seu turno, nas culturas mantidas em 20 g/l de sacarose, a frutose começa a ser preferencialmente consumida pelas células, a partir das 50-100 h, (Fig. 1.7). Em contraste, as culturas suplementadas com 50 e 80 g/l de sacarose não apresentaram uma preferência tão nítida pelo consumo inicial de glucose (Fig. 1.10 e 1.11). Do exposto, pode concluir-se que a mobilização da glucose e frutose, nas culturas de *O. natrix* suplementadas com sacarose, depende da concentração de ambas as hexoses no meio. Quando há concentrações elevadas de glucose e frutose no meio, a sua mobilização, ao longo do tempo, é praticamente igual.

As hexoses, resultantes da hidrólise da sacarose, para além de funcionarem como substrato respiratório e precursores carbonados para os diversos componentes celulares (Grey *et al.*, 1987), podem, ainda, ser acumuladas nas células, sob a forma de substâncias de reserva. Isto explica, em certa medida, os valores mais elevados de biomassa (p. s.) obtidos com as culturas suplementadas com concentrações mais elevadas de sacarose (Fig. 1.15).

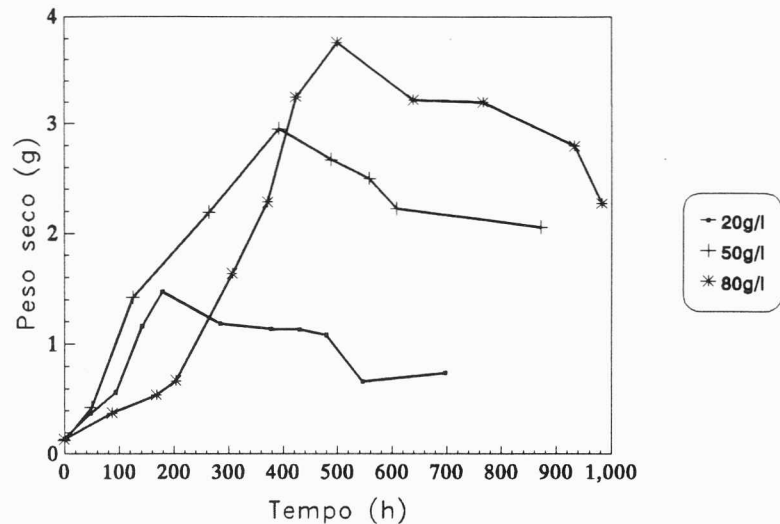


Fig. 1.15. Influência da concentração de sacarose no crescimento celular das culturas de *O. natrix*.

1.3.3. INFLUÊNCIA DO BALANÇO DE AZOTO NA MOBILIZAÇÃO DOS HIDRATOS DE CARBONO DO MEIO DE CULTURA

Na variação A, as culturas foram mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l de NAA e 1 mg/l Kin. Nas restantes variações, utilizou-se o mesmo meio mas com um balanço de azoto alterado: 1) variação B (1,65 g/l KNO_3 e 1,9 g/l NH_4NO_3), 2) variação C (4 g/l KNO_3) e 3) variação D (3,2 g/l NH_4NO_3).

Em todas as variações, verificou-se o desaparecimento rápido da sacarose do meio de cultura (Fig. 1.16). Ao fim de 100 h, cerca de 90 % da sacarose já tinha sido mobilizada do meio de cultura. Das quatro variações testadas, foi na variação C que se verificou uma mobilização mais lenta dos hidratos de carbono totais, presentes no meio de cultura (Fig. 1.17). Nesta variação, não se registou qualquer mobilização de hidratos de carbono, nas primeiras 100 h, contrariamente ao verificado nas restantes variações (Fig. 1.17). Ao fim de 300 h, nas variações A, B e D não existiam, praticamente, açúcares no meio de cultura, ao passo que na variação C, tal só ocorreu ao fim de 450 h (Fig. 1.17). Estes resultados sugerem que a velocidade de mobilização dos hidratos de carbono, do meio de cultura, está directamente ligada à quantidade e natureza da fonte de azoto presente, tal como referem Grey *et al.* (1987).

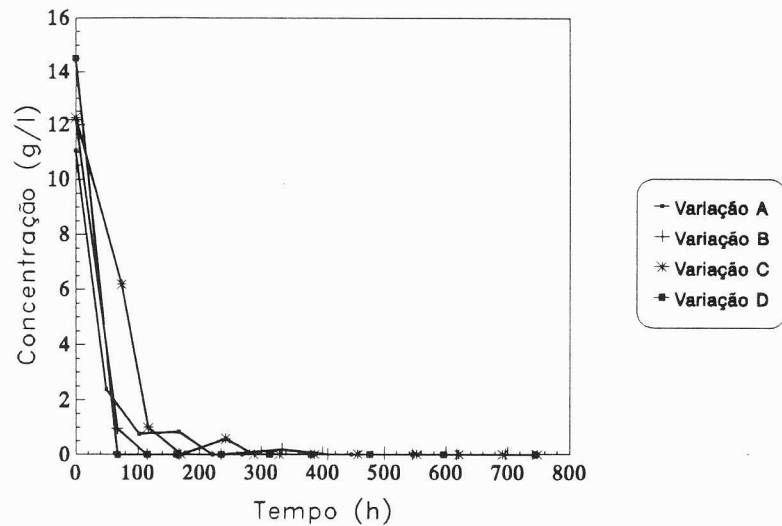


Fig. 1.16. Mobilização da sacarose do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin e diversos balanços de azoto

Varição A: 1,9 g/l KNO_3 e 1,65 g/l NH_4NO_3 ;

Varição B: 1,65 g/l KNO_3 e 1,9 g/l NH_4NO_3 ;

Varição C: 4 g/l KNO_3 ;

Varição D: 3,2 g/l NH_4NO_3 .

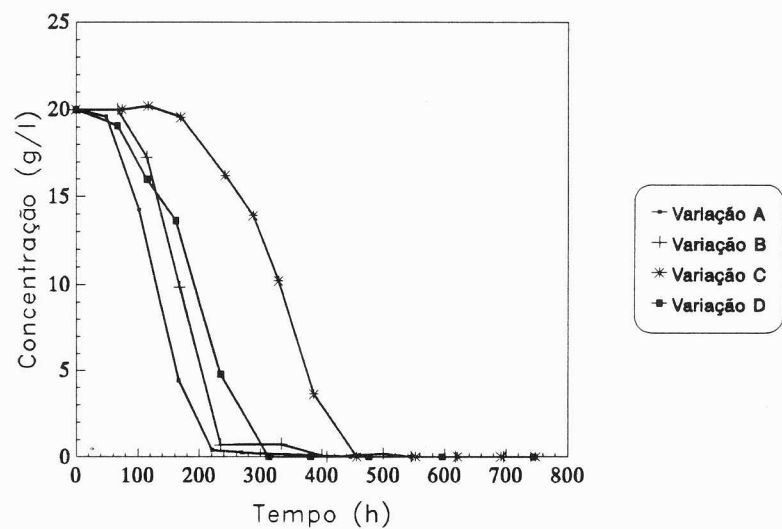


Fig. 1.17. Mobilização dos hidratos de carbono totais do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin e diversos balanços de azoto

Varição A: 1,9 g/l KNO_3 e 1,65 g/l NH_4NO_3 ;

Varição B: 1,65 g/l KNO_3 e 1,9 g/l NH_4NO_3 ;

Varição C: 4 g/l KNO_3 ;

Varição D: 3,2 g/l NH_4NO_3 .

Enquanto nas variações A e B, o consumo preferencial da frutose verificou-se a partir das 50 e 100 h, respectivamente (Fig. 1.7 e 1.18), nas variações C e D, este facto só se verificou a partir das 400 e 240 h, respectivamente (Fig. 1.19 e 1.20). Estes resultados parecem revelar que a mobilização da glucose e da frutose depende, para além da concentração inicial de sacarose, referida no subcapítulo anterior, do balanço de azoto do meio de cultura.

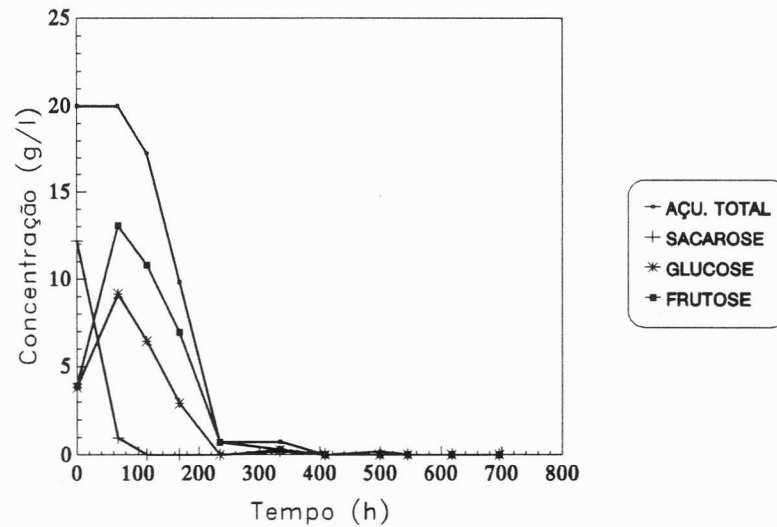


Fig. 1.18. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. nativ*, mantidas em meio MS com 1,9 g/l NH_4NO_3 e 1,65 g/l KNO_3 , suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l de NAA e 1 mg/l de Kin (variação B).

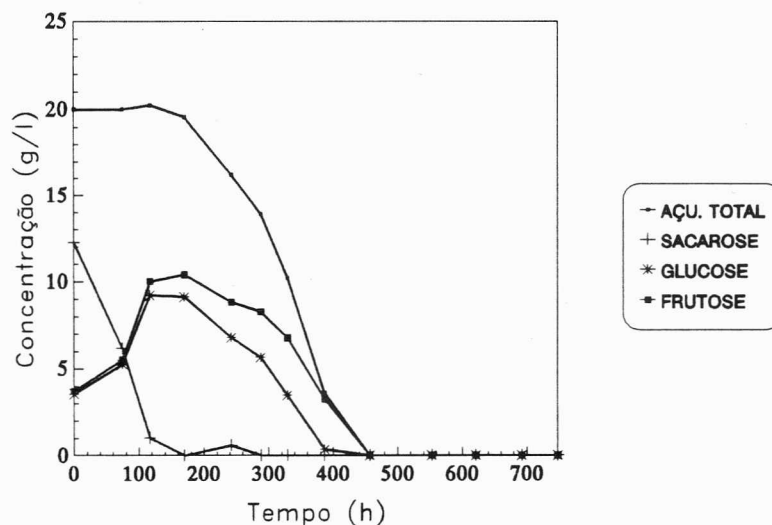


Fig. 1.19. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. nativ*, mantidas em meio MS com 4 g/l de KNO_3 , suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin (variação C).

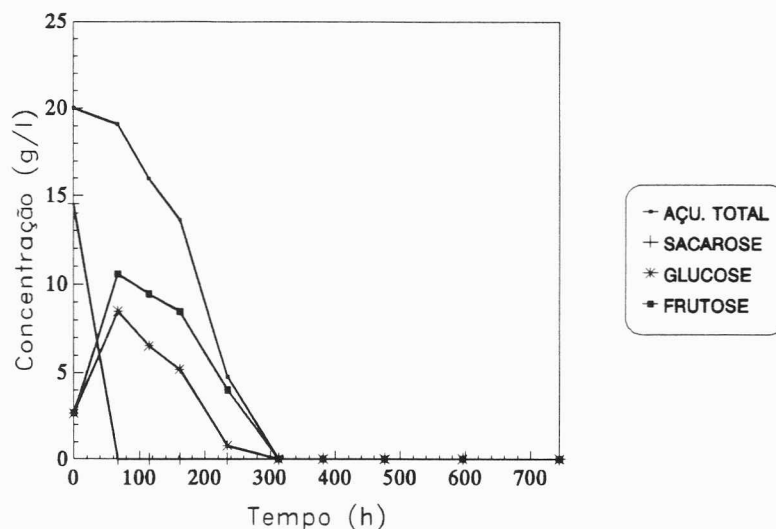


Fig. 1.20. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS com 3,2 g/l de NH_4NO_3 , suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l de Kin (variação D).

1.3.4. INFLUÊNCIA DA REGULAÇÃO HORMONAL NA MOBILIZAÇÃO DOS HIDRATOS DE CARBONO DO MEIO DE CULTURA

Nas culturas mantidas em meio MS suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin; 0,5 mg/l NAA ou 1 mg/l Kin verificou-se uma relação directa entre o crescimento celular (Fig. 1.3 e 1.5) e a mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura (Fig. 1.21).

Nas culturas suplementadas com cinetina, o consumo de açúcares totais nas primeiras 110 h, foi praticamente idêntico ao das culturas suplementadas com NAA/Kin. A partir dessa altura passou a ser ligeiramente mais lenta (Fig. 1.21). Por seu turno, nas culturas suplementadas só com NAA, a mobilização dos hidratos de carbono totais foi mais lenta desde as 50 h (Fig. 1.21).

Ao fim de 130 h de cultura, registaram-se, em qualquer das variações ensaiadas, níveis muito baixos de sacarose (Fig. 1.22). Os fitorreguladores utilizados não parecem ter interferido no processo de inversão da sacarose.

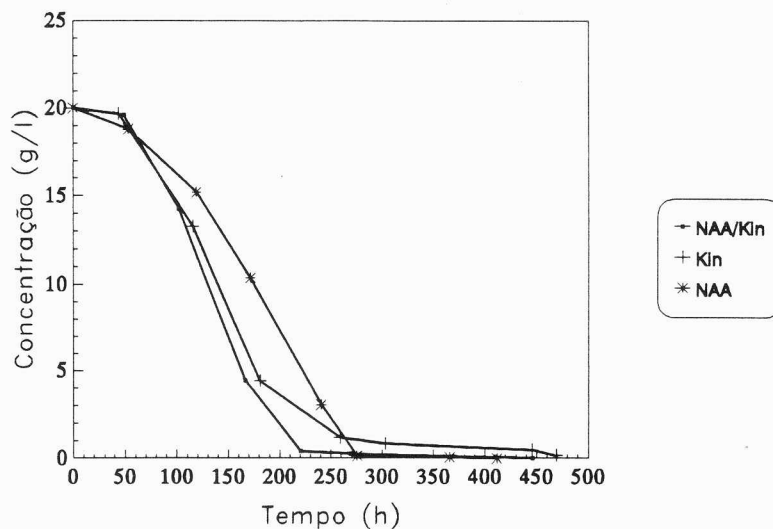


Fig. 1.21. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ou 0,5 mg/l NAA ou 1 mg/l Kin.

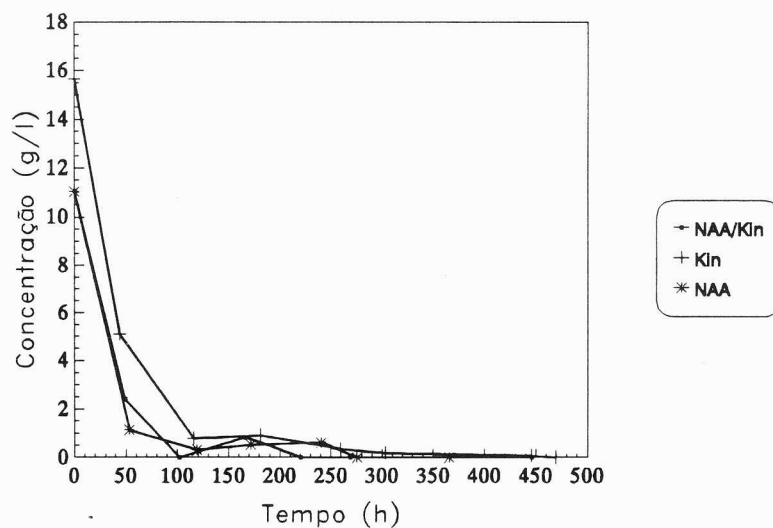


Fig. 1.22. Mobilização da sacarose do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ou 0,5 mg/l NAA ou 1 mg/l Kin.

As culturas suplementadas com 0,5 mg/l NAA ou 1 mg/l Kin mobilizaram, preferencialmente, a glucose nas primeiras 120 h (Fig. 1.23 e 1.24). A partir desta altura, o consumo preferencial da frutose foi mais nítido nas culturas suplementadas com 1 mg/l Kin (Fig. 1.23).

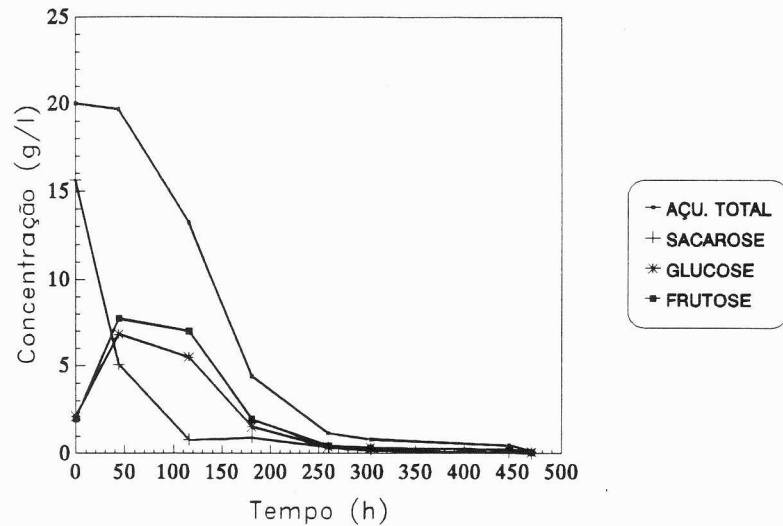


Fig. 1.23. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose e 1 mg/l Kin.

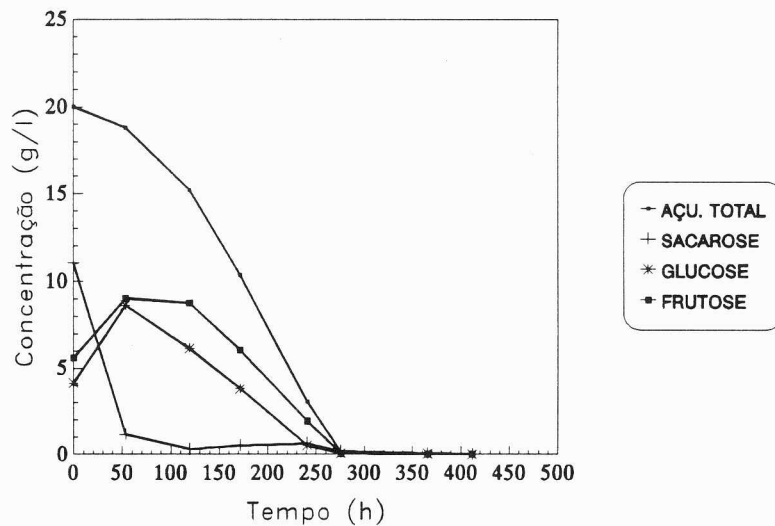


Fig. 1.24. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l NAA.

Para as culturas suplementadas com 0,5 mg/l 2,4-D, o crescimento foi ligeiramente inferior ao das culturas suplementadas com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin (Fig. 1.4). Além disso, a mobilização dos hidratos de carbono totais (Fig. 1.25) e da sacarose do meio (Fig. 1.26), foi muito semelhante ao das culturas suplementadas com 2,4-D/Kin. Acresce que a mobilização completa dos açúcares totais e da sacarose do meio de cultura ocorreu mais tarde do que as culturas suplementadas com 2,4-D/Kin, cerca de 40 e 30 h, respectivamente.

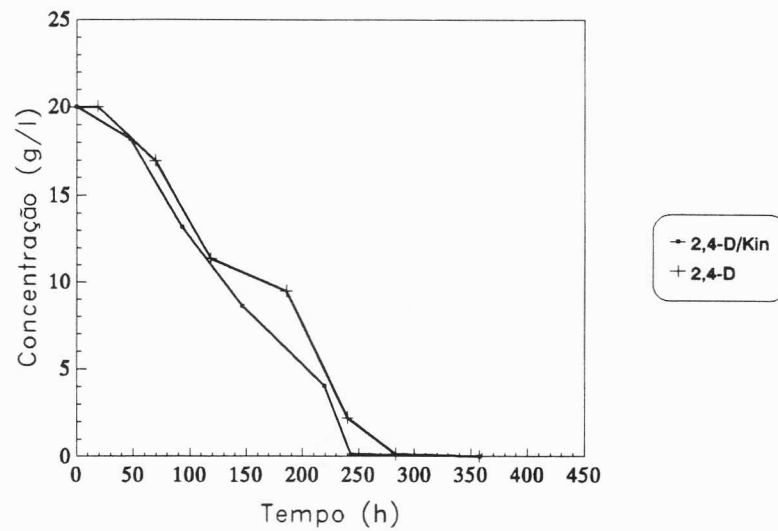


Fig. 1.25. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l 2,4-D.

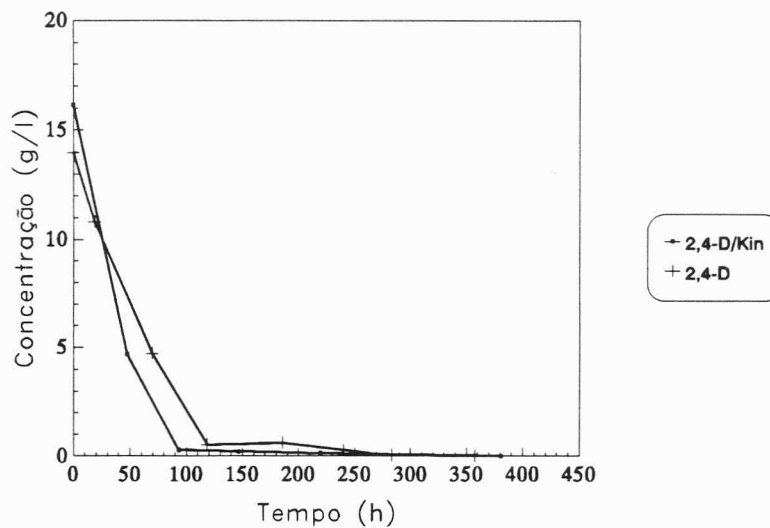


Fig. 1.26. Mobilização da sacarose do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l 2,4-D.

Nas culturas mantidas com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou com 0,5 mg/l 2,4-D, o consumo preferencial da glicose, em relação à frutose foi mais nítido do que em qualquer das variações até agora estudadas (Fig. 1.27 e 1.28). O consumo preferencial da frutose ocorreu cerca das 150 h, para a regulação 2,4-D/Kin, e das 200 h para a regulação 2,4-D. Nas culturas suplementadas só com 2,4-D, a glicose desapareceu totalmente do meio de cultura cerca de 20 h mais tarde do que nas culturas su-

plementadas com 2,4-D/Kin (Fig. 1.27 e 1.28). No que se refere à frutose, o seu desaparecimento do meio ocorreu cerca de 40 h mais tarde (Fig. 1.27 e 1.28).

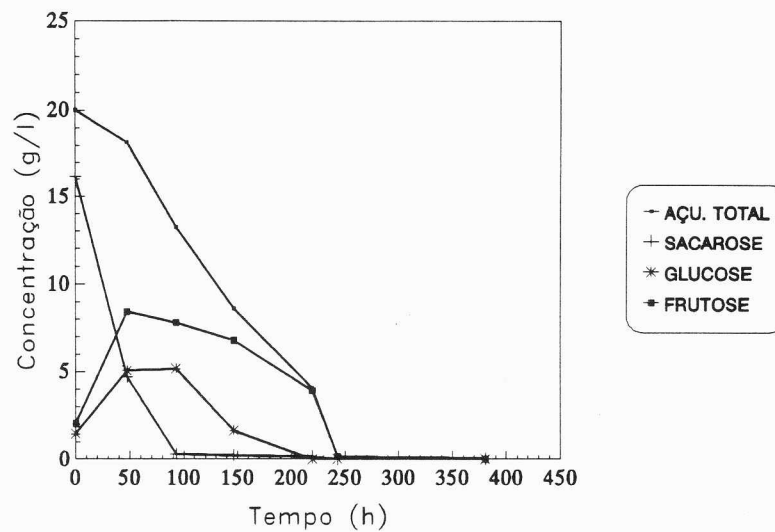


Fig. 1.27. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

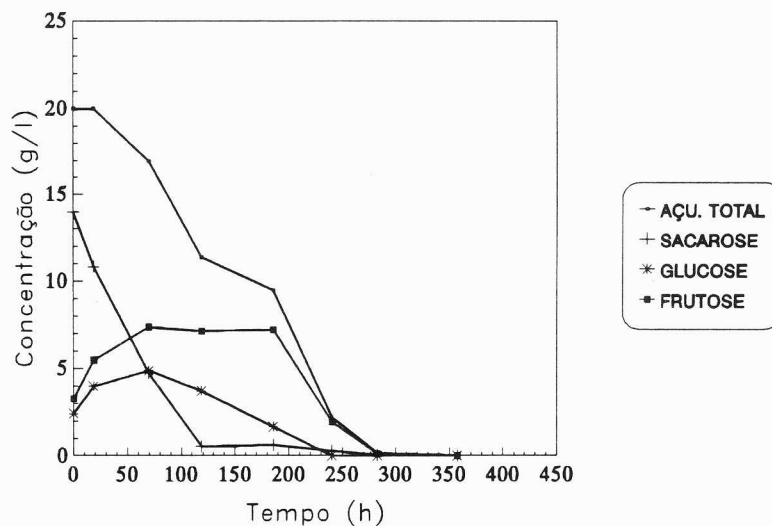


Fig. 1.28. Mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l 2,4-D.

O consumo preferencial da glucose, logo após a repicagem, foi também verificado por Figueiredo (1992) nas culturas de células em suspensão de *A. millefolium*. Segundo este autor, a frutose só era rapidamente consumida quando, praticamente, não existia glucose no meio de cultura. Nas culturas de *O. natrix*, tal facto só se

verificou em algumas situações (Fig. 1.19, 1.20, 1.27, 1.28). Houve casos, em que a frutose começou a ser preferencialmente consumida, ainda que de uma forma ligeira, quando no meio estavam presentes, cerca de 6 g/l de glucose (Fig. 1.7, 1.18, 1.23, 1.24). Por outro lado, nas culturas de *O. natrix* mantidas em 50 g/l de sacarose, o consumo da frutose e glucose, era praticamente igual ao longo do tempo (Fig. 1.10). Estes resultados sugerem que a exaustão da glucose, do meio de cultura, não é o único factor determinante do consumo preferencial da frutose.

1.3.5. MOBILIZAÇÃO DO NITRATO E DO AMÓNIO DO MEIO DE CULTURA

Na cultura de células vegetais, o nitrato e o amónio são as fontes de azoto inorgânico mais usadas. Fontes de azoto orgânico, como sejam a ureia e aminoácidos (glutamina, ácido glutâmico ou mistura de aminoácidos), podem igualmente ser utilizadas. Das fontes de azoto referidas, o nitrato é a mais importante, quer em termos quantitativos, quer em termos do número de culturas que pode crescer num meio só com nitrato, como única fonte de azoto (Dougall, 1980; Thorpe, 1980).

No metabolismo do azoto inorgânico consideram-se, consoante a fonte utilizada, os seguintes mecanismos:

1) Redução do nitrato

A redução do nitrato a amónio, nas plantas, ocorre em dois passos principais:

a) a redução do nitrato a nitrito, catalisada pela nitrato redutase, que requer NADH ou NADPH (Kirby *et al.*, 1987; Wallace, 1987);

b) a redução do nitrito a amónio pela via assimilativa (Kirby *et al.*, 1987). Este passo envolve, ainda, três reacções intermédias, uma vez que se formam hiponitrito e hidroxilamina, antes de se obter o amónio. A redução do nitrito a amónio é catalisada pela nitrito redutase. Como a actividade da nitrito redutase é superior à da nitrato redutase, não se acumula nitrito, excepto nos casos de anaerobiose (Wallace, 1987).

A nitrato redutase parece ser activada pelo nitrato do meio de cultura nas células vegetais (Heimer e Filner, 1970, 1971; Hahlbrock *et al.*, 1974; Behrend e Mateles, 1975, 1976; Jones *et al.*, 1976; Mohanty e Fletcher, 1976; Zink e Veliky, 1977; Langendorfer *et al.*, 1988). No entanto, esta activação pode ser limitada por determinados aminoácidos, podendo este efeito ser anulado, por sua vez, na presença de outros aminoácidos (Behrend e Mateles, 1975; Dougall, 1980; Langendorfer *et al.*, 1988). Em contraste, o ião amónio não parece afectar a activação da nitrato redutase (Oaks, 1974; Mohanty e Fletcher, 1976; Zink e Veliky, 1977).

2) Assimilação do amónio

O amónio, obtido por redução do nitrato ou fornecido directamente ao meio de cultura, é utilizado pelas células vegetais, no seu metabolismo. Embora alguns autores refiram exemplos de culturas de células vegetais que crescem na presença de amónio como única fonte de azoto (Martin *et al.*, 1977), a sua assimilação parece depender da presença de ácidos tricarbóxicos do ciclo de Krebs (Gamborg e Shyluk, 1970; Oaks, 1974; Behrend e Mateles, 1975, 1976; Molnar, 1988). Segundo estes autores, o papel destes ácidos orgânicos é o de fornecer α -cetoglutarato, que é o substrato para as enzimas glutamatodesidrogenase ou glutamato sintetase, para a síntese do ácido glutâmico, geralmente, considerado ser o primeiro passo para a assimilação do amónio.

1.3.5.1. Influência da fonte de carbono na mobilização do amónio e nitrato do meio de cultura

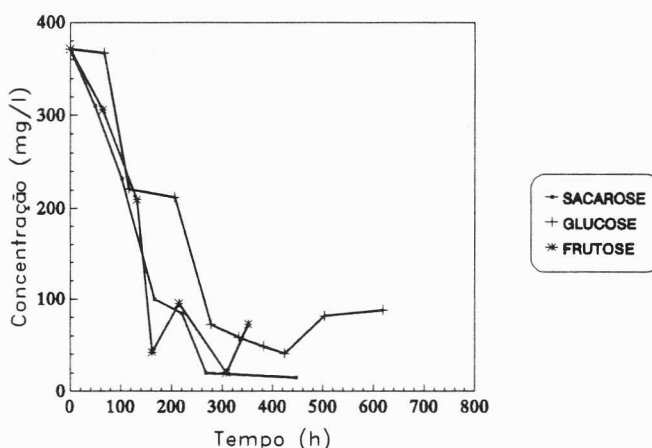
Nas culturas de células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 20 g/l de sacarose, frutose ou glucose, registou-se a mobilização quer do amónio, quer do nitrato do meio de cultura (Fig. 1.29a e 1.29b). Apesar dos teores iniciais de amónio (0,37 g/l) e de nitrato (2,45 g/l) serem diversos, o perfil de consumo nas culturas mantidas em glucose e frutose aponta para uma preferência inicial para o amónio (Fig. 1.29a). Com efeito, estas culturas tinham, ao fim de 100 h, consumido cerca de 40 % do amónio do meio e só cerca de 10 % do nitrato fornecido. Em contraste, as culturas mantidas em sacarose consumiram, no mesmo intervalo de tempo, 40 e 39 % de amónio e nitrato do meio, respectivamente. Resultados idênticos aos das culturas de *O. natrix* mantidas em glucose e frutose foram referidos por outros autores, em culturas de células de espécies diversas (Bayley *et al.*, 1972, Hahlbrock *et al.*, 1974; Rose e Martin, 1975; Kirby *et al.*, 1987; McDonald e Jackman, 1989; Figueiredo, 1992).

Rose e Martin (1975) sugerem que o consumo preferencial do amónio, nas primeiras horas após a repicagem, pelas culturas de células em suspensão de *Ipomoea*, se deve à necessidade de utilizarem o amónio, para iniciar a divisão celular e, simultaneamente, manter níveis elevados de azoto intracelular. Nesta primeira fase de crescimento, o nitrato poderia ser usado em simultâneo caso houvesse necessidade.

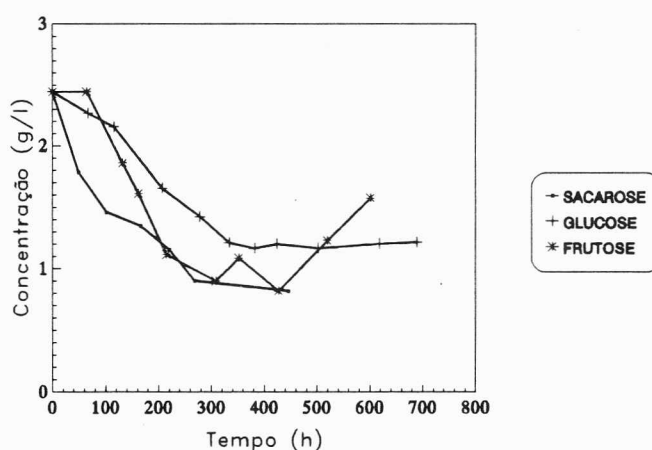
Ullrich (1987) sugere, por outro lado, que o consumo preferencial do amónio, sobre o nitrato, pode dever-se a um efeito inibidor do amónio sobre a absorção do nitrato. Segundo o mesmo autor, esta inibição dever-se-ia a um bloqueio dos transportadores de nitrato, quer pelo amónio, quer pelos seus produtos, ou ainda, por uma inibição física (alteração do pH ou do potencial de membrana). Não é de ex-

cluir a hipótese de o consumo preferencial do amónio, nas primeiras horas, se dever também ao facto da redução do nitrato ser um processo energeticamente dispendioso, necessitando de NADH e NADPH, obtidos a partir da via pentose fosfato.

Contudo, os nossos resultados sugerem que o consumo, quer do nitrato, quer do amónio depende, para além de outros factores, da fonte de carbono utilizada. Enquanto nas culturas mantidas em sacarose e frutose, o consumo do amónio foi semelhante, nas culturas mantidas em glucose, este foi mais lento (Fig. 1.29a). Diferenças mais significativas foram observadas para a mobilização do nitrato. Nas culturas mantidas em sacarose observou-se, logo desde o início, uma maior mobilização do nitrato. Em contraste, e de forma mais nítida do que para o amónio, foi nas culturas mantidas em glucose que se observou um consumo mais lento do nitrato (Fig. 1.29b).



a



b

Fig. 1.29. Mobilização do amónio (a) e nitrato (b) do meio, em cultura de *O. natrix*, suplementadas com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 20 g/l sacarose, glucose ou frutose.

Em qualquer dos ensaios, a depleção acentuada do amónio do meio de cultura, verificada com o atingir da fase estacionária, não foi acompanhada por igual depleção do nitrato (Fig. 1.29a e 1.29b). Estes resultados parecem indicar que, nas condições ensaiadas, a concentração de nitrato era superior à estritamente necessária ao crescimento celular.

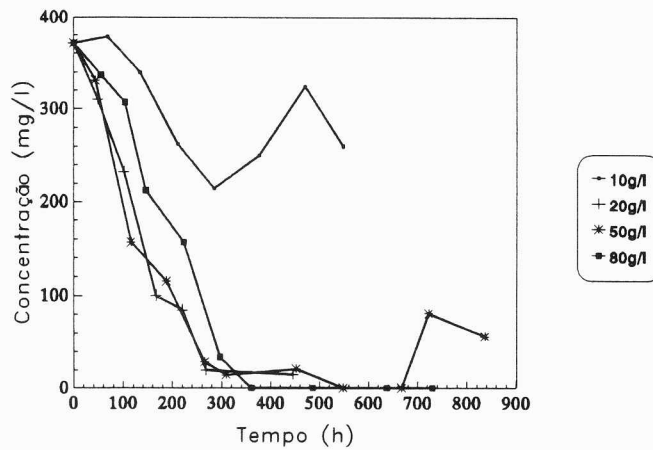
Nas culturas mantidas em glucose e frutose observou-se, em fase estacionária tardia, o aumento da concentração de amónio no meio de cultura (Fig. 1.29a). Comportamento semelhante foi descrito por Heijden (1989) em culturas de *Tabernaemontana* em fase estacionária adiantada. Segundo o mesmo autor, estes resultados dever-se-iam ao facto de, nesta fase, se verificar uma morte celular intensa levando a que os conteúdos das células fossem libertados para o meio de cultura. Os resíduos de aminoácidos interfeririam no método de quantificação levando a registos de teores em amónio superiores aos realmente presentes.

Quanto ao ligeiro aumento dos teores em nitrato, verificado nas culturas em fase estacionária adiantada pode dever-se, seguindo o mesmo raciocínio, à libertação do nitrato acumulado nas células e não metabolizado.

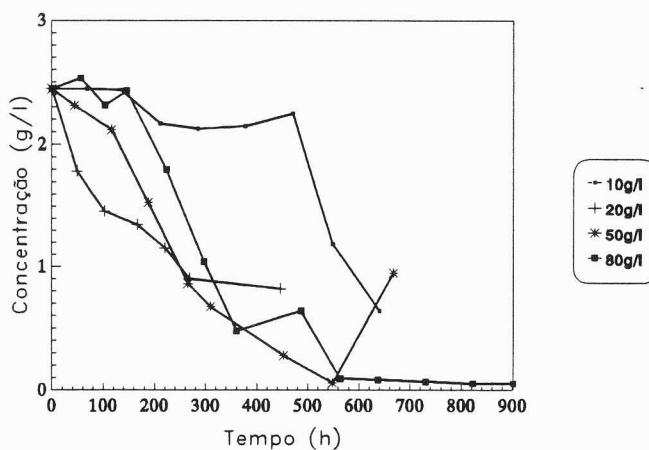
1.3.5.2. **Influência da concentração de sacarose na mobilização do amónio e do nitrato do meio de cultura**

Nas culturas suplementadas com 10 g/l de sacarose verificaram-se os níveis mais baixos de mobilização, quer do amónio, quer do nitrato (Fig. 1.30a e 1.30b). Nas culturas suplementadas com 80 g/l de sacarose, a mobilização do amónio e do nitrato do meio, foi ligeiramente mais lenta do que a das culturas suplementadas com 20 e 50 g/l de sacarose (Fig. 1.30a e 1.30b).

As culturas suplementadas com 50 e 80 g/l de sacarose mobilizaram quase totalmente o nitrato do meio (Fig. 1.30b). Nestas culturas, ao fim de 540-560 h, praticamente não existia nitrato no meio de cultura, o que contrastava com as culturas suplementadas com 10 e 20 g/l de sacarose, em que o nitrato não foi totalmente mobilizado do meio (Fig. 1.30b). Estes resultados sugerem que o teor de nitrato fornecido às culturas suplementadas com 10 e 20 g/l de sacarose foi superior ao necessário para o crescimento celular. Parece, com efeito, haver uma relação estreita entre o metabolismo dos açúcares e o do azoto. Segundo Rose e Martin (1975), a adição de sacarose, às culturas de *Ipomoea* sp., ao fim de 6-7 dias de subcultura, induzia um novo aumento de crescimento, sem necessidade de se renovar qualquer outro nutriente, hormona ou vitamina. Não havendo fonte de carbono disponível, essencial à formação do esqueleto carbonado dos aminoácidos, não se verifica a assimilação do azoto necessário à aminação.



a



b

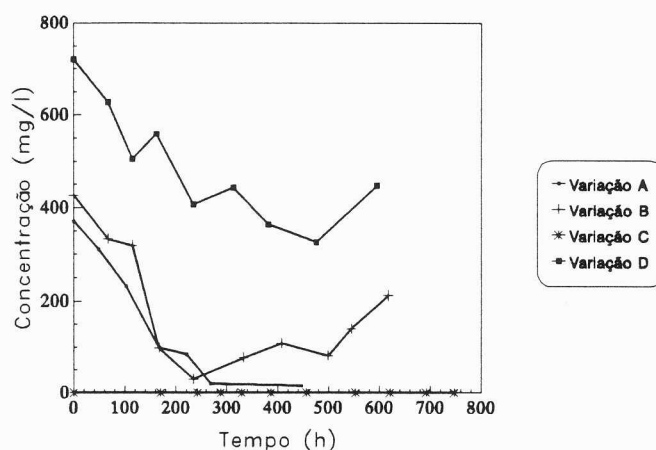
Fig. 1.30. Mobilização do amônio (a) e nitrato (b) do meio, em culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e diversas concentrações de sacarose.

1.3.5.3. Influência do balanço de azoto na mobilização do amônio e do nitrato do meio de cultura

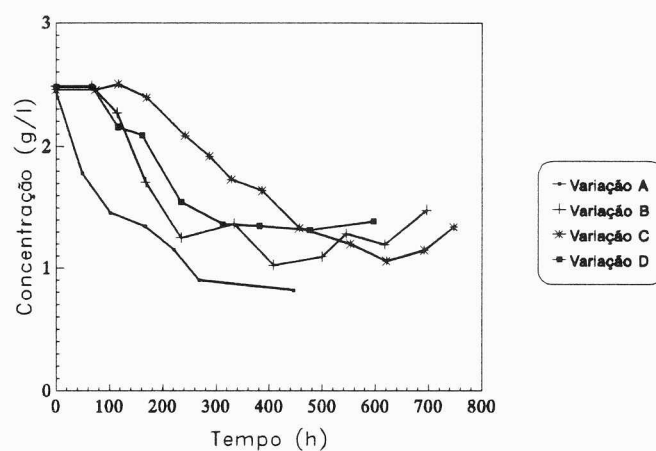
A concentração inicial de nitrato no meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, foi a mesma nas quatro variações ensaiadas (2,45 g/l). Em contraste, a concentração inicial de amônio foi diversa: 0 g/l para a variação C, 0,37 g/l para a variação A, 0,43 g/l para a variação B e 0,72 g/l para a variação D.

O amônio fornecido às culturas de *O. natrix*, nas variações A e B, foi praticamente consumido ao fim de 260 h, ao contrário do que se verificou na variação D (Fig. 1.31a). Nestas culturas, os níveis mais baixos do amônio foram registados ao fim de 460 h, sendo o valor atingido praticamente igual ao da concentração inicial de amônio, nas culturas mantidas em meio MS base (0,37 g/l) (variação A) (Fig.

1.31a). A ausência de amónio, no meio de cultura (variação C), ou concentrações iniciais superiores a 0,37 g/l levaram a que a mobilização do nitrato fosse ligeiramente mais lenta do que a das culturas da variação A (Fig. 1.31b). Por outro lado, concentrações de amónio inicial de 0,72 g/l (variação D) não pareceu ter influenciado grandemente a mobilização do nitrato do meio de cultura, quando comparada com a variação B (Fig. 1.31b).



a



b

Fig. 1.31. Mobilização do amónio (a) e nitrato (b) do meio, nas culturas de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 20 g/l de sacarose.

Variação A: 1,9 g/l KNO_3 e 1,65 g/l NH_4NO_3 ;

Variação B: 1,65 g/l KNO_3 e 1,9 g/l NH_4NO_3 ;

Variação C: 4 g/l KNO_3 ;

Variação D: 3,2 g/l NH_4NO_3 .

As culturas da variação D, com uma concentração mais elevada de amónio no meio de cultura, apresentaram um crescimento mais lento, tendo a fase estacionária sido atingida mais tarde do que as variações A e B. O mesmo não se verificou com a variação C (Fig. 1.32). Foi também nas culturas mantidas na variação D que, no

início da fase estacionária se registou uma menor produção de biomassa (Fig. 1.32). Estes resultados são concordantes com os de Zink e Veliky (1977) que verificaram uma diminuição da taxa de crescimento e do peso seco das culturas de células de *Ipomoea*, quando, ao fim de três dias após a repicagem se adicionava amónio ao meio de cultura. Segundo estes autores tais resultados, podem dever-se, entre outros factores, à toxicidade induzida pelo amónio adicionado às culturas. Esta fitotoxicidade traduz-se por uma inibição do transporte de electrões, promoção da oxidação de nucleotidos pirimídicos e inibição de algumas enzimas (Kirby *et al.*, 1987). Por outro lado, Gamborg e Shyluk (1970) verificaram que o menor crescimento celular das culturas de células de soja, em meio com elevada concentração de amónio, se devia a uma inibição das enzimas isocitrato desidrogenase e glutamina sintetase.

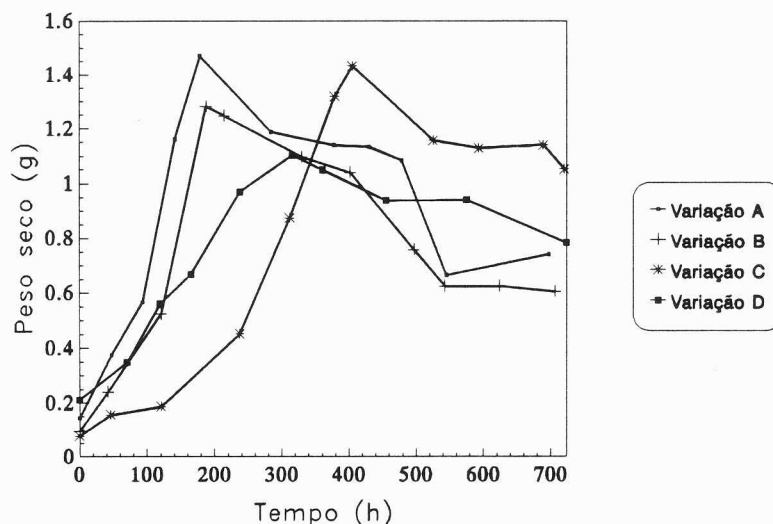


Fig. 1.32. Influência do balanço de azoto no crescimento celular das culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementadas com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 20 g/l de sacarose
 Variação A: 1,9 g/l KNO_3 e 1,65 g/l NH_4NO_3 ;
 Variação B: 1,65 g/l KNO_3 e 1,9 g/l NH_4NO_3 ;
 Variação C: 4 g/l KNO_3 ;
 Variação D: 3,2 g/l NH_4NO_3 .

Na variação C, a mobilização do nitrato do meio, só teve início ao fim de 120 h de cultura, cerca de 45 h mais tarde que nas variações B e D. Ao longo de 450 h, a mobilização do nitrato do meio foi sempre mais lenta que nas restantes variações (Fig. 1.31b). O facto da mobilização do nitrato se iniciar apenas 120 h após a repicagem, não se deve a uma inibição pelo amónio, como foi sugerido por Ullrich (1987), uma vez que ele nem está presente no meio de cultura. Segundo Ullrich (1987), há plantas cuja assimilação do nitrato não é inibida pelo amónio, e outras, ainda, como a soja, em que a assimilação do amónio apenas provoca uma ligeira despolarização da membrana que não justifica uma inibição da assimilação do nitra-

to. Embora nestas culturas, a fase estacionária tenha sido atingida mais tarde do que nas culturas mantidas nas restantes variações, a quantidade de biomassa produzida foi muito semelhante à das culturas mantidas nas variações A e B (Fig. 1.32). A menor produção de biomassa, durante as primeiras 120 h, (Fig. 1.32), pode ser explicada pela ausência de amónio, única forma que pode ser assimilada directamente nos aminoácidos. Apesar das culturas se manterem viáveis num meio desprovido de amónio, a presença deste nutriente parece, no entanto, ser determinante de uma melhor taxa de crescimento celular. Resultados idênticos foram obtidos por Sargent e King (1974) com culturas de *Phaseolus*. Porém, e segundo os mesmos autores, noutras culturas de leguminosas, a adição de amónio teve um efeito adverso no crescimento celular. As culturas de *Haplopappus gracilis* apresentaram um crescimento muito melhor na ausência de amónio. Para além de um padrão comum a todas as células vegetais, relativamente à assimilação e metabolismo das fontes de azoto, a necessidade e a preferência dessas mesmas fontes parecem, no entanto, diferir de planta para planta.

À depleção total dos hidratos de carbono do meio, nas quatro variações (Fig. 1.17), não teve correspondência na depleção total do nitrato (Fig. 1.31b). A nitrato redutase, que é induzida pelo nitrato do meio de cultura, parece ter deixado de estar actuante aquando da depleção dos açúcares do meio de cultura. Estes resultados sugerem a existência de um outro mecanismo regulador da indução da nitrato redutase, para além, da simples presença de nitrato no meio. Além disso, parece ser provável utilizar concentrações mais baixas de nitrato nas culturas de *O. natrix*.

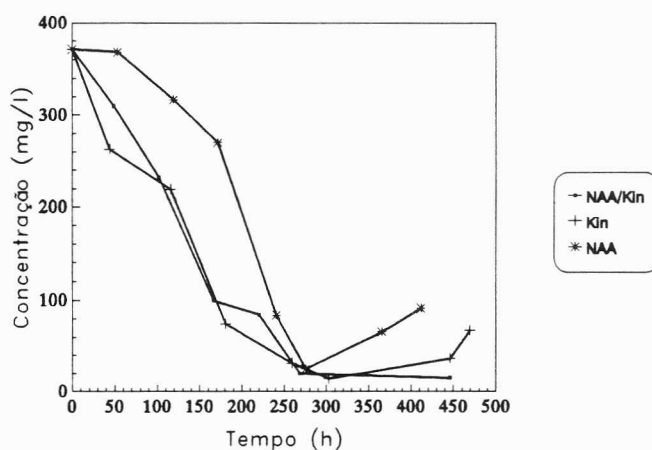
Em conclusão, as culturas de *O. natrix* cresceram melhor na presença simultânea de nitrato e amónio como fontes de azoto. No entanto, quer o crescimento, quer a produção de biomassa foram mais baixos para concentrações elevadas de amónio (0,74 g/l). Por outro lado, a presença de nitrato, como única fonte de azoto, também permitiu o crescimento celular com uma produção de biomassa semelhante à da variação A, embora com um crescimento mais lento relativamente às restantes variações.

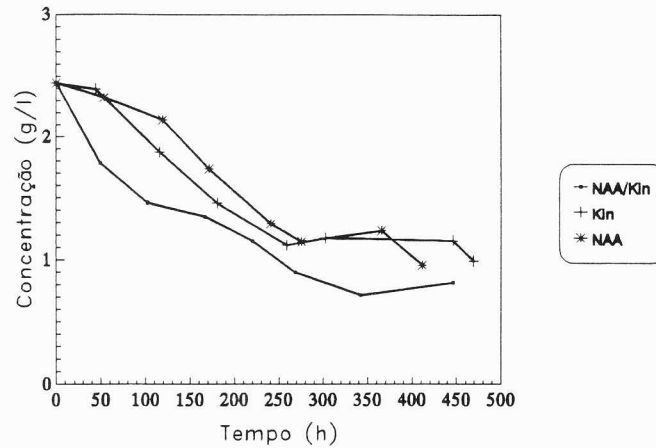
1.3.5.4. Influência da regulação hormonal na mobilização do amónio e nitrato do meio de cultura

As culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l NAA não consumiram amónio, durante as primeiras 50 h, ao contrário das culturas mantidas em meio suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ou 1 mg/l Kin (Fig. 1.33a). Ao fim deste período, iniciou-se a mobilização do amónio, embora mais lentamente do que nas restantes suplementações, o que

se verificou até cerca das 160-170 h. A partir desta altura, o consumo de amónio começou a ser ligeiramente mais rápido, atingindo, por volta das 270 h, níveis idênticos aos das restantes suplementações (Fig. 1.33a). Ao fim de 120 h, as culturas suplementadas só com NAA tinham consumido apenas cerca de 14 % do amónio existente no meio de cultura, enquanto as restantes culturas, no mesmo intervalo de tempo, já tinham consumido cerca de 41 % (Fig. 1.33a). O perfil de consumo do amónio, nas culturas suplementadas só com Kin, foi semelhante ao das culturas suplementadas com NAA/Kin (Fig. 1.33a). O consumo de nitrato, pelas culturas suplementadas com NAA foi, também, ligeiramente mais lento do que nas restantes duas culturas (Fig. 1.33b). Durante as primeiras 50 h, quer nas culturas suplementadas com NAA, quer com Kin, não houve, praticamente, consumo de nitrato do meio de cultura (Fig. 1.33b). Ao fim de 100-120 h, só se tinham consumido cerca de 10 % de nitrato, nas culturas suplementadas com NAA, enquanto nas culturas suplementadas com Kin e NAA/Kin já se tinha consumido cerca de 22 % e 39 %, respectivamente.

A mobilização mais lenta do amónio e do nitrato, nas culturas desprovidas ou da auxina ou da citocinina (Fig. 1.33a e 1.33b), relativamente às culturas com ambos os fitorreguladores (Fig. 1.33a e 1.33b), vem ao encontro do verificado nas curvas de crescimento (Fig. 1.3 e 1.5), ou seja, a uma mobilização mais lenta daqueles iões, correspondeu um menor crescimento.

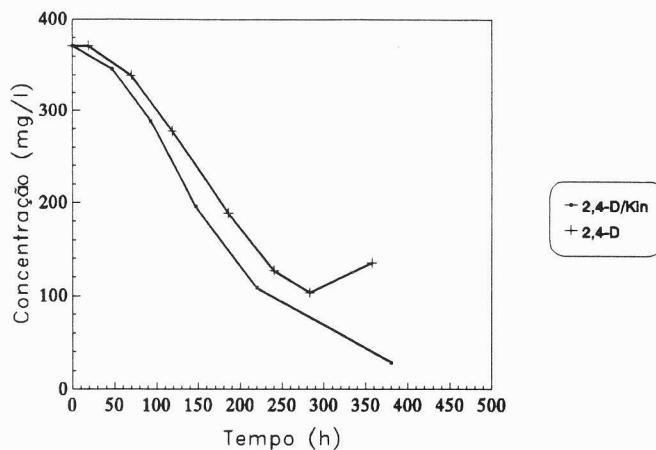
**a**



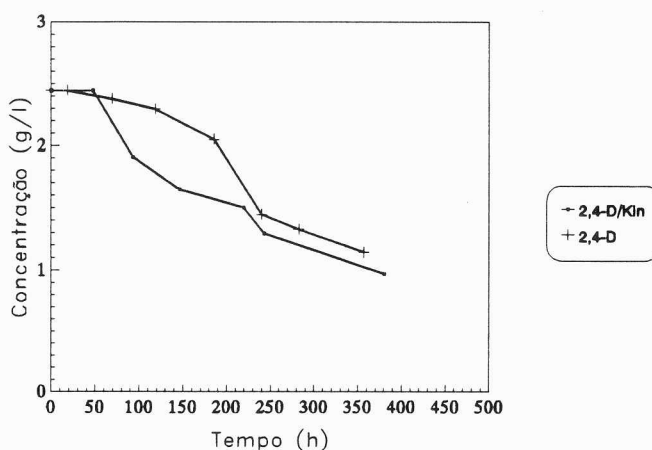
b

Fig. 1.33. Mobilização do amônio (a) e nitrato (b) do meio, nas culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l NAA ou 1 mg/l Kin.

Nas culturas mantidas em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose e 0,5 mg/l 2,4-D verificou-se um consumo mais lento do amônio do que nas culturas suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin (Fig. 1.34a). Durante as primeiras 20 h, nas culturas suplementadas com 2,4-D não houve mobilização do amônio (Fig. 1.34a). Em ambas as suplementações, não houve praticamente consumo de nitrato durante as primeiras 50 h (Fig. 1.34b). A partir dessa altura, e até cerca das 150-170 h, o consumo de nitrato foi mais acentuado nas culturas suplementadas com 2,4-D/Kin do que nas culturas suplementadas só com 2,4-D. Por volta das 190 h, nas culturas suplementadas com 2,4-D, havia cerca de 2 g/l de nitrato, enquanto nas culturas suplementadas com 2,4-D/Kin, às 150 h, só já existia cerca de 1,6 g/l (Fig. 1.34b). A partir dessa altura, verificou-se uma mobilização bastante mais acentuada do nitrato, nas culturas suplementadas com 2,4-D, de tal modo que, ao fim de 230-240 h, ambas as culturas apresentavam, sensivelmente, a mesma concentração de nitrato no meio de cultura (1,3-1,4 g/l) (Fig. 1.34b).



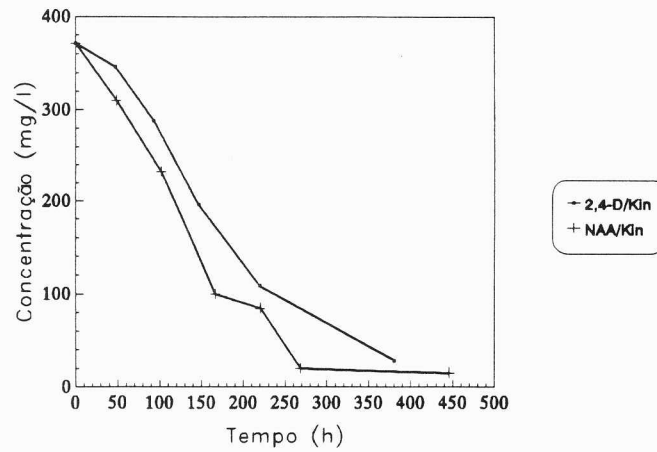
a



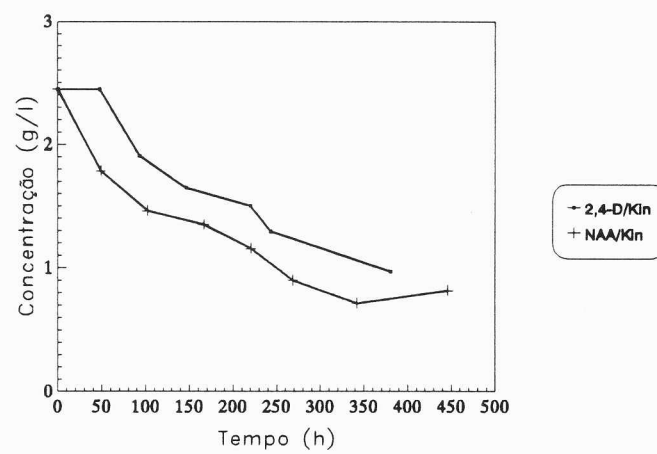
b

Fig. 1.34. Mobilização do amônio (a) e nitrato (b) do meio, nas culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D/Kin e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l 2,4-D.

Nas culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, o consumo, quer do amônio, quer do nitrato foi, desde a altura da repicagem, superior ao das culturas suplementadas com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin (Fig. 1.35a e 1.35b). Ao fim de 100 h, as culturas suplementadas com 2,4-D/Kin só tinham consumido cerca de 23 % de amônio, enquanto as suplementadas com NAA/Kin, já tinham consumido cerca de 38 %. No mesmo intervalo de tempo, as culturas suplementadas com 2,4-D/Kin tinham consumido 22,4 % de nitrato e as culturas suplementadas com NAA/Kin já tinham mobilizado cerca de 38,4 %. À mobilização mais lenta do nitrato e do amônio do meio de cultura, verificado nas culturas suplementadas com 2,4-D/Kin, correspondeu um tempo de duplicação superior (51,8 h), ao das culturas suplementadas com NAA/Kin (40,6 h).



a



b

Fig. 1.35. Mobilização do amônio (a) e nitrato (b) do meio, nas culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

2.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DA MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.1.1. IDENTIFICAÇÃO DA MEDICARPINA E DA MAACKIAINA

A mancha maioritária, obtida por cromatografia em camada delgada, do extracto isolado do meio de cultura das células em suspensão de *O. natrix*, revelou actividade bactericida contra *Bacillus subtilis*. O desenvolvimento de uma coloração amarela por reacção com a 4-nitroanilina diazotizada é indicativo da sua natureza fenólica.

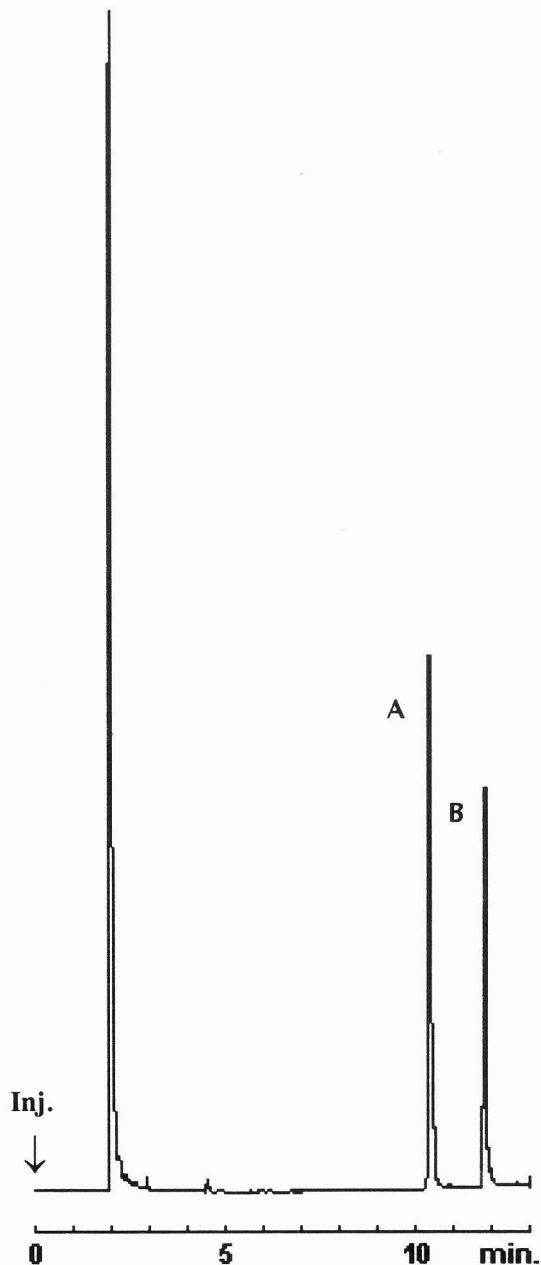


Fig. 2.1. Cromatograma, obtido em cromatografia gás-líquido, da mancha maioritária correspondente à medicarpina (A) e à maackiaina (B), obtida por TLC, isolada do meio de cultura das suspensões de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em fase estacionária. Inj.-injecção; atenuação: 32.

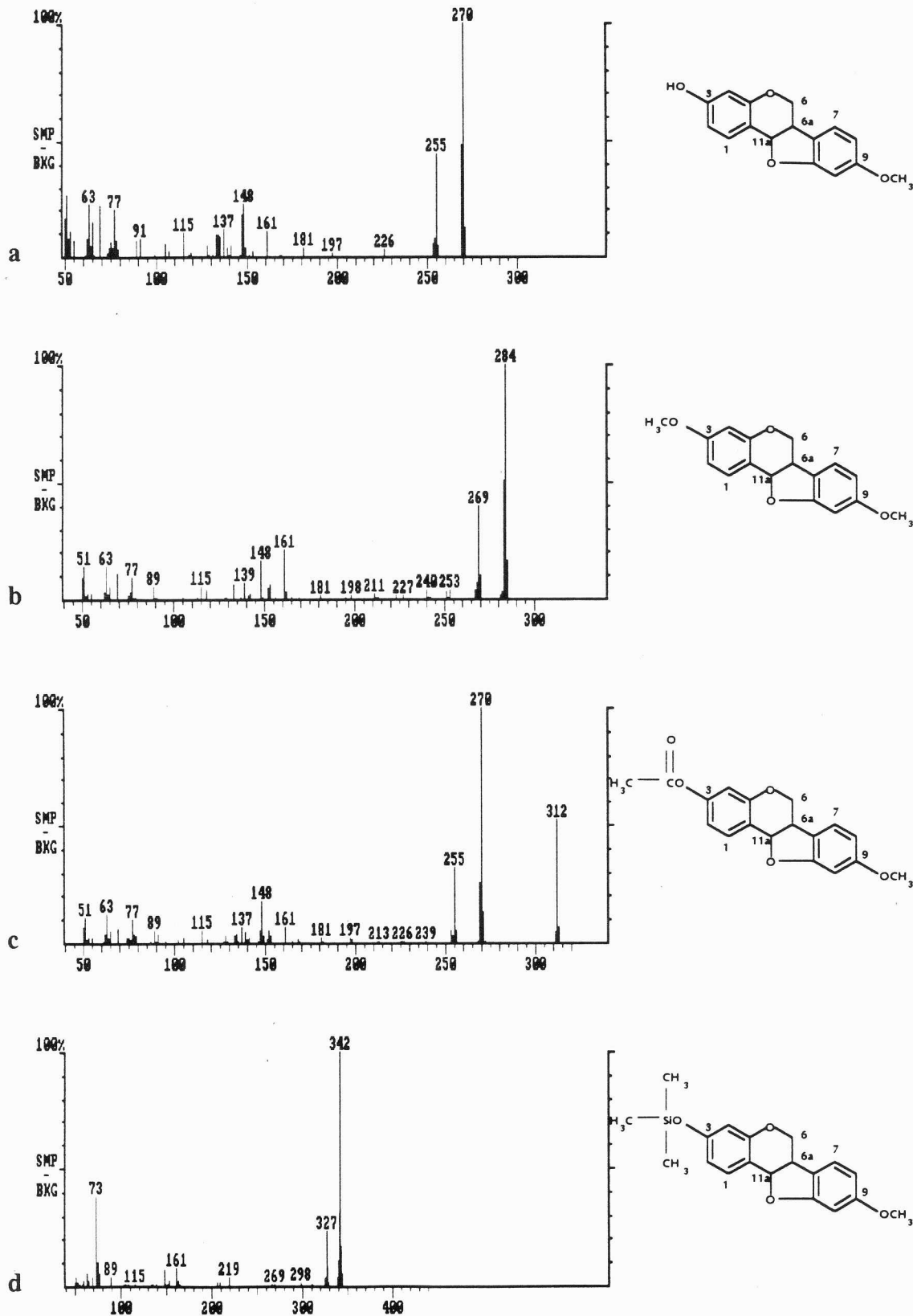


Fig. 2.2. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, da mancha maioritária correspondente à medicarpina (a), obtida por TLC, isolada do meio de cultura das suspensões de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em fase estacionária, e respectivos derivados metilado (b), acetilado (c) e sililado (d).

A análise por cromatografia gás-líquido de alta resolução, revelou ser a mancha constituída por dois compostos (Fig. 2.1).

O espectro de massa de impacto electrónico do composto com menor tempo de retenção (composto A) apresenta o ião molecular intenso a m/z 270 $[M]^+$ (pico base) compatível com a fórmula empírica $C_{16}H_{14}O_4$, seguido dos iões m/z 255 $[M-15]^+$ e m/z 227 $[M-15-28]^+$, m/z 197, m/z 161 e m/z 147 (Fig. 2.2a). Os iões m/z 255 e m/z 227 permitem diagnosticar a presença de um éter aromático que derivam do ião molecular por eliminação das espécies CH_3 e CO , respectivamente. Por sua vez, os iões m/z 161 e m/z 147, atribuíveis às estruturas representadas na Fig. 2.3, sugerem tratar-se de um pterocarpano (Pelter e Amenechi, 1969). No entanto, não é possível alojar qualquer dos substituintes no anel A ou D. O espectro de ultravioleta deste composto $\lambda_{max}^{CH_3CN+H_3PO_4}$: 213, 228 (*o*), 282, 287 e 293 (*o*) nm, confirma tratar-se de um pterocarpano (Ingham, 1976b; 1982a; Williams e Harborne, 1989). As bandas de absorção máxima, observadas a 282 e 287 nm revelam, por seu turno, a presença de um pterocarpano 3,9-dioxigenado (Ingham, 1982a). Informação complementar foi obtida em ensaios de GC-MS com os derivados metilados, acetilados e sililados (Fig. 2.2b, 2.2c e 2.2d, respectivamente). Nos espectros de massa de impacto electrónico dos derivados metilados, acetilados e sililados observam-se os iões moleculares intensos a m/z 284 $[M]^+$, 312 $[M]^+$ e 342 $[M]^+$, respectivamente, demonstrando a presença de um grupo hidroxilo livre. A eliminação de 42 u. m. a. (CH_2CO), por parte do ião molecular, observada no espectro de massa do derivado acetilado, com o conseqüente refazer do espectro da amostra não derivatizada, é indicativa da ligação do grupo hidroxilo a um anel aromático.

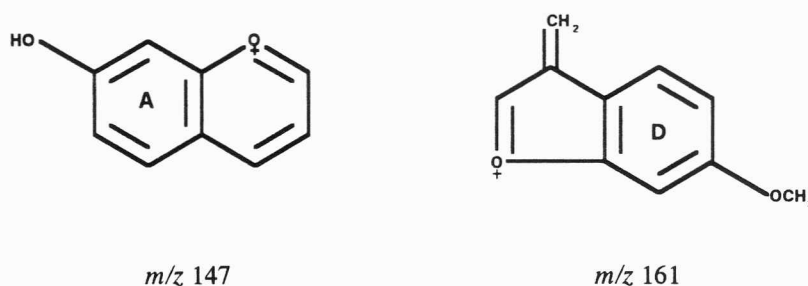


Fig. 2.3. Estruturas dos iões m/z 147 e 161.

No espectro de ressonância magnética nuclear de protão ($CDCl_3$; ppm) (Tabela 2.1) observam-se sinais a 6,45 (m), 6,54 (d def.), 7,12 (d, $J=8,0$ Hz) e 7,38 (d, $J=8,0$ Hz), característicos de prótons aromáticos. A frequência de ressonância destes prótons é determinada, principalmente, pelo efeito dos substituintes ligados aos anéis aromáticos através de um átomo de oxigénio (Pachler e Underwood, 1967). O

sinal observado a 7,38 (d, $J=8,0$ Hz) é atribuído à ressonância do próton do carbono 1 dos pterocarpanos (Preston, 1977). Além dos sinais já referidos, observam-se, ainda, sinais a 3,62 (m), 4,24 (dd, $J=10,5$ Hz; 4,7 Hz), 3,52 (m) e 5,50 (d, $J=7,2$ Hz), atribuíveis à ressonância dos prótons H-6 ax/6 eq, H-6a e H-11a do anel heterocíclico B/C dos pterocarpanos (Pachler e Underwood, 1967). Por outro lado, o sinal a 3,75 (s), confirma a presença de um grupo metoxilo ligado a um anel aromático.

Tabela 2.1. Dados do espectro de ressonância magnética nuclear de próton do primeiro composto. δ -desvio químico; J -constante de acoplamento; d-dublete; dd-dublete de dubletos; d def.-dublete deformado; m-multiplete; s-singlete

atribuição	δ (ppm)	J (Hz)	multiplicidade
6 a	3,52	-	m
6 ax	3,62	-	m
metoxilo	3,76	-	s
6 eq	4,24	10,5; 4,7	dd
11a	5,50	7,2	d
4, 8 e 10	6,45	-	m
2	6,54	-	d def.
7	7,12	8	d
1	7,38	8	d

Embora a informação espectroscópica disponível assegure tratar-se de um pterocarpano 3,9-dioxigenado (Pachler e Underwood, 1967; McMurry *et al.*, 1972; Preston, 1977; Cook *et al.*, 1978; Mabry e Ulubelen, 1980; Ingham e Markham, 1982; Woodward, 1980; Gustine e Moyer, 1982; Strange *et al.*, 1985; Kessmann *et al.*, 1988; Williams e Harborne, 1989), não permite distinguir entre o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (medicarpina) e o 3-metoxi-9-hidroxipterocarpano (isomedicarpina). No entanto, o desenvolvimento de cor amarela, por reacção com 4-nitroanilina diazotizada permite identificá-lo como sendo a medicarpina. A coloração evidenciada com este reagente cromogénico é característica dos pterocarpanos com um grupo hidroxilo livre na posição 3 (Brink *et al.*, 1974; Burden *et al.*, 1974; Burden e Bailey, 1975; Preston, 1977; Robeson e Ingham, 1979; Ingham e Markham, 1980). A identidade do composto foi, ainda, confirmada por comparação dos tempos de retenção e do espectro de massa com os de uma amostra autêntica.

No espectro de massa de impacto electrónico do composto com maior tempo de retenção (composto B) observa-se o ião molecular intenso a m/z 284 $[M]^+$: compatível com a fórmula empírica $C_{16}H_{12}O_5$, seguido dos iões m/z 267 e 255 (Fig. 2.4a). Os espectros de massa dos derivados metilados, acetilados e sililados apresentam os iões moleculares intensos a m/z 298 $[M]^+$, 326 $[M]^+$ e 356 $[M]^+$ (Fig. 2.4b, 2.4c e 2.4d, respectivamente), o que confirma a presença de um grupo hi-

droxilo livre na molécula. Também neste caso, o grupo hidroxilo encontra-se ligado a um anel aromático, atendendo à presença do ião m/z 284 $[M-42]^+$ no espectro de massa do derivado acetilado.

No espectro de ultravioleta observam-se bandas de absorção máxima a 210, 226 (o), 282, 287 e 310 nm. A presença de uma banda a 310 nm aliada às bandas observadas a 282 e 287 nm revelam a presença de um pterocarpano com um grupo metilenodioxilo ligado aos carbonos 8 e 9 e uma monoxigenação no carbono 3 (Ingham, 1982a).

No espectro de ressonância magnética nuclear de próton ($CDCl_3$; ppm) (Tabela 2.2) observam-se sinais cujos desvios de frequência são próximos dos observados para os prótons aromáticos da medicarpina [6,44 (m); 6,54 (d def.); 6,71 (s); 7,36 (d, $J=8,0$)]. Também aqui se observam os sinais atribuíveis à ressonância dos prótons H-6 ax/6 eq, H-6a e H-11a do anel heterocíclico B/C dos pterocarpanos a 3,64 (m), 4,22 (dd, $J=5,2$ Hz; 10,5 Hz), 3,48 (m) e 5,46 (d, $J=7,5$ Hz). Além disso, observam-se dois singletos a 5,89 e 5,92 atribuíveis à ressonância dos prótons do grupo metilenodioxilo, ligado aos carbonos 8 e 9 do anel D (Ingham e Markham, 1982).

O conjunto da informação obtido por análise espectroscópica deste composto permite identificá-lo como sendo o 3-hidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (maackiaina) (Pachler e Underwood, 1967; McMurry *et al.*, 1972; Preston, 1977; Cook *et al.*, 1978; Mabry e Ulubelen, 1980; Ingham e Markham, 1982; Woodward, 1980; Gustine e Moyer, 1982; Strange *et al.*, 1985; Kessmann *et al.*, 1988; Williams e Harborne, 1989).

A identidade do composto foi também confirmada por comparação dos tempos de retenção e espectro de massa com os de uma amostra autêntica.

Tabela 2.2. Dados do espectro de ressonância magnética nuclear de próton do segundo composto. δ -desvio químico; J -constante de acoplamento; d-dublete; dd-dublete de dubletos; d def.-dublete deformado; m-multiplete; s-singlete; ss-singlete singlete

atribuição	δ (ppm)	J (Hz)	multiplicidade
6 a	3,48	-	m
6 ax	3,64	-	m
metilenodioxilo	5,89; 5,92	-	ss
6 eq	4,22	5,2; 10,5	dd
11a	5,46	7	d
4 e 10	6,44	-	m
2	6,54	-	d def.
7	6,71	-	s
1	7,36	8	d

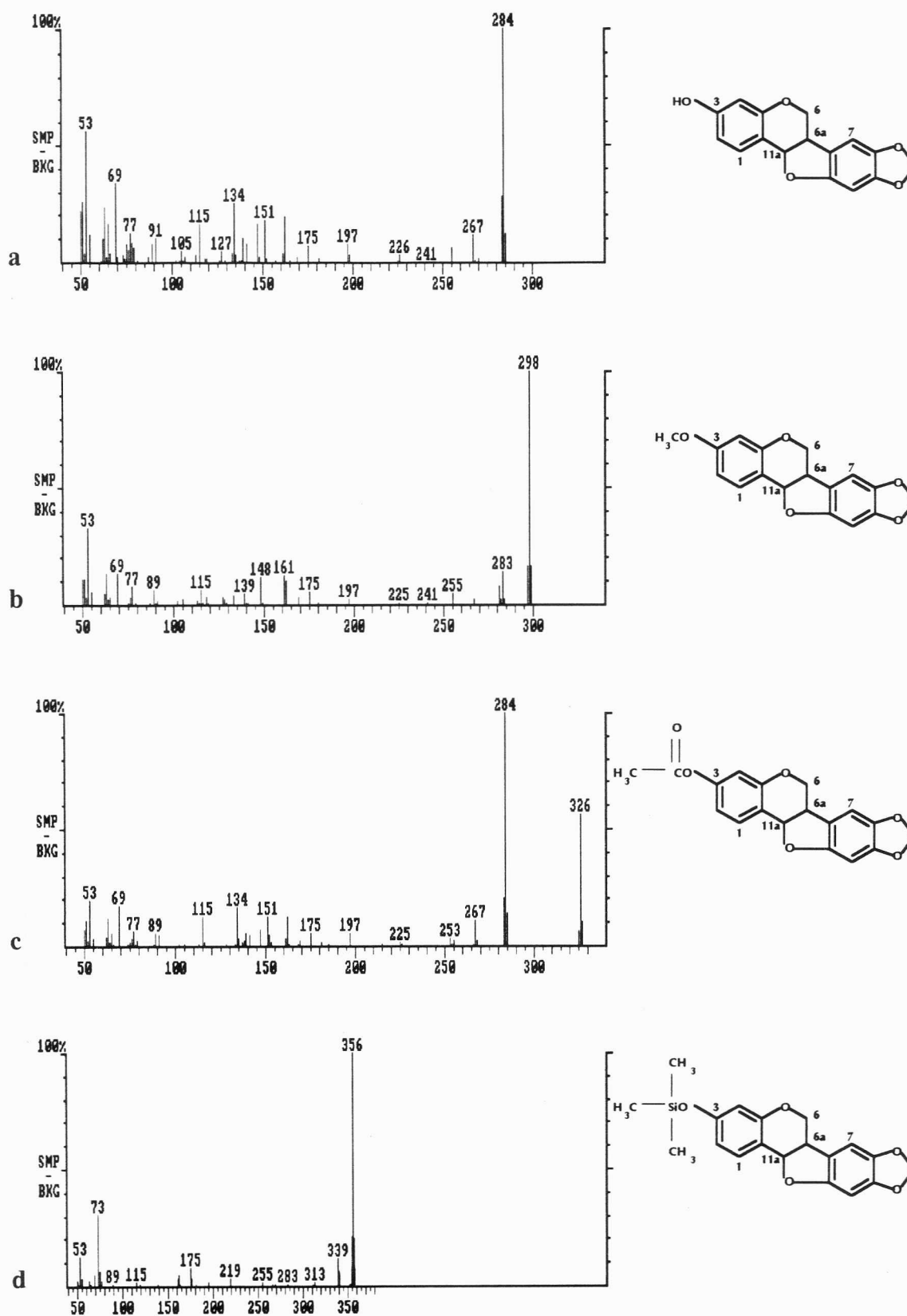


Fig. 2.4. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, da mancha maioritária correspondente à maackiina (a), obtida por TLC, isolada do meio de cultura das suspensões de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em fase estacionária, e respectivos derivados metilado (b), acetilado (c) e siliado (d).

2.1.2. ACUMULAÇÃO DE MEDICARPINA E MAACKIAINA EM FUNÇÃO DE DIVERSOS FACTORES

2.1.2.1. Acumulação de medicarpina e maackiaina em cultura de células em suspensão de *Ononis natrix*

As culturas de células de diversas espécies de Leguminosae têm permitido estudar a síntese e acumulação de fitoalexinas, e bem assim a enzimologia e a regulação metabólica do respectivo processo de indução (Barz *et al.*, 1988a; Barz *et al.*, 1988b; Preisig *et al.*, 1991; Bless e Barz, 1988; Gustine e Moyer, 1982; Ellis *et al.*, 1989; Hall e Yeoman, 1991; Weideman *et al.*, 1991; Tenhaken e Barz, 1991; Mackenbrock e Barz, 1991; Gunia *et al.*, 1991; Vogelsang e Barz, 1990; Barz *et al.*, 1989, Ebel *et al.*, 1989).

Nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, inoculadas ao oitavo dia após a repicagem, com micélio liofilizado e autoclavado de *P. infestans* ou com células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, e incubadas durante 72 h, registou-se a acumulação de medicarpina e maackiaina, à semelhança das culturas não elicidadas.

A presença de medicarpina e maackiaina, mesmo na ausência de elicitadores, parece reflectir uma produção constitutiva dos dois pterocarpanos pelas culturas de células de *O. natrix*. A acumulação constitutiva de compostos com actividade bactericida e/ou fungicida foi também verificado por Dixon (1980), em cultura de células em suspensão de *Phaseolus*. Tal acumulação ocorria durante as primeiras repicagens, antes da estabilização das culturas. Mais recentemente, Weidemann *et al.* (1991) referem a acumulação de 3-O-glucosido-6'-O-malonato-medicarpina e 3-O-glucosido-6'-O-malonato-maackiaina e das respectivas agliconas, em cultura de células de *Cicer arietinum*. Quer num caso, quer no outro, a presença destes compostos, ou dos seus conjugados, pareceu dever-se a condições de stress exercidas pelo meio de cultura.

Embora tivesse sido detectado medicarpina (0,033 mg/g p. s.) e maackiaina (0,100 mg/g p. s.) na planta, os seus teores eram significativamente inferiores aos das culturas. Estes resultados sugerem a acumulação constitutiva dos dois pterocarpanos por *O. natrix*, e estão em desacordo com os de Ingham (1982b). Segundo este autor, a acumulação da medicarpina e maackiaina só se verificava quando as folhas jovens eram expostas à radiação UV (254 nm). No entanto, os teores mais elevados de medicarpina (cerca de 1 mg/g p. s.) e de maackiaina (cerca de 0,6 mg/g p. s.) por nós encontrados nas culturas de células, sujeitas ou não a elicitação, sugerem uma resposta, por parte das células, a uma situação de stress, como por exemplo,

depleção de nutrientes do meio ou desregulação hormonal. Além disso, justifica a ineficácia dos extractos de *C. albicans*, e de *P. cinnamomi* e da celulase para induzir a acumulação destes pterocarpanos. Face aos resultados obtidos, procedeu-se ao estudo da produção da medicarpina e da maackiaina em condições nutricionais diversas.

2.1.2.2. Influência do tipo da fonte de carbono na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão

Nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 20 g/l de sacarose, glucose ou frutose a acumulação de medicarpina e de maackiaina foi registada preferencialmente nas células. Em todo o caso, também se verificou alguma acumulação no meio de cultura (Fig. 2.5, 2.6, 2.7 e 2.8).

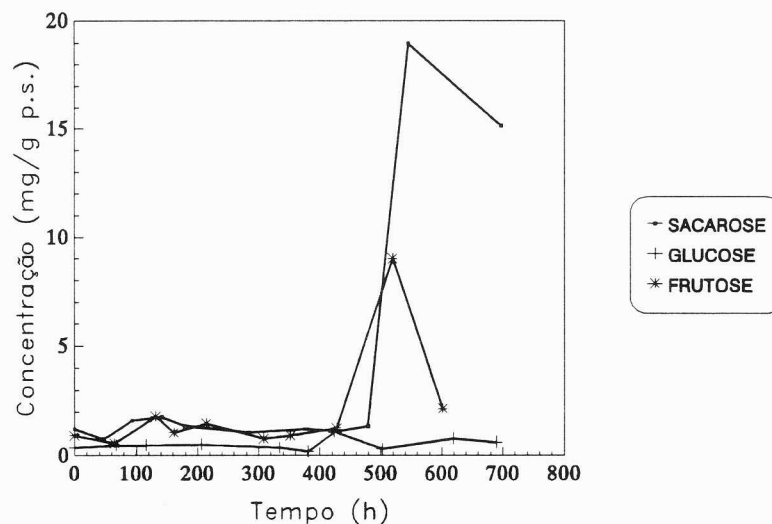


Fig. 2.5. Acumulação de medicarpina nas células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversas fontes de carbono.

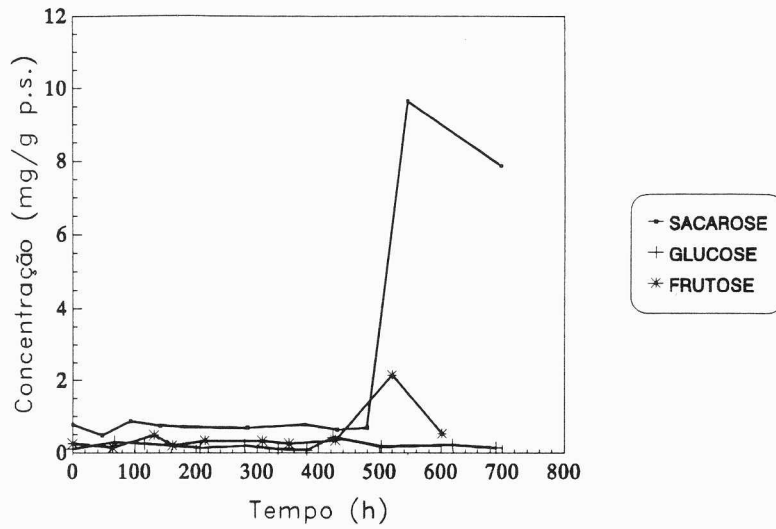


Fig. 2.6. Acumulação de maackiaina nas células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversas fontes de carbono.

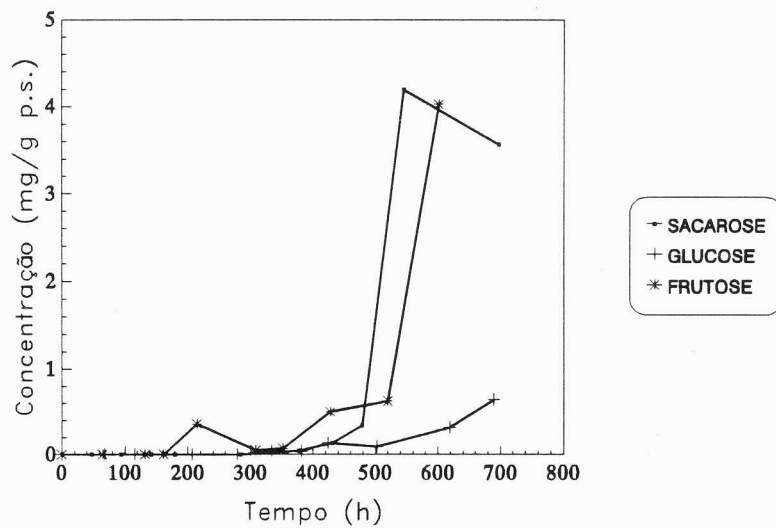


Fig. 2.7. Acumulação de medicarpina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversas fontes de carbono.

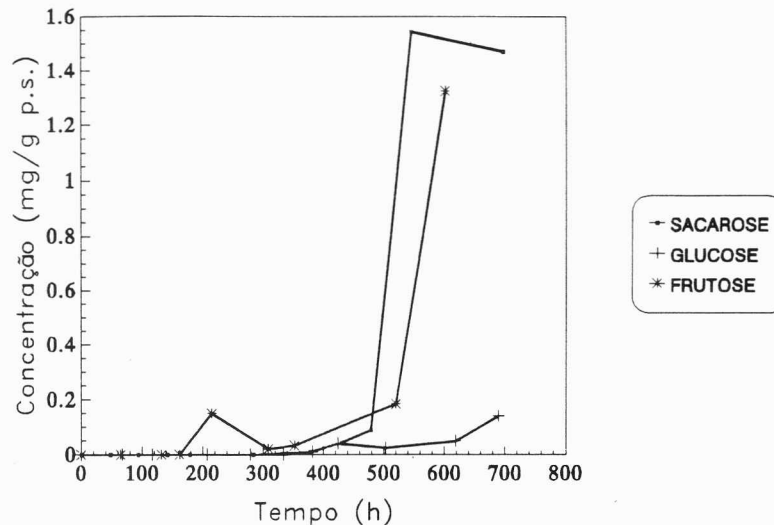


Fig. 2.8. Acumulação de maackiaina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversas fontes de carbono.

Embora, por vezes, os metabolitos secundários produzidos por culturas de células vegetais se acumulem nas células, na generalidade dos casos, estes são libertados, em diferentes graus, para o meio de cultura (Beiderbeck e Knoop, 1987; Guern *et al.*, 1987; Parr *et al.*, 1987). Os mecanismos que envolvem a libertação destes metabolitos para o meio de cultura não são, ainda, totalmente conhecidos. No entanto, os modelos propostos para o seu transporte, dos locais de síntese para o meio de cultura, pressupõem transporte activo, passivo ou ainda "ion-trapping" (Renaudin e Guern, 1988; Robins *et al.*, 1988).

A maior ou menor acumulação dos metabolitos secundários, nas células e no meio de cultura, depende do ciclo de crescimento celular, do meio de cultura utilizado, do pH, e bem assim das linhas celulares (Guern *et al.*, 1987; Parr *et al.*, 1987; Renaudin e Guern, 1988).

Tal como em *C. arietinum* (Weidemann *et al.*, 1991), nas culturas de células em suspensão de *O. natrix*, a concentração da medicarpina e da maackiaina é, nas células, superior à do meio de cultura. Também neste caso, a concentração da medicarpina é superior à da maackiaina, tanto nas células como no meio de cultura, e é independente da fonte de carbono utilizada (Fig. 2.5, 2.6, 2.7 e 2.8). Nas culturas mantidas em sacarose, a relação medicarpina / maackiaina variou, nas células, entre 1,5 e 2,0, enquanto nas mantidas em glucose, esta relação variou entre 1,5 e 3,5 e, nas mantidas em frutose, entre 2,4 e 5,0. Esta relação variou, no meio de cultura, entre 2,5-3,5 para a sacarose e frutose e 4,0-6,5 para a glucose. Estes resultados su-

gerem que a relação medicarpina / maackiaina depende do tipo de fonte de carbono utilizado.

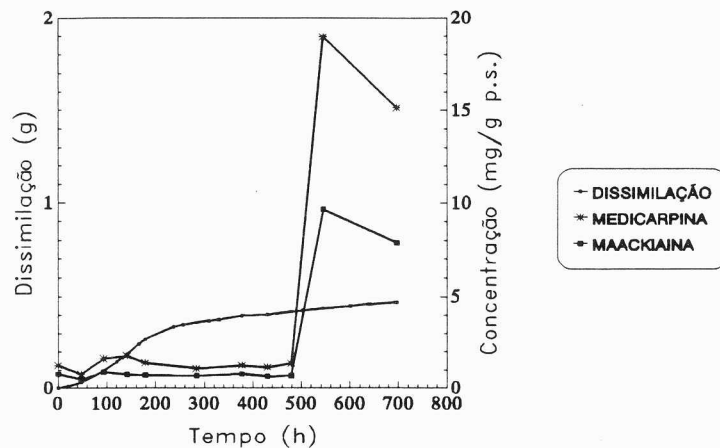
Em qualquer dos ensaios, tanto nas células, como no meio de cultura, a concentração máxima dos dois pterocarpanos foi atingida ao fim de 480-550 h, coincidindo com a fase estacionária tardia das culturas (Fig. 2.5-2.11). A maior acumulação dos dois pterocarpanos registada nesta fase, pode dever-se ao stress provocado quer pela depleção de algum nutriente do meio de cultura, quer à libertação de elicitadores endógenos, quer a ambos. Fragmentos de pectina da parede celular, como por exemplo, os oligo- α -1,4-D-galacturonidos formados, provavelmente, pela acção de hidrolases das células danificadas, têm sido descritos como elicitadores endógenos (Darvill e Albersheim, 1984). De referir que, tal como em *O. natrix*, a acumulação constitutiva da medicarpina e da maackiaina, e/ou dos seus conjugados, nas culturas de células em suspensão de *C. arietinum*, foi também maior na fase estacionária (Weidemann *et al.*, 1991).

A hipótese da medicarpina e da maackiaina se terem acumulado precocemente no vacúolo das células de *O. natrix*, sob a forma de conjugados, à semelhança do referido por Weidemann *et al.* (1991), em culturas de células em suspensão de *C. arietinum*, não foi comprovado. Com efeito, enquanto as culturas de *O. natrix* não sujeitas a hidrólise enzimática, apresentavam teores em medicarpina e maackiaina de 2,1 e 1,7 mg/100 ml, respectivamente, nas culturas sujeitas a hidrólise enzimática, o teor de ambos os pterocarpanos era de 1,6 mg/100 ml. Estes resultados sugerem que, em *O. natrix*, a síntese dos dois pterocarpanos ocorre, fundamentalmente, na fase estacionária. A sua síntese, em fase estacionária tardia (vinte dias após a repicagem), parece depender da mobilização açúcares intracelulares, porquanto nesta altura, já não existem hidratos de carbono no meio de cultura. É de referir que, as células de *O. natrix* possuem numerosos amiloplastos.

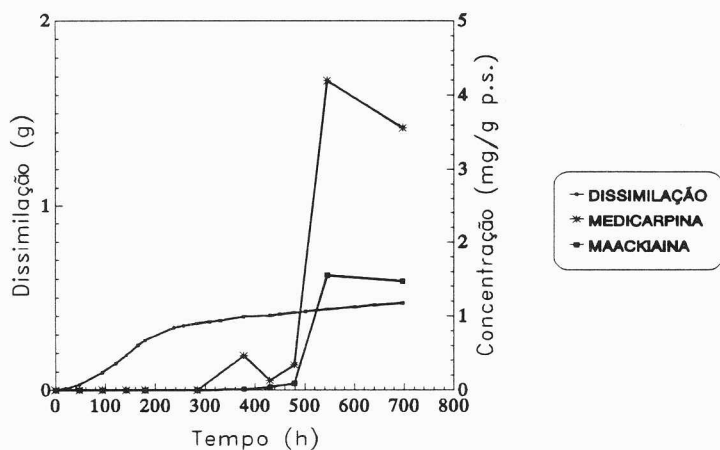
Nas culturas de *O. natrix*, suplementadas com sacarose e frutose, verificou-se um ligeiro aumento dos níveis da medicarpina e da maackiaina intracelulares, entre as 80 e 140 h após a repicagem, enquanto nas culturas suplementadas com glucose, tal foi logo registado imediatamente após a subcultura (Fig. 2.9a, 2.10a e 2.11a). Segundo Apostol *et al.* (1989), as culturas de células em suspensão de *Glycine max*, não elicitadas, acumulavam gliceolina, durante as fases de latência e início da fase exponencial de crescimento. Outros autores (Daniel *et al.*, 1988, 1990; Weidemann *et al.*, 1991) referem resultados semelhantes em culturas de células em suspensão de *Cicer arietinum*, sugerindo que tal acumulação se deve, provavelmente, a uma "elicitação moderada" resultante de condições de stress exercidas aquando da repicagem.

Nas culturas de *O. natrix*, suplementadas com sacarose, glucose ou frutose verificou-se, com o atingir da fase estacionária, um aumento dos teores de medicarpina e maackiaina no meio de cultura (Fig. 2.9b, 2.10b e 2.11b). Estes resultados podem ficar a dever-se ao rebentamento celular mais acentuado, registado por esta altura, e à consequente libertação dos dois pterocarpanos para o meio de cultura. Ao aumento abrupto dos níveis da medicarpina e maackiaina no meio de cultura, das células suplementadas com sacarose, seguiu-se uma ligeira diminuição (Fig. 2.9b). Este comportamento pode dever-se à degradação dos pterocarpanos, pelas peroxidases extracelulares. A presença de peroxidases extracelulares, responsáveis pela oxidação dos 3-hidropterocarpanos, foi detectada em culturas de células em suspensão de *C. arietinum* (Barz *et al.*, 1988a; 1988b).

Os níveis mais elevados de medicarpina e maackiaina foram registados nas células das culturas suplementadas com sacarose (Fig. 2.5 e 2.6), atingindo, ao fim de 573 h, valores da ordem de 19 e 10 mg/g (p. s.), respectivamente. Em contraste, as células das culturas suplementadas com glucose apresentaram os níveis mais baixos. Neste caso, os valores máximos encontrados foram, ao fim de 430 h, de 1 mg/g (p. s.) para a medicarpina e 0,4 mg/g (p. s.) para a maackiaina. A menor acumulação destes pterocarpanos, verificada nas culturas suplementadas com glucose, é difícil de explicar porquanto, segundo Barz *et al.* (1988a; 1988b), na biossíntese, quer da isoflavona formononetina e do seu conjugado glicosilado, quer dos pterocarpanos medicarpina e maackiaina estão envolvidos o metabolismo fenilpropano, a partir da L-fenilalanina, e a via pentosefosfato. O envolvimento desta última via foi confirmada por aqueles autores, que verificaram existir uma actividade aumentada da glucose-6-fosfato desidrogenase nas culturas de células em suspensão de *C. arietinum* elicítadas com *Ascochyta rabiei*. Neste contexto, a glucose seria a fonte de carbono que melhor induziria a síntese da medicarpina e da maackiaina por estar imediatamente disponível para o metabolismo primário, nomeadamente a via pentosefosfato. Contudo, a glucose pode ter sido canalizada para a síntese de outros compostos da via fenilpropanóide, que não a medicarpina e a maackiaina, e/ou ainda, para a síntese da lenhina e polifenóis, que se depositam na parede celular. A glucose não parece ser uma boa fonte de carbono para a síntese da medicarpina e da maackiaina, como aliás não o foi para a síntese do ácido rosmarínico por culturas de células em suspensão de *Anchusa officinalis* (De-Eknamkul e Ellis, 1985b) ou para a acumulação de antocianinas nas culturas de *Aralia cordata* (Sakamoto *et al.*, 1993).

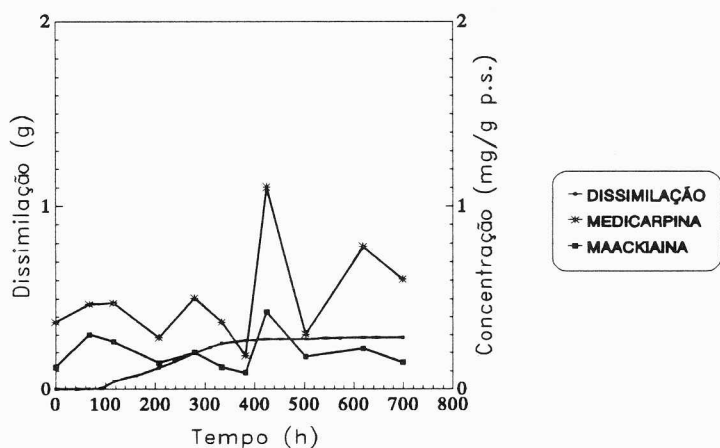


a

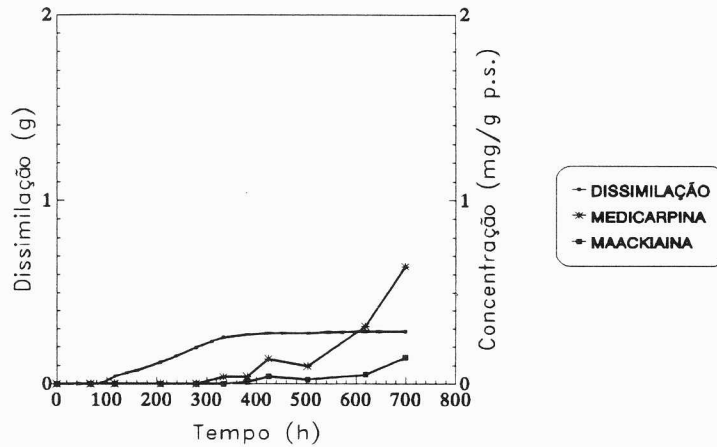


b

Fig. 2.9. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células (a) e no meio (b), nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ao longo do crescimento.

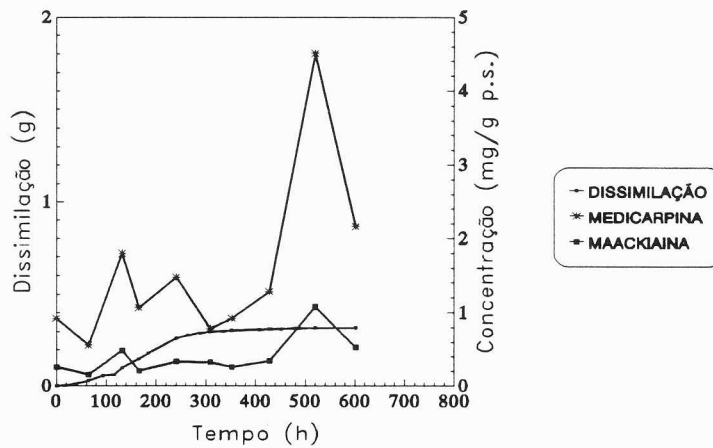


a

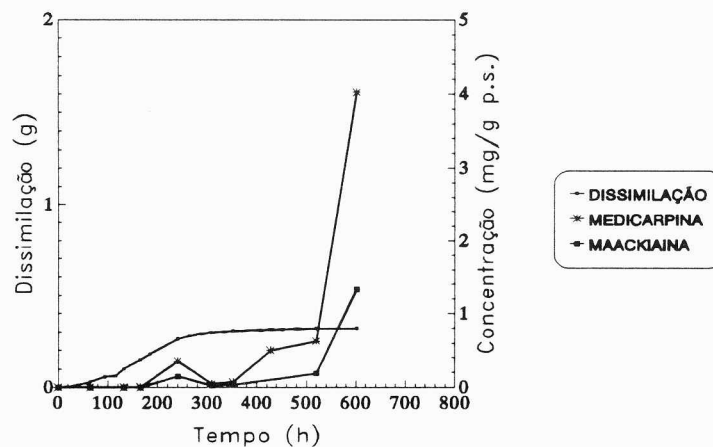


b

Fig. 2.10. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células (a) e no meio (b), nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de glucose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ao longo do crescimento.



a



b

Fig. 2.11. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células (a) e no meio (b), nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de frutose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ao longo do crescimento.

2.1.2.3. Influência da concentração de sacarose na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão

Os níveis de medicarpina e maackiaina acumulados nas células de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 20, 50 ou 80 g/l de sacarose foram diversos (Fig. 2.12 e 2.13). Assim, o valor mais elevado de medicarpina, acumulada intracelularmente, foi de 19 mg/g (p. s.), nas culturas suplementadas com 20 g/l de sacarose, seguindo-se 7,7 mg/g (p. s.) nas culturas suplementadas com 80 g/l de sacarose, e 5,5 mg/g (p. s.) nas culturas suplementadas com 50 g/l de sacarose. A maior acumulação intracelular de maackiaina verificou-se, igualmente, nas culturas suplementadas com 20 g/l de sacarose, com um valor máximo de 10 mg/g (p. s.). Tanto para a medicarpina como para a maackiaina, os valores intracelulares máximos, encontrados nas culturas suplementadas com 20, 50 e 80 g/l de sacarose, foram registados na fase estacionária (Fig. 2.9, 2.14 e 2.15). Nas culturas suplementadas com 50 e 80 g/l de sacarose, a libertação da medicarpina e da maackiaina para o meio foi, na fase estacionária, menos significativa do que para as culturas suplementadas com 20 g/l de sacarose (Fig. 2.16 e 2.17). Contudo, é de referir que, a partir das 770 h, nas culturas suplementadas com 80 g/l, não foi possível detectar no meio de cultura quantidades mensuráveis de qualquer dos pterocarpanos. As culturas eram, nesta altura, constituídas quase, exclusivamente, por massa celular.

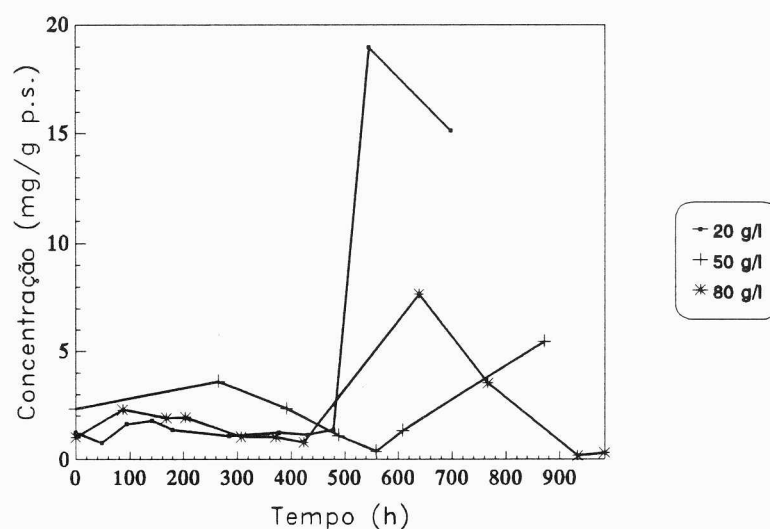


Fig. 2.12. Acumulação da medicarpina nas células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e diversas concentrações de sacarose.

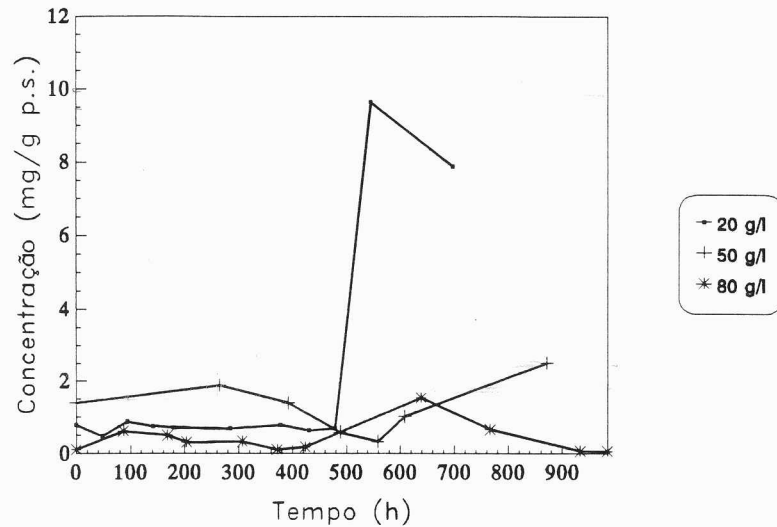


Fig. 2.13. Acumulação da maackiaina nas células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e diversas concentrações de sacarose.

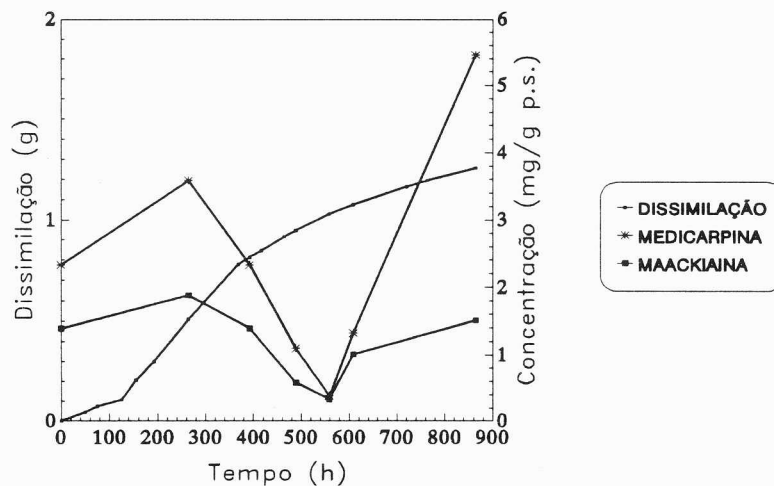


Fig. 2.14. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 50 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ao longo do crescimento.

Nas culturas suplementadas com 80 g/l, os níveis intracelulares máximos de medicarpina (7,7 mg/g) e maackiaina (1,5 mg/g) foram registados às 640 h (Fig. 2.12 e 2.13). Na mesma altura, a presença destes compostos no meio de cultura, era praticamente nula (Fig. 2.16 e 2.17). A partir das 640 h, verificou-se uma diminuição da acumulação intracelular da medicarpina e da maackiaina (Fig. 2.15). Às 770 h, os teores de medicarpina e de maackiaina eram de cerca de 3,5 mg/g e 0,66 mg/g, respectivamente (Fig. 2.15). A esta diminuição dos teores intracelulares correspondeu, apenas, um ligeiro aumento de cerca de 0,2 mg/g (p. s.) no meio de

cultura (Fig. 2.16 e 2.17). Resultados idênticos foram registados nas culturas suplementadas com 50 g/l de sacarose (Fig. 2.14, 2.16 e 2.17), o que faz suspeitar da intervenção de peroxidases extracelulares, na sua degradação, à semelhança do que foi observado por Barz *et al.* (1988a; 1988b), em culturas de células de *C. arietinum*.

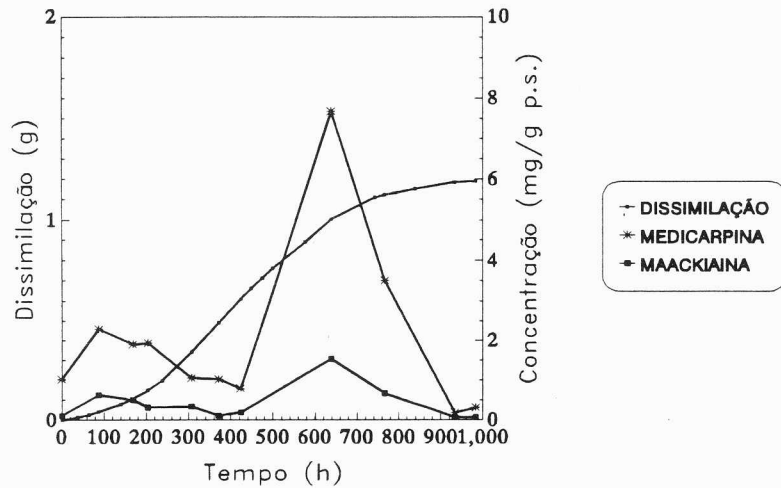


Fig. 2.15. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 80 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, ao longo do crescimento.

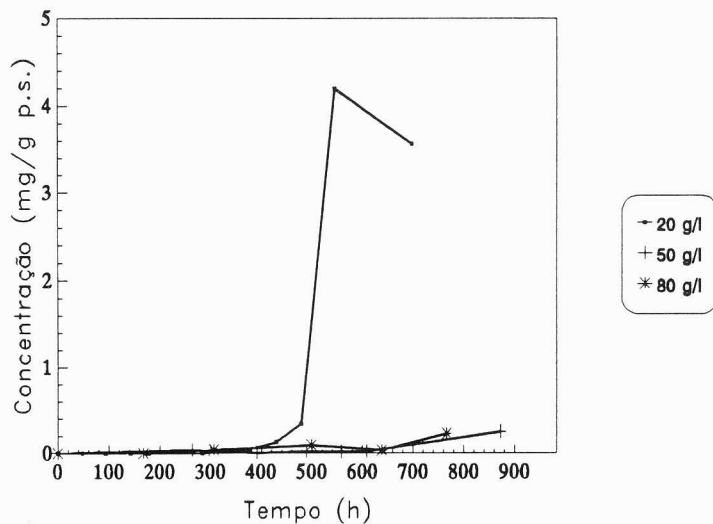
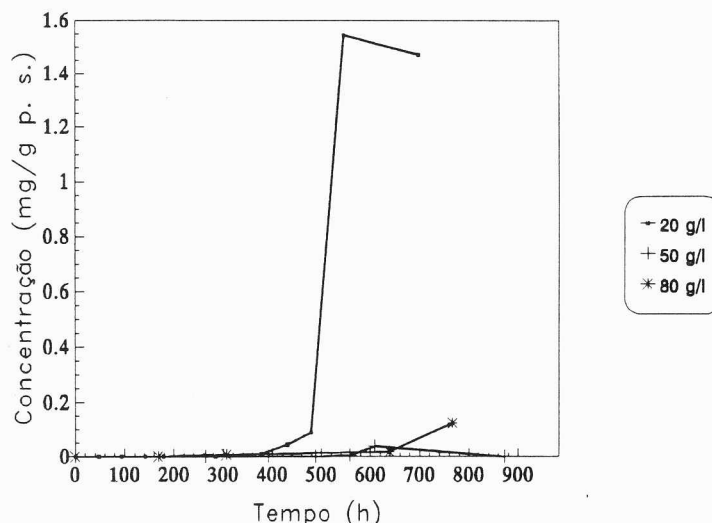


Fig. 2.16. Acumulação da medicarpina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e diversas concentrações de sacarose.



5 **Fig. 2.17.** Acumulação da maackiaina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e diversas concentrações de sacarose.

Nas culturas de *O. natrix*, concentrações elevadas de sacarose (50 e 80 g/l), não levaram a maior acumulação de medicarpina e maackiaina. Nestas culturas, a elevada relação carbono / azoto não teve como contrapartida maior produção dos dois pterocarpanos. O grau acentuado de acastanhamento, nelas observado, sugere, no entanto, a produção de outros compostos de natureza fenólica. Vários autores referem a formação de polifenóis (Westcott e Henshaw, 1976), fenóis (De-Eknamkul e Ellis, 1985b), antocianinas (Knobloch *et al.*, 1982; Cormier *et al.*, 1990), derivados de naftoquinonas (Fujita *et al.*, 1981a), antraquinonas (Harkes *et al.*, 1985) e ácido rosmarínico (Hippolyte *et al.*, 1992), em culturas mantidas com elevadas concentrações de sacarose. Sendo a elevada relação carbono / azoto do meio de cultura, um dos factores apontados para a formação destes compostos, a depleção do azoto parece ser determinante para a utilização da fonte de carbono no metabolismo secundário (Jessup e Fowler, 1977, Pryke e Ap Rees, 1977; Knobloch *et al.*, 1981). Segundo Ibrahim (1987), concentrações elevadas de sacarose criariam, nalgumas culturas de células vegetais, condições de stress osmótico, que inibiriam o crescimento celular, e consequentemente provocariam alterações no metabolismo celular, favorecendo a produção de metabolitos secundários. Nas culturas de *O. natrix*, esta condição não se verificou porquanto, a par da fenolização registou-se também crescimento celular.

2.1.2.4. Influência da regulação hormonal na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão

Nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose estudou-se a acumulação da medicarpina e da maackiaina, em função de diversas regulações hormonais: 1) 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin; 2) 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin; 3) 0,5 mg/l IBA e 1 mg/l Kin e 4) 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l BA.

A menor acumulação da medicarpina e da maackiaina intracelular foi registada nas variações contendo 2,4-D, cujos valores máximos de 3,6 e 1,9 mg/g (p. s.), respectivamente, foram encontrados às 520 h (Fig. 2.18 e 2.19). Estes resultados são concordantes com os de Ozeki *et al.* (1989; 1990) que verificaram ser o 2,4-D uma auxina inibidora da síntese de antocianinas, nas culturas de células em suspensão de cenoura, inibindo especificamente a síntese de mRNAs da Fenilalanina Amónia Liase (PAL) e da chalcona sintase. Outros autores verificaram também uma diminuição da produção de fenóis, em cultura de células de outras espécies de plantas, mantidas na presença de 2,4-D, por inibição da PAL (Sugano *et al.*, 1975; Sahai e Shuler, 1984; Takeda, 1988; Funk e Brodelius, 1990).

As culturas suplementadas com IBA/Kin ou NAA/BA apresentaram, ao longo de, praticamente, todo o ciclo de crescimento uma acumulação de medicarpina e de maackiaina intracelulares superior à das culturas suplementadas com NAA/Kin (Fig. 2.18 e 2.19).

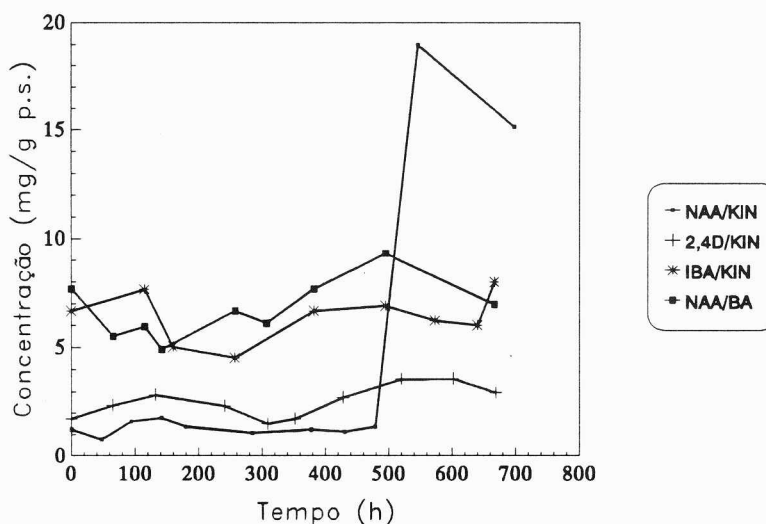


Fig. 2.18. Acumulação da medicarpina nas células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose e diversas suplementações hormonais.

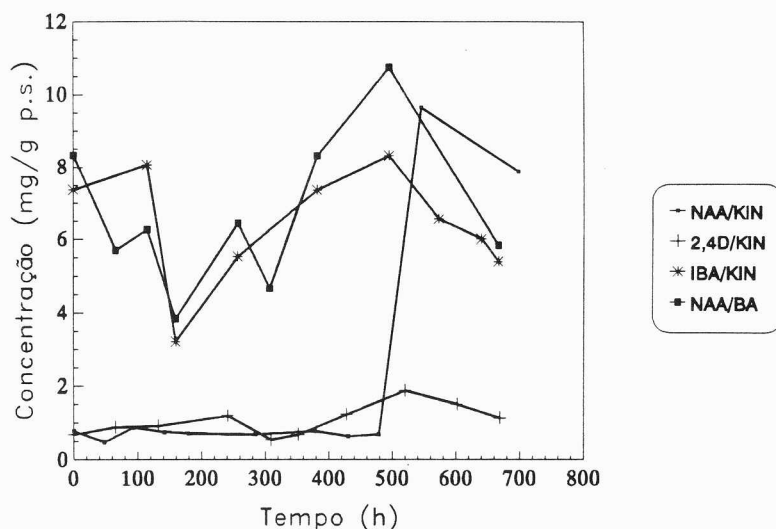
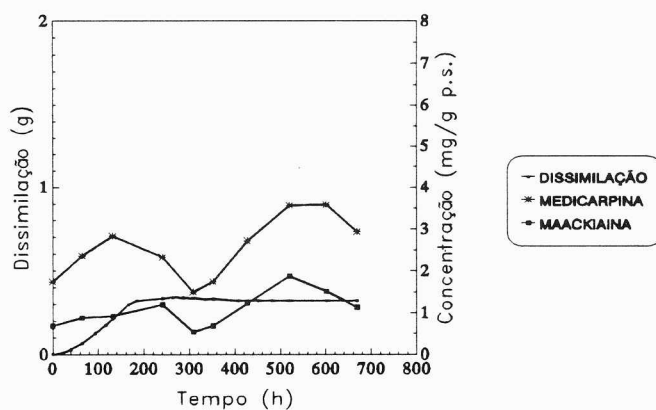
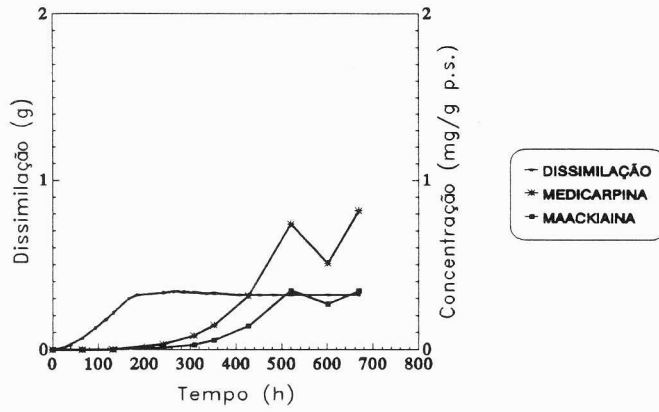


Fig. 2.19. Acumulação da maackiaina nas células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose e diversas suplementações hormonais.

A relação medicarpina / maackiaina, nas culturas suplementadas com NAA/BA e IBA/Kin, é diversa da das culturas suplementadas com NAA/Kin ou 2,4-D/Kin. Enquanto nestas últimas (Fig. 2.20a e 2.20b), a medicarpina surgia em concentração superior à da maackiaina, nas culturas suplementadas com NAA/BA ou IBA/Kin a relação era praticamente igual a 1 (Fig. 2.21 e 2.22). Estes resultados, bem como a maior acumulação de medicarpina e de maackiaina, verificada ao longo do tempo, nas culturas suplementadas com IBA/Kin ou NAA/BA (Fig. 2.18 e 2.19) levam a sugerir que as auxinas e as citocininas, utilizadas no meio de cultura, influenciam de modo diverso a biossíntese e acumulação destes pterocarpanos.

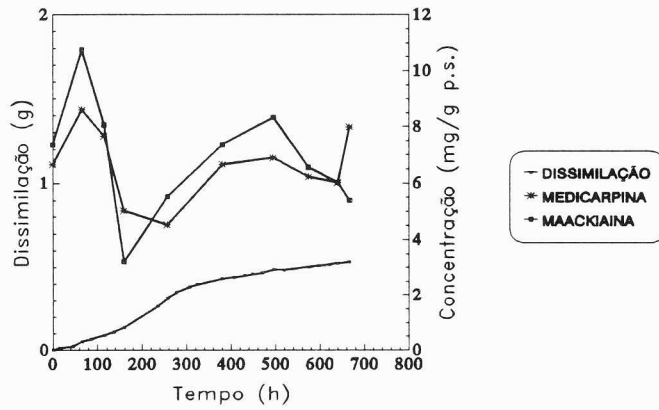


a

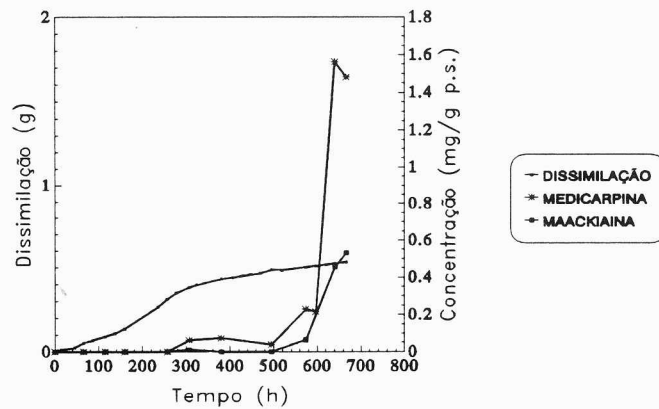


b

Fig. 2.20. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células (a) e no meio (b), nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, ao longo do crescimento.



a



b

Fig. 2.21. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células (a) e no meio (b), nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l IBA e 1 mg/l Kin, ao longo do crescimento.

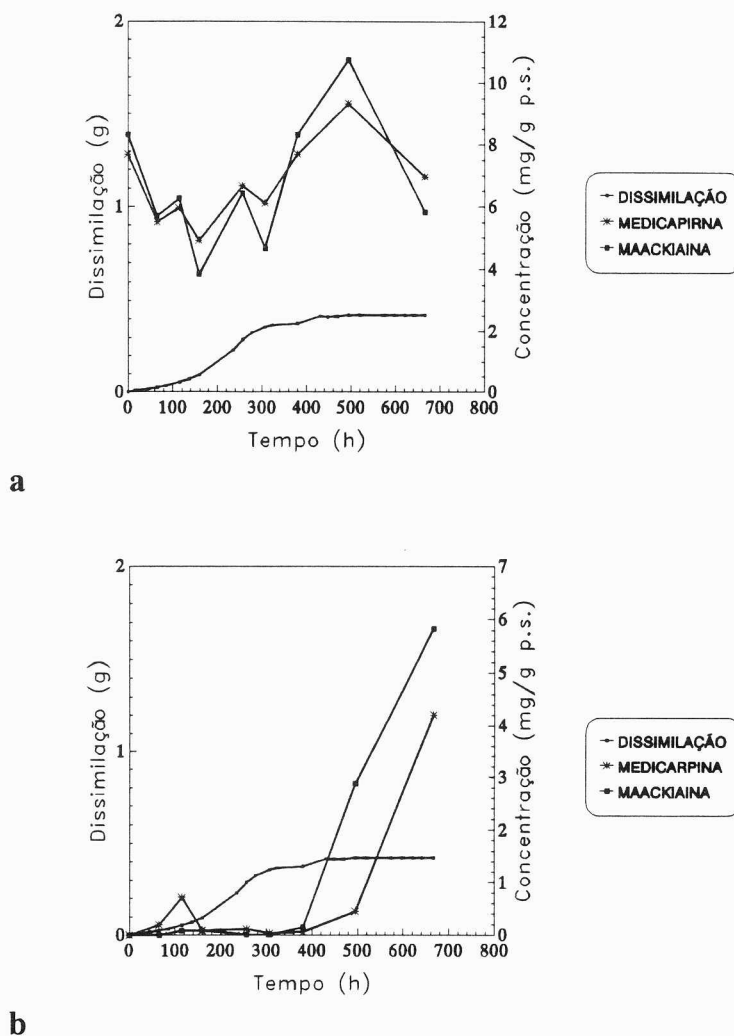


Fig. 2.22. Acumulação da medicarpina e da maackiaina nas células (a) e no meio (b), nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l BA, ao longo do crescimento.

Em qualquer uma das quatro regulações hormonais ensaiadas, verificou-se liberação de medicarpina e de maackiaina para o meio de cultura, embora quantitativamente diversa (Fig. 2.23 e 2.24). De um modo geral, a liberação destes compostos para o meio verificou-se, essencialmente, a partir das 480-500 h (Fig. 2.23 e 2.24), ou seja, durante a fase estacionária (Fig. 2.9; 2.20; 2.21 e 2.22). No entanto, nas culturas suplementadas com NAA/BA detectaram-se níveis apreciáveis (0,9 mg/g, p. s.) de ambos os pterocarpanos, por volta das 50-100 h. A presença da medicarpina e da maackiaina nestas culturas, no meio de cultura, logo nas primeiras 50 h após a repicagem, é difícil de explicar.

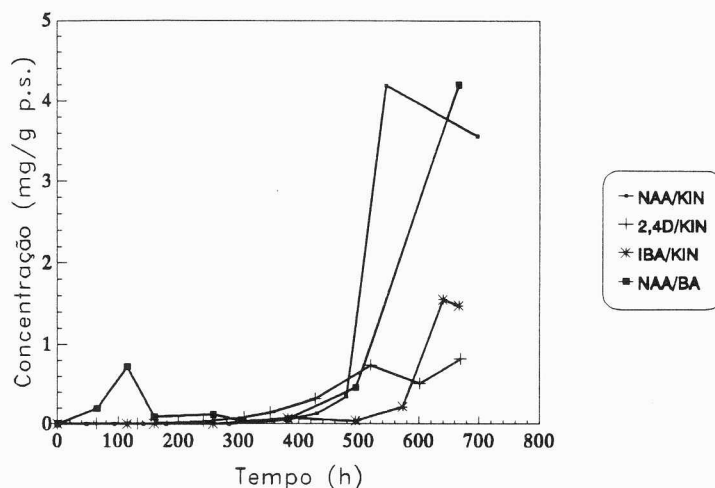


Fig. 2.23. Acumulação da medicarpina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose e diversas regulações hormonais.

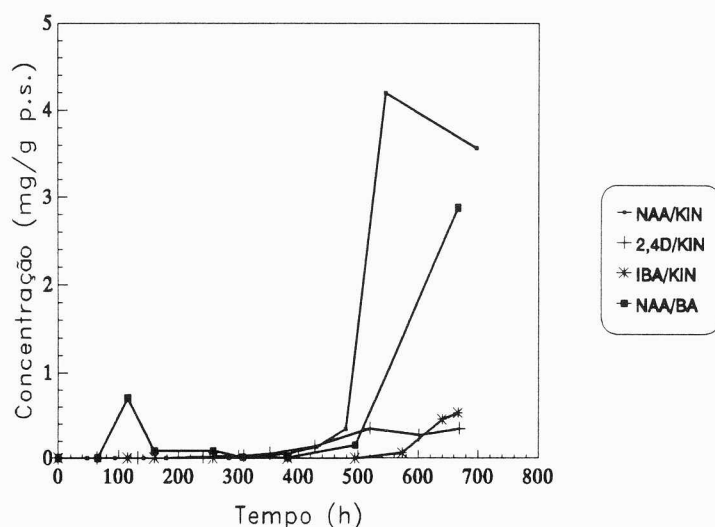


Fig. 2.24. Acumulação da maackiaina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose e diversas regulações hormonais.

2.1.2.5. Influência do balanço de azoto na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão

Vários estudos têm sido efectuados sobre o efeito da suplementação azotada, tanto inorgânica (nitrato, amónio) como orgânica (aminoácidos), quer no estabelecimento de cultura de células, quer na produção de metabolitos secundários.

Nos meios de cultura, geralmente utilizados na cultura de células vegetais, o azoto inorgânico é um macronutriente, que cujo tipo e concentração usados, influenciam significativamente o crescimento da cultura e a formação de metabolitos secundários. Vários autores têm estudado o efeito do azoto e bem assim a relação carbono / azoto na obtenção destes metabolitos (Veliky e Rose, 1973; Westcott e Henshaw, 1976; Fujita *et al.*, 1981b; Merillon *et al.*, 1983; Rokem *et al.*, 1985; Nigra *et al.*, 1990; Do e Cormier, 1991; De-Eknamkul e Ellis, 1985b; Sahai e Shuler, 1984; Phillips e Henshaw, 1977; Amorim *et al.*, 1977).

As culturas de células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, têm como principais fontes de azoto inorgânico o KNO₃ e o NH₄NO₃. Utilizando as mesmas fontes de azoto e mantendo inalterados os restantes componentes do meio, foram ensaiados balanços de azoto diversos: 1) 1,9 g/l KNO₃ e 1,65 g/l NH₄NO₃ (variação A); 2) 1,65 g/l KNO₃ e 1,9 g/l NH₄NO₃ (variação B); 3) 4 g/l KNO₃ (variação C) e 4) 3,2 g/l NH₄NO₃ (variação D). Na Tabela 2.3 apresentam-se os teores em NO₃⁻, NH₄⁺, azoto total, relações NO₃⁻/NH₄⁺ e carbono / azoto(C/N), presentes no meio de cultura aquando da inoculação, nos vários ensaios.

Tabela 2.3. Teores iniciais de NH₄⁺, NO₃⁻, azoto total, relação NO₃⁻/NH₄⁺ e relação C/N presentes no meio MS nas diversas variações ensaiadas nas culturas de células em suspensão de *O. natrix*

Variação A- 1,9 g/l KNO₃ e 1,65 g/l NH₄NO₃;

Variação B- 1,65 g/l KNO₃ e 1,9 g/l NH₄NO₃;

Variação C- 4 g/l KNO₃;

Variação D- 3,2 g/l NH₄NO₃

	Variação A (g/l)	Variação B (g/l)	Variação C (g/l)	Variação D (g/l)
NH ₄ ⁺	0,37	0,43	0,00	0,72
NO ₃ ⁻	2,45	2,49	2,46	2,48
Azoto	0,84	0,89	0,55	1,12
Relação C:N	23,8	22,5	36,4	17,9
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	6,62	5,81	-	3,44

Em qualquer dos ensaios, verificou-se sempre a acumulação de medicarpina e maackiaina nas células (Fig. 2.25 e 2.26). Contudo, na variação D registaram-se os menores teores de ambos os pterocarpanos, ao longo de todo o ciclo celular, em contraste com a variação C, onde se registaram níveis mais elevados (Fig. 2.25 e 2.26).

Diversos estudos têm demonstrado que, nas culturas de células em suspensão, níveis decrescentes de nitrato, no meio de cultura, são responsáveis pelo aumento da produção de polifenóis (Westcott e Henshaw, 1976; Sahai e Shuler, 1984), antocianinas (Knobloch *et al.*, 1982), leucoantocianinas (Amorim *et al.*, 1977) e ácido ros-

marínico (De-Eknamkul e Ellis, 1985b). Nas culturas de *O. natrix*, e apesar do teor em azoto ser diverso, as diferenças verificadas na acumulação da medicarpina e da maackiaina não se ficaram a dever a concentrações diversas de nitrato no meio, uma vez que este se manteve constante nas quatro variações estudadas. Como se pode verificar pela Tabela 2.3., a variação C é a que apresenta menor concentração inicial de azoto inorgânico disponível, contrariamente à variação D. Os nossos resultados sugerem uma relação inversa entre a concentração inicial de azoto inorgânico no meio de cultura e os teores de medicarpina e de maackiaina acumulados.

Vários autores têm verificado, noutras culturas de células vegetais, que a relação C / N, dentro dos valores tolerados pelas células, é determinante na produção e acumulação de metabolitos secundários (Nash e Davies, 1972; Westcott e Henshaw, 1976; Phillips e Henshaw, 1977; Sahai e Shuler, 1984; Nigra *et al.*, 1990; Do e Cormier, 1991). Westcott e Henshaw (1976) verificaram, por exemplo, que em culturas de *Acer pseudoplatanus*, a acumulação de fenóis era maior quando a concentração de azoto total baixava no meio. Resultados idênticos foram obtidos em culturas de *Rosa* (Davies, 1972) e de soja (Hahlbrock *et al.*, 1974). Contudo, nas culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 50 e 80 g/l de sacarose, onde a relação C / N é de 59,5 e 95,2, respectivamente, não se verificou maior acumulação de medicarpina e de maackiaina (Fig. 2.12 e 2.13).

A variação A, com 0,37 g/l de amónio inicial, apresentou valores de acumulação de medicarpina e de maackiaina inferiores aos da variação C, desde a altura da repicagem até, sensivelmente, às 500 h. Por outro lado, na variação B, com 0,43 g/l de amónio inicial, registaram-se, valores de medicarpina e de maackiaina superiores aos da variação D, com 0,72 g/l de amónio inicial, e inferiores à variação C, com 0 g/l de amónio inicial, ao longo de todo o tempo em que decorreram os ensaios (Fig. 2.25 e 2.26). Estes resultados sugerem que o amónio inibe de alguma forma, a acumulação de medicarpina e de maackiaina. Também Fujita *et al.* (1981a) verificaram, em cultura de células em suspensão de *Lithospermum erythrorhizon* que o amónio inibia a produção de shikonina. Segundo estes autores, no meio contendo 0,033 mM de amónio, a produção de shikonina, era metade da verificada no meio desprovido de amónio. Ainda segundo os mesmos autores, a inibição da acumulação de shikonina era total quando as células eram cultivadas em meio contendo 0,099 mM de amónio. Apesar de na variação B, com 0,43 g/l de amónio inicial, a acumulação de medicarpina e de maackiaina intracelulares ser, durante as primeiras 400 h, cerca de duas vezes superior à da variação A, com 0,37 g/l de amónio inicial, a partir das 450 h, enquanto na variação A se verificou um aumento abrupto dos teores de medicarpina e maackiaina, na variação B, tal não se verificou (Fig. 2.25 e 2.26), o que sugere igualmente um efeito inibidor do amónio, na variação B.

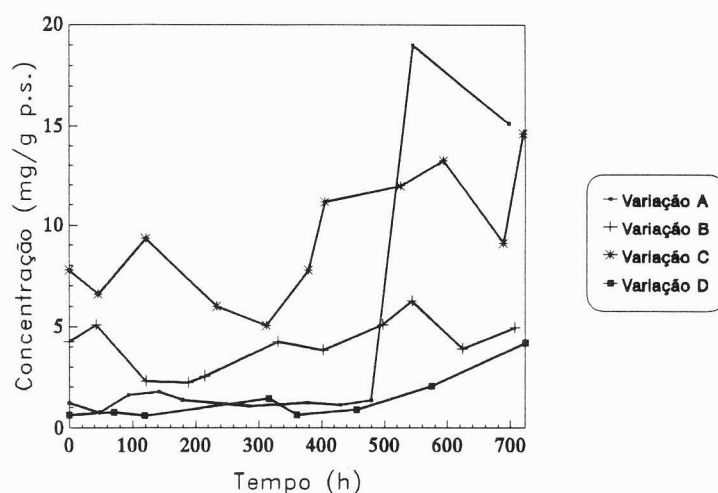


Fig. 2.25. Acumulação da medicarpina nas células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversos balanços de azoto.

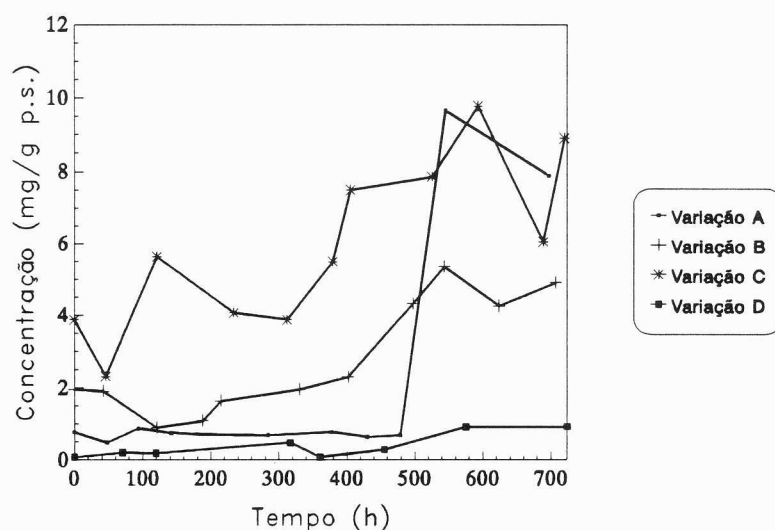


Fig. 2.26. Acumulação da maackiaina nas células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversos balanços de azoto.

Nas culturas de *O. natrix* mantidas nas variações A e B (Fig. 2.27 e 2.28), a libertação de medicarpina e de maackiaina para o meio de cultura, foi registada cerca das 400-450 h, enquanto nas mantidas nas variações C e D tal só se verificou cerca das 550-600 h (Fig. 2.27 e 2.28). É de notar que, na variação C, os teores dos dois pterocarpanos, registados ao fim de 700 h de cultura eram significativamente inferiores aos das restantes variações. As fases estacionárias das variações C e D atingidas mais tarde que nas variações A e B (Fig. 1.32), podem justificar estes resultados.

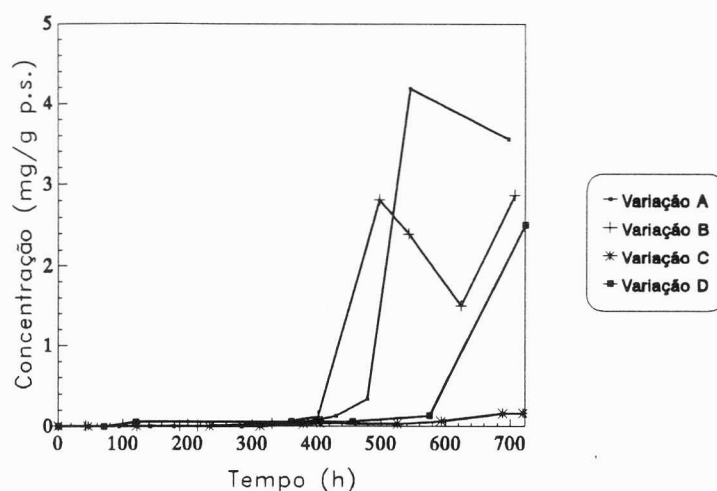


Fig. 2.27. Acumulação da medicarpina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natix*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversos balanços de azoto.

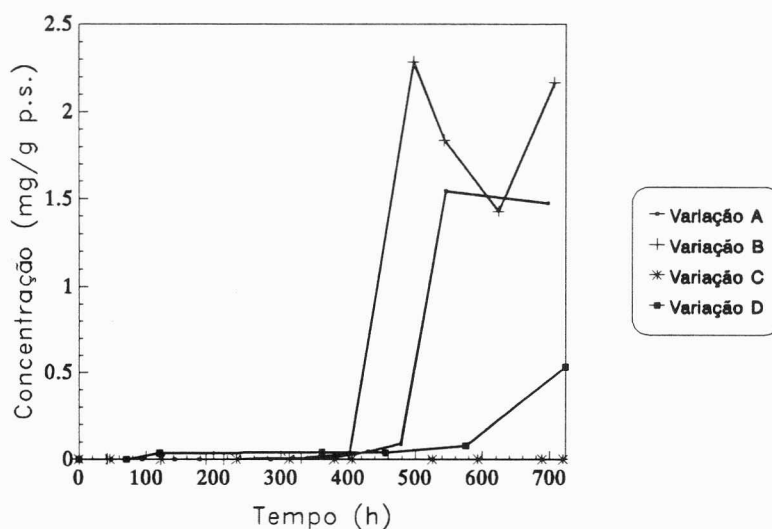


Fig. 2.28. Acumulação da maackiaina no meio, nas culturas de células em suspensão de *O. natix*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, em diversos balanços de azoto.

2.1.2.6. Influência do cobre na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão

O cobre é um micronutriente que faz parte do meio de cultura das células vegetais. A sua influência no crescimento celular e, em particular, na produção de shikoinina, por cultura de células de *Lithospermum erythrorhizon*, tem sido estudada por alguns autores (Fujita *et al.*, 1981b; Yamada e Fujita, 1983).

Nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, os registos sobre a acumulação da medicarpina e da maackiaina foram efectuados logo durante a primeira repicagem das culturas para as novas condições. Este procedimento deveu-se ao facto de as células acastanharem significativamente ao fim de dois dias após a repicagem e manterem um crescimento muito lento (Fig. 2.29), além de não suportarem as repicagens subsequentes. Estes resultados revelam uma elevada toxicidade do cobre quando administrado em concentrações elevadas. Segundo Teasdale (1987), o cobre manifesta efeitos tóxicos quando a sua concentração se aproxima da do EDTA total no sistema, sugerindo que somente níveis relativamente baixos de cobre livre são tolerados.

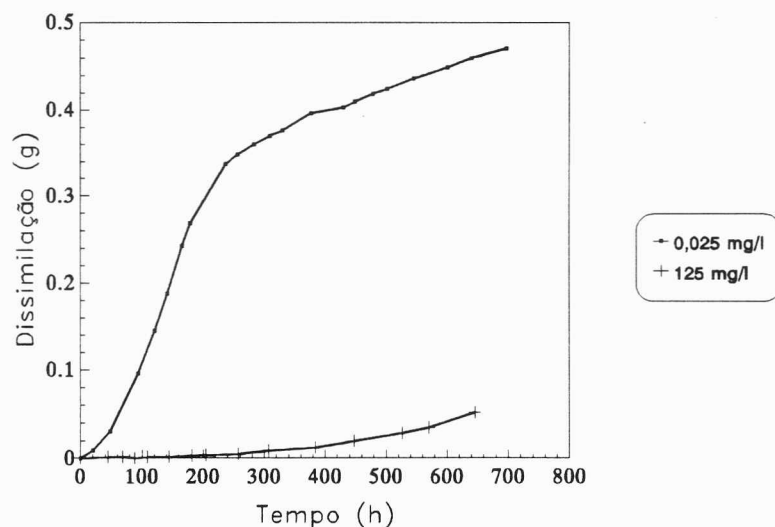


Fig. 2.29. Curvas de dissimilação das culturas de *Ononis natrix* mantidas em meio base MS ou com 125 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

Os níveis intracelulares da medicarpina e da maackiaina, nas culturas mantidas com 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foram, ao longo do tempo, inferior aos das culturas mantidas com 0,025 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.30 e 2.31). Por seu turno, os teores de ambos os pterocarpanos, no meio de cultura, foram, durante as primeiras 400-500 horas após a repicagem, superiores aos das culturas mantidas com menor concentração de sulfato de cobre (Fig. 2.32 e 2.33). Os níveis mais elevados de medicarpina (2,1 mg/g, p. s.) e de maackiaina (2,4 mg/g, p. s.) foram registados ao fim de 70-80 horas após a repicagem. Estes resultados apoiam a hipótese de uma produção e imediata libertação de medicarpina e maackiaina para o meio de cultura, quando as células são expostas a condições de stress tão severas.

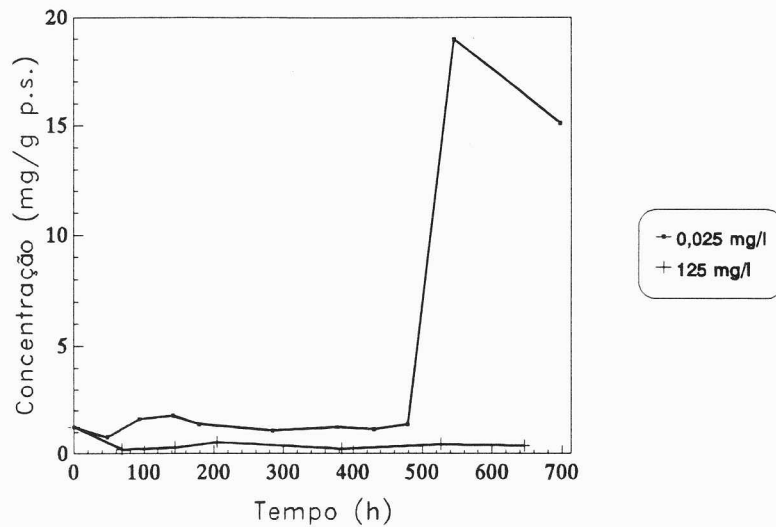


Fig. 2.30. Acumulação da medicarpina nas células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio base MS ou com 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

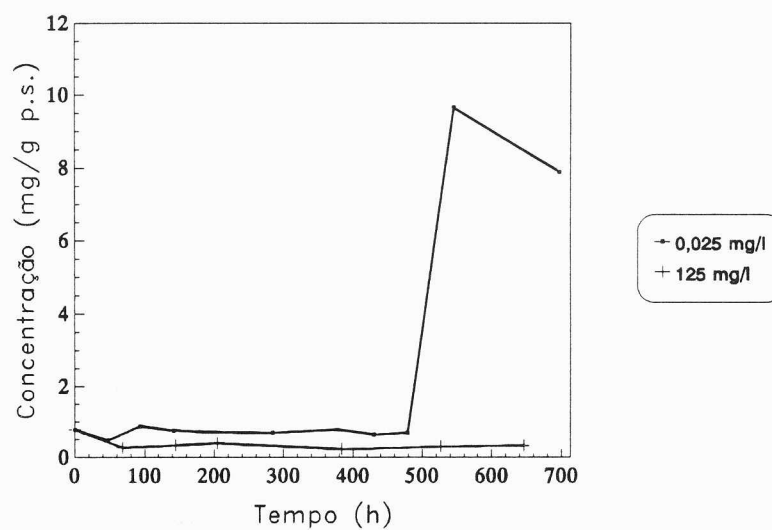


Fig. 2.31. Acumulação da maackiaina nas células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio base MS ou com 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

O cobre tem sido utilizado como elicitador abiótico, em culturas de células vegetais de espécies diversas e, segundo Barz *et al.* (1988a), os metais pesados (cobre, mercúrio, manganésio), quando funcionam como elicitadores, exibem curvas ótimas pronunciadas, indicando efeitos tóxicos muito fortes, quando em concentrações elevadas. As concentrações elevadas de cobre determinaram também uma alteração na relação medicarpina / maackiaina, no meio de cultura. Enquanto as culturas mantidas em meio base MS apresentaram um teor de medicarpina cerca do

dobro, relativamente à maackiaina, nas culturas com 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, a relação destes compostos no meio de cultura foi de aproximadamente 1.

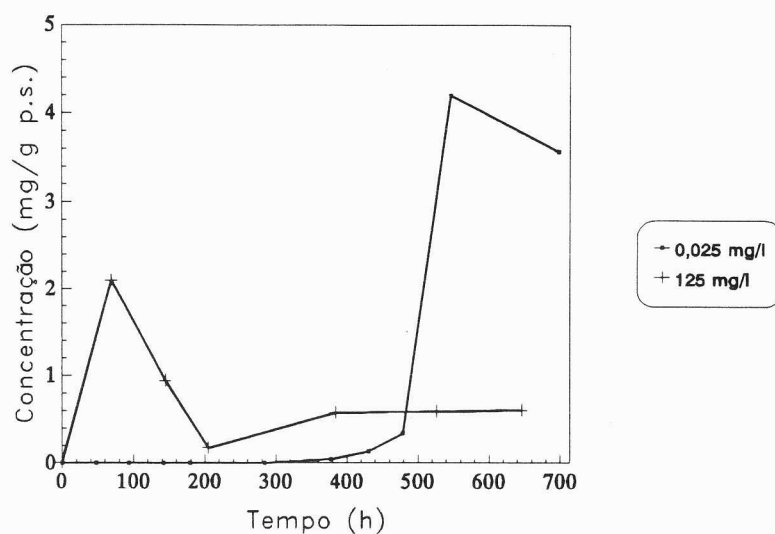


Fig. 2.32. Acumulação da medicarpina no meio, nas culturas de células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio base MS ou com 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

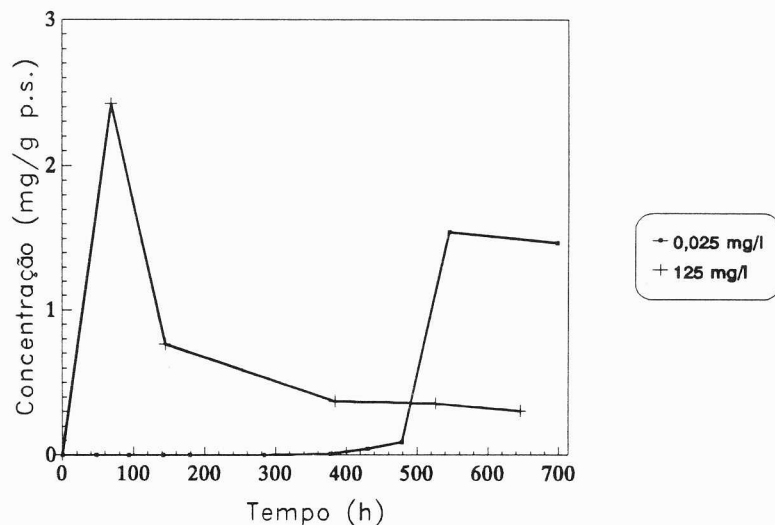


Fig. 2.33. Acumulação da maackiaina no meio, nas culturas de células em suspensão de *Ononis natrix* mantidas em meio base MS ou com 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

2.1.2.7. Influência da adição de precursores na acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão

A medicarpina e a maackiaina são pterocarpanos de biossíntese mista, ou seja, são compostos provenientes de duas vias distintas: a via shikimato-polimalonato (Fig. 2.34). A adição de precursores a cultura de células vegetais, tem sido uma das estratégias seguida com o intuito de aumentar a produção de metabolitos secundários.

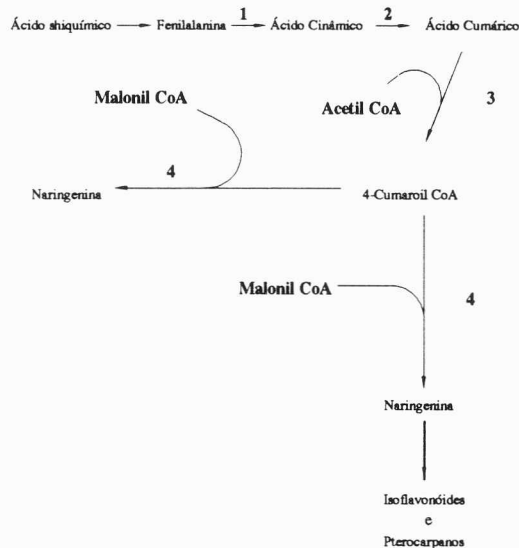


Fig. 2.34. Via biossintética dos isoflavonóides e pterocarpanos. (1) fenilalanina amônia liase; (2) ácido cinâmico 4-hidroxilase; (3) 4-cumaroil CoA ligase; (4) flavanona sintase (Adaptado de Bailey, 1982).

Nas culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin e bem assim aquelas suplementadas ainda com 50 mg/l de acetato de sódio e 50 mg/l de fenilalanina não apresentaram alterações significativas na acumulação de medicarpina e maackiaina (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin, na presença ou ausência de fenilalanina e acetato de sódio

Tempo (h)	Com fenilalanina e acetato de sódio				Sem fenilalanina e acetato de sódio			
	Medi- carpina intracelular (mg/g, p. s.)	Maacki- aina in- tracelu- lar (mg/g, p. s.)	Medi- carpina extracelular (mg/g, p. s.)	Maacki- aina ex- tracelu- lar (mg/g, p. s.)	Medi- carpina intracelular (mg/g, p. s.)	Maacki- aina in- tracelu- lar (mg/g, p. s.)	Medi- carpina extracelular (mg/g, p. s.)	Maacki- aina ex- tracelu- lar (mg/g, p. s.)
93,5	1,69	0,89	0,00	0,00	1,62	0,88	0,00	0,00
284	1,10	0,65	0,00	0,00	1,08	0,69	0,00	0,00
690	15,10	7,52	3,61	1,29	15,4	7,88	3,56	1,47

Segundo Barz *et al.* (1989), o passo limitante da síntese da medicarpina e da maackiaina é a hidroxilação da formononetina, na posição 2', pela formononetina 2'-hidroxilase (Fig. 2.35). Por outro lado, alguns autores sugerem que a adição de precursores às culturas de células vegetais só leva a um aumento de produção do composto pretendido quando o intermediário adicionado entra na via de síntese numa posição relativamente próxima do produto final (Collin e Watts, 1983).

Neste contexto, os precursores acetato de sódio e fenilalanina, adicionados às culturas de *O. natrix*, sendo precursores longínquos da medicarpina e da maackiaina, podem ter sido canalizados para outras vias metabólicas, nomeadamente a síntese de fenóis ligados à parede. Com efeito, Hall e Yeoman (1991) verificaram que a fenilalanina, adicionada às culturas de células imobilizadas de *Capsicum frutescens*, não promovendo uma síntese aumentada da capsaicina, era incorporada em fenóis ligados à parede celular.

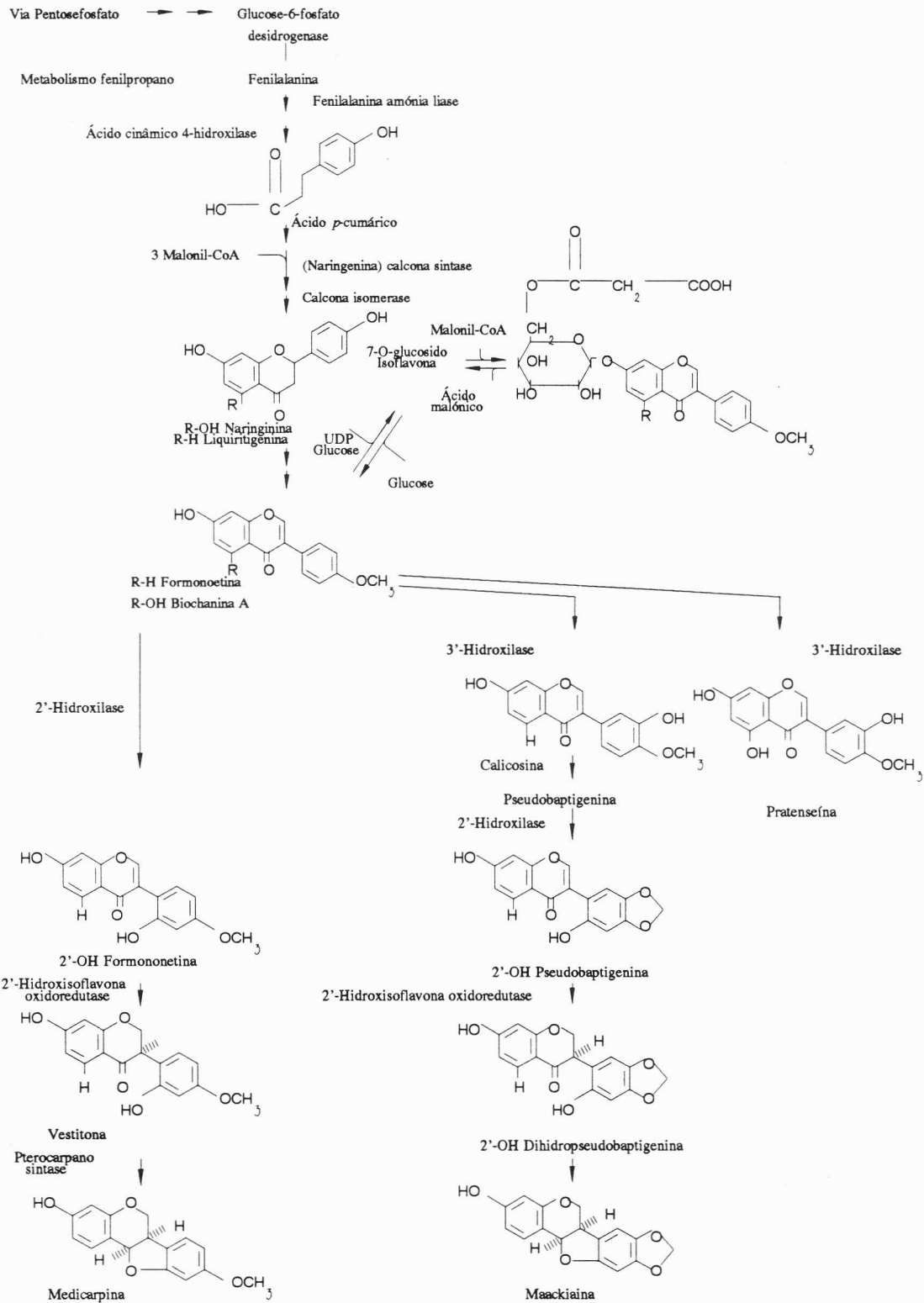


Fig. 2.35. Esquema da via biossintética da medicarpina e maackiaina em culturas de células em suspensão de *C. arietinum* L. (Adaptado de Daniel *et al.*, 1990).

IV. RESUMO E CONCLUSÕES

O reino vegetal continua a ser uma fonte de produtos com interesse comercial nomeadamente para as indústrias farmacêutica, de perfumes, alimentar e agroquímica. No entanto, a produção desses compostos é muitas vezes reduzida por diversos factores de natureza ambiental, por pestes e doenças. As culturas de células vegetais surgem, assim, como uma alternativa aos meios de produção tradicionais, no entanto, poucas têm sido as culturas capazes de produzir metabolitos secundários em níveis semelhantes aos das plantas na Natureza. Além disso, este processo é também mais dispendioso do que os processos empregues na Microbiologia, para a obtenção, por exemplo, de aminoácidos e antibióticos.

Alguns estudos têm sido feitos para melhorar a produção de metabolitos secundários com interesse comercial por culturas de células vegetais. Manipulação das condições de cultura (pH, temperatura, nutrição, reguladores de crescimento, arejamento), adição de precursores, imobilização, "hairy roots", "two phase culture system", selecção de mutantes, selecção de linhas altamente produtoras e elicitação, são algumas das estratégias seguidas para induzir uma maior acumulação de metabolitos secundários.

Ononis natrix L. ssp. *ramosissima* é um membro da família Leguminosae, cujas folhas jovens acumulam medicarpina e maackiaina, quando expostas a radiação ultravioleta. Estes dois compostos foram considerados fitoalexinas, por serem metabolitos de baixo peso molecular, com actividade fungicida e bactericida e terem resultado da resposta a um elicitor abiótico (radiação UV).

Neste capítulo, consideraram-se as seguintes áreas de estudo:

1) Obtenção e caracterização das condições de crescimento das culturas de células em suspensão de *O. natrix* em diversas condições nutricionais e de regulação hormonal e 2) Acumulação de medicarpina e maackiaina nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* em diversas condições nutricionais, regulação hormonal, e na presença de precursores e elicitadores.

1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *O. NATRIX*

Os *calli* friáveis de *O. natrix* foram obtidos por desdiferenciação de segmentos de hipocótilos, em meio MS sólido suplementado com 20 g/l de sacarose, 20 mg/l de ácido ascórbico, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. A partir destes *calli* friáveis foram obtidas culturas de células em suspensão no mesmo meio base mas líquido e com duas regulações hormonais diversas: 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l NAA

e 1 mg/l Kin. O antioxidante foi também substituído por cisteína. Ao fim de 3-4 subculturas o antioxidante foi suprimido do meio de cultura. Nestas culturas ensaiaram-se diversas concentrações de inóculo, tempo de subcultura, concentração e fonte de carbono, balanço de azoto e diversas regulações hormonais. Nestes estudos utilizaram-se culturas previamente estabilizadas, nas condições a ensaiar, durante pelo menos 3-4 repicagens. As condições mais favoráveis ao crescimento das culturas de células em suspensão foram: 2 g/50 ml (p. f.) de inóculo inicial em meio MS suplementado com 40 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin. Nestas condições de cultura, as células em suspensão de *O. natrix* apresentaram um tempo de duplicação de 36,3 h.

Procedeu-se, ainda, à caracterização das condições de cultura por determinação da mobilização do amónio, nitrato e açúcares do meio de cultura, durante o ciclo de crescimento celular. As culturas de células de *O. natrix* hidrolisavam rapidamente a sacarose do meio, em glucose e frutose, independentemente das condições de cultura. A sacarose era rapidamente metabolizada desaparecendo do meio de cultura ao fim de poucos dias após a subcultura. Em praticamente todas as culturas, após a hidrólise da sacarose, os níveis de frutose eram superiores aos da glucose. Constituem excepção as culturas suplementadas com 50 g/l e 80 g/l de sacarose. Neste caso, os teores de frutose e glucose no meio de cultura eram praticamente iguais ao longo do crescimento. O consumo preferencial da glucose relativamente à frutose verificado nas culturas de *O. natrix* parece depender da sua concentração no meio de cultura. O momento a partir do qual as células passaram a consumir preferencialmente a frutose não parece depender unicamente da exaustão da glucose no meio, mas também de outros factores não determinados. A exaustão dos açúcares do meio coincidiu com o atingir da fase estacionária. As culturas suplementadas com 20 g/l de glucose ou frutose mobilizaram igualmente estes monossacáridos do meio de cultura, embora a sacarose tenha sido a fonte de carbono que melhor induziu o crescimento das culturas de células de *O. natrix*. A velocidade de mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura dependeu também directamente da concentração e natureza da fonte de azoto presente no meio e bem assim da regulação hormonal.

A mobilização do amónio e do nitrato do meio de cultura, nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* foi influenciada pela concentração e fonte de carbono utilizada, pelo balanço $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ e pela regulação hormonal. Na generalidade dos casos, registou-se uma mobilização acentuada de amónio, poucas horas após a repicagem. Em relação ao nitrato, a sua mobilização inicial do meio de cultura foi mais lenta, comparativamente à do amónio. O amónio e o nitrato só foram completamente mobilizados do meio de cultura nas culturas suplementadas com 50 e 80 g/l de

sacarose, o que pressupõe que no meio MS, suplementado com 10 g/l e 20 g/l de sacarose, o amónio e nitrato se encontram em concentração excessiva.

2. ACUMULAÇÃO DE MEDICARPINA E MAACKIAINA NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *O. NATRIX*

A medicarpina e a maackiaina acumuladas nas culturas de células em suspensão de *O. natrix* foram identificadas por cromatografia gás-líquido acoplado a espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear de protão, ultravioleta e testes cromogénicos. Os tempos de retenção e os espectros de massa dos extractos foram comparados com os de amostras autênticas de medicarpina e maackiaina.

Nos ensaios efectuados com a planta não sujeita a qualquer processo de elicitação, detectaram-se vestígios de medicarpina e de maackiaina. Contudo, as culturas de células em suspensão de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin acumularam níveis de medicarpina e maackiaina significativamente superiores aos da planta, provavelmente devido a factores de stress exercidas pelo meio de cultura. A acumulação destes dois pterocarpanos, quer nas células quer no meio de cultura, foi estudada sob condições nutricionais e regulação hormonal diversas, ao longo do crescimento celular. A adição de diversos elicitadores (micélio liofilizado e autoclavado de *Phytophthora cinnamomi*, células liofilizadas e autoclavadas de *Candida albicans* e celulase) não levou a uma maior acumulação da medicarpina e da maackiaina nas culturas de *O. natrix*. Em praticamente todas as variações ensaiadas, os dois pterocarpanos, acumularam-se essencialmente nas células. Só na fase estacionária houve libertação para o meio de cultura, provavelmente devido ao rebentamento celular. Em quase todas as culturas, a acumulação dos dois compostos foi maior durante a fase estacionária. Das condições ensaiadas, as culturas de *O. natrix* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin foram as que acumularam níveis mais elevados de medicarpina e maackiaina. Nas culturas mantidas nas mesmas condições que as anteriores, mas em que a fonte de azoto foi substituída por 4 g/l KNO₃, ou naquelas suplementadas com 0,5 mg/l IBA / 1 mg/l Kin e 0,5 mg/l NAA / 1 mg/l BA, verificou-se uma maior acumulação daqueles pterocarpanos, logo após a repicagem, que se manteve mais ou menos constante até ao atingir da fase estacionária. Nestes ensaios verificou-se, inclusivamente, que os teores de maackiaina eram superiores aos encontrados, no final da fase estacionária, nas culturas suplementadas com 20 g/l sacarose, NAA / Kin. Em contraste, as culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de glucose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin ou as culturas mantidas em meio MS, mas suplementado com 20 g/l de

sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin revelaram-se os menos produtores da medicarpina e da maackiaina. A substituição das fontes de azoto inorgânico do meio MS para 3,2 g/l NH_4NO_3 induziram igualmente a acumulação de níveis mais baixos da medicarpina e da maackiaina. Concentrações elevadas de sacarose (50 e 80 g/l) conduziram, também, a uma acumulação destes dois compostos. Neste caso, verificou-se um maior acastanhamento das culturas e uma menor acumulação dos pterocarpanos na fase estacionária.

A adição de precursores (acetato de sódio e fenilalanina) não levou a maior acumulação da medicarpina e da maackiaina nas culturas de células em suspensão de *O. natrix*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin. Tudo indica que os precursores utilizados tenham sido canalizados para a síntese de outros compostos que não os pterocarpanos em estudo.

Concentrações elevadas de sulfato de cobre (125 mg/l) revelaram-se tóxicas para as células. Em contraste com as restantes culturas, estas apresentaram níveis relativamente elevados de medicarpina e de maackiaina no meio de cultura, logo após a repicagem. No entanto, a quantidade total destes pterocarpanos, quer nas células quer no meio de cultura, foi muito inferior à das restantes culturas.

A relação medicarpina / maackiaina variou entre 1, nas culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l BA, ou 0,5 mg/l IBA e 1 mg/l Kin, ou 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin e 125 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, ou 0,5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin, 1,9 g/l NH_4NO_3 e 1,65 g/l KNO_3 , e 2 para as restantes culturas.

IV. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The plant kingdom continues to supply many products of commercial interest such as medicines, perfumes, flavours and insecticides. However, the supply of such products is often reduced by natural factors such as environmental stress, pests and diseases. Plant cell cultures offers a way to overcome these problems. However, one of the drawbacks is that few cultures have been reported to synthesise secondary metabolites in amounts comparable to those of the mother plant. In addition, cell cultures is more costly than the traditional processes employed by microbiologists to obtain compounds like antibiotics and amino acids.

Some surveys have been performed to improve the secondary metabolites yield of commercial interest by plant cell cultures. Manipulation of culture conditions (pH, temperature, nutrition, growth regulators, aeration), precursor feeding, immobilisation, hairy roots, two phase system cultures, selection of mutants, selection of high yielding strains and elicitation were some strategies followed in order to induce greater accumulation of secondary metabolites.

Ononis natrix L. ssp. *ramosissima* is a member of Leguminosae whose leaflets have been reported to accumulate medicarpin and maackiain when exposed to short wavelength UV light (254 nm). These two compounds are called phytoalexins since they are metabolites of low molecular weight, with fungicide and bactericide activities, accumulated following an abiotic stress (short wavelength UV light).

The objectives of the work discussed in this chapter were:

1) Establishment and characterisation of cell growth pattern of suspension cultures of *O. natrix* under different nutritional and hormonal conditions and 2) Accumulation of medicarpin and maackiain in cell suspension cultures of *O. natrix* under different nutritional and hormonal conditions.

1. ESTABLISHMENT AND CHARACTERISATION OF CELL GROWTH PATTERN OF SUSPENSION CULTURES OF *O. NATRIX*

Friable calli were obtained from segments of *O. natrix* hypocotyls, on MS medium supplemented with 20 g/l sucrose, 20 mg/l ascorbic acid, 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin. Cell suspension cultures were established from these friable calli in the same liquid medium but with two different hormonal regulations: 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin or 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l Kin. The antioxidant was also replaced by cystein. This antioxidant was omitted from the culture medium after 3-4 subcultures.

Inoculum size, subculture time, carbon source and concentration, nitrogen balance and different growth regulators were assayed to survey their effects on cell

suspension cultures of *O. natrix* growth. These assays were performed with cultures previously stabilised in the new conditions for at least 3-4 subcultures. The best growth conditions were: 2 g/50 ml (f. w.) of initial inoculum in MS medium supplemented with 40 g/l sucrose, 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l Kin. In these culture conditions, the cell suspensions showed a doubling time of 36.3 hr.

A study of the mobilisation of some nutrients (carbohydrates, ammonium and nitrate) from the culture medium, during the cell growth cycle was also performed. Cell cultures of *O. natrix* rapidly hydrolysed sucrose in medium into glucose and fructose, independently of culture conditions. Sucrose was rapidly metabolised and depleted from the medium a few days after the subculture. Following the hydrolysis of sucrose, almost all cultures showed higher fructose concentrations than glucose. An exception was recorded for cultures supplemented with 50 and 80 g/l sucrose. In these cultures the amount of glucose and fructose was very similar. The preferential consumption of glucose, ascertained in cultures of *O. natrix*, seems to depend on its concentration in the medium. The moment from which the cells initiated the preferential consumption of fructose was dependent on glucose exhaustion in the medium and was also dependent on other undetermined factors. The depletion of carbohydrates from the medium was coincident with the beginning of the stationary phase. The cultures supplemented with 20 g/l glucose or fructose mobilised both monosaccharides from the medium, however sucrose was the carbon source that induced better growth of cell suspension cultures of *O. natrix*. The rate of carbohydrates depletion was closely related to the amount and nature of the nitrogen source present in the medium, as well as of the hormonal supplementation.

The mobilisation of ammonium and nitrate from the culture medium, was dependent on carbon source, sucrose concentration, nitrogen balance and hormonal supplementation. Few hours after subculture, the uptake of ammonium was higher than nitrate. The initial mobilisation of nitrate from the medium was lower than that of ammonium. The ammonium and nitrate were only completely depleted from the medium in the cultures supplemented with higher concentrations of sucrose (50 and 80 g/l). This fact suggests that ammonium and nitrate used in basal MS medium with 20 g/l sucrose were in excess.

2. ACCUMULATION OF MEDICARPIN AND MAACKIAIN IN CELL SUSPENSION CULTURES OF *O. NATRIX*

Medicarpin and maackiain accumulated in cell suspension cultures of *O. natrix* were identified by GC-MS, ¹H-NMR, UV and chromogenic tests. Retention times

and mass spectra of the compounds present in the extracts were compared with the corresponding authentic samples.

Medicarpin and maackiain were detected in traces in unelicited plant material. However, in the cell suspension cultures maintained in MS medium and supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l Kin, the amount of medicarpin and maackiain was significantly higher than in the whole plant, probably due to the stress promoted by the medium. The accumulation of these two pterocarpanes, either in the cells or in the medium, were surveyed in cultures of *O. natrix*, in different nutritional conditions, hormonal regulations, during the cell growth cycle. The addition of different elicitors (freeze dried *Phytophthora cinnamomi* autoclaved mycelium, freeze dried *Candida albicans* autoclaved cells and cellulase) did not affect the accumulation of medicarpin and maackiain, when compared to the untreated cultures. These two compounds were essentially found in the cells. However in the stationary phase both compounds were found in the medium, probably due to cells bursting. In almost all cultures the highest accumulation of medicarpin and maackiain was recorded in the stationary phase. Of the conditions assayed, the cultures of *O. natrix* maintained in MS basal medium, supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin were those that accumulated higher level of medicarpin and maackiain. The cultures maintained in the same conditions as above, but in which the nitrogen source was replaced by 4 g/l KNO₃, or in those supplemented with 0,5 mg/l IBA / 1 mg/l Kin and 0,5 mg/l / 1 mg/l BA, showed a higher accumulation of both pterocarpanes, soon after the subculture. The production was more or less constant up to the stationary phase. By this time, the amount of maackiain was higher than that of cultures supplemented with 20 g/l sucrose, NAA / Kin. In contrast, the cultures maintained in MS basal medium, supplemented with 20 g/l glucose, 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l Kin, or 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin accumulated the lowest levels of medicarpin and maackiain. In the cultures where the inorganic nitrogen source of MS basal medium was replaced by 3.2 g/l NH₄NO₃ there was also an accumulation of medicarpin and maackiain, however at lower concentrations. Other nitrogen balances assayed were: 1.65 g/l KNO₃ and 1.9 g/l NH₄NO₃ or 4 g/l KNO₃. The cultures maintained in the latter variation, and supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l Kin accumulated higher levels of medicarpin and maackiain, than the remainder, in the exponential and linear phases. The same result was obtained in cultures maintained in MS basal medium, supplemented either with 0.5 mg/l IBA and 1 mg/l Kin or with 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l BA. High sucrose concentrations (50 and 80 g/l) did not induce an increase in accumulation of medicarpin and maackiain, even in the stationary phase.

The carbon source was probably channelled to phenol synthesis since cultures became brownish in relation to the cultures supplemented with 20 g/l sucrose.

Precursor feeding (sodium acetate and phenylalanine) did not induce larger accumulation of medicarpin and maackiain in the cultures maintained in MS basal medium, supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l Kin, those compounds being probably channelled to the synthesis of other compounds.

High concentrations of copper sulphate (125 mg/l) were found to be toxic to the cells. In contrast to other cultures, these showed accumulation of medicarpin and maackiain in the medium soon after subculturing. However, the total amount of these pterocarpanes, either in cells or medium, was lower than in other cultures.

The medicarpin / maackiain ratio was 1, in the cultures maintained in MS basal medium, supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l BA, or 0.5 mg/l IBA and 1 mg/l Kin, or 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin and 125 mg/l CuSO₄, 5 H₂O, or 0.5 mg/l NAA, 1 mg/l Kin, 1.9 g/l NH₄NO₃ and 1.65 g/l KNO₃, and 2 for the remainder cultures.

C. Hyoscyamus Albus:

Aspectos Gerais,

Estudo da Influência de Diversos Factores no Crescimento das Culturas de Células em Suspensão,

Estudo da Produção de Metabolitos de Stress em Diversas Condições de Elicitação

I. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS, DISTRIBUIÇÃO E UTILIZAÇÃO

O género *Hyoscyamus* pertence à família Solanaceae, que compreende várias espécies, sendo, no entanto, as espécies *Hyoscyamus albus* e *Hyoscyamus niger*, as mais representativas em Portugal. O *H. albus* é uma espécie herbácea conhecida em Portugal por meimandro branco. Encontra-se difundida pelos países mediterrânicos e é conhecida desde os tempos dos egípcios, gregos, romanos e babilónios (Font Quer, 1981). Em Portugal Continental ocorre no noroeste, centro sul, centro oeste calcárico e basáltico, sudoeste e sudeste. É uma planta bastante viscosa que não atinge um metro de altura. Apresenta um tronco com muitos ramos, na metade superior, e é densamente piloso-glandulosa. As flores são mais pequenas e de cor mais pálida do que as da sua congénere *H. niger*. As folhas são também mais pequenas, de um verde mais pálido e menos carnudas que o meimandro negro. A floração ocorre durante o mês de Março e pode prolongar-se até finais do Verão, se este não for muito seco (Font Quer, 1981; Franco, 1984).

Os princípios activos do *H. albus* parecem ser os mesmos dos do meimandro negro: hiosciamina, atropina e escopolamina. Estes compostos afectam o sistema nervoso (Font Quer, 1981).

Nos preparados de uso interno, o *H. albus* é administrado sob a forma de infusões, de extractos hidroalcoólicos e tinturas. Em todo o caso, só deve ser administrado sob controlo médico. Estes preparados possuem propriedades antiespasmódicas, calmantes, soníferas, analgésicas e hipnóticas, sendo, por isso, bastante eficazes no tratamento de tosse espasmódica, nevralgias, bronquite e insónia (Branchini e Corbetta, 1978).

Vários estudos têm sido efectuados com culturas de "hairy roots" de *H. niger* e *H. albus*, com calli e cultura de células em suspensão de *H. niger* para a obtenção de alcalóides de importância farmacêutica (Dhoot e Henshaw, 1977; Jaziri *et al.*, 1988; Sauerwein e Shimomura, 1991). Os estudos de Sauerwein e Shimomura (1991), com culturas de "hairy roots" de *H. albus* permitiram detectar cinco tropanoalcalóides: hiosciamina, escopolamina, litorina, 7 β -hidroxihiosciamina e 6 β -hidroxihiosciamina.

1.2. A ACUMULAÇÃO DE FITOALEXINAS NA FAMÍLIA SOLANACEAE

As fitoalexinas sesquiterpénicas das Solanaceae, embora todas derivadas do farnesilo pirofosfato, formam grupos diversos atendendo às diferentes formas do es-

queleto carbonado. Estes metabolitos têm um núcleo comum, o catião eudesmano (Fig. 1.1), que pode sofrer ou não rearranjos moleculares podendo, assim, ser divididos em cinco grandes grupos: 1) eudesmanos; 2) *nor*-eudesmanos; 3) *seco*-eudesmanos; 4) eremofilanos e 5) vetispiranos.

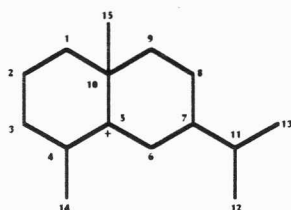


Fig. 1.1. Catião eudesmano.

Eudesmanos- Muitos dos compostos de stress, pertencentes a este grupo, são fitoalexinas e têm sido detectadas em *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, *Cap-sicum annuum*, *Nicotiana* spp. e *Datura stramonium*.

Devido aos diferentes rearranjos moleculares que sofrem durante a biossíntese, não é fácil reconhecer a sua relação biogenética, por simples observação das correspondentes estruturas moleculares (Stoessl, 1982). O germacreno A é, no entanto, e em qualquer dos casos, o precursor geral. Embora este composto não tenha sido encontrado nas Solanaceae, um seu derivado, o 2,3-dihidroxigermacreno A, tem sido descrito como composto de stress.

A aubergenona (Fig. 1.2), uma fitoalexina encontrada na beringela, e a 2-ceto- α -ciperona, encontrada no tabaco, são dois eudesmanos que não sofrem rearranjo, isto é, resultam directamente do 2,3-dihidroxigermacreno A.

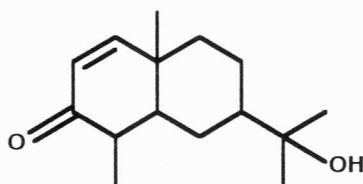


Fig. 1.2. Aubergenona.

Noreudesmanos- Os sesquiterpenos pertencentes a este grupo caracterizam-se pela ausência do grupo metilo nas posições C-5 ou C-10 do catião eudesmano. A rishiti-

na (Fig. 1.3) é a fitoalexina mais representativa do grupo dos *noreudesmanos* (Stoessl, 1982).

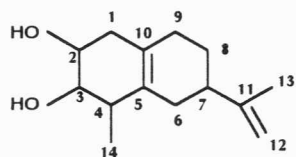


Fig. 1.3. Rishitina.

Secoeudesmanos- Os sesquiterpenos pertencentes a este grupo caracterizam-se pela ausência da ligação entre os carbonos C-1 e C-2 do catião eudesmano, além de um maior grau de oxidação. A fituberina (Fig. 1.4) e o fituberol são exemplos de fitoalexinas pertencentes a este grupo (Stoessl, 1982).

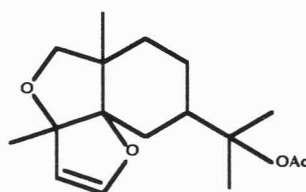


Fig. 1.4. Fituberina.

Eremofilanos- O rearranjo do esqueleto eudesmano em eremofilano compreende a migração, no catião eudesmano, do metilo alojado no carbono C-10 para o carbono C-5 (Stoessl, 1982). O capsidiol (Fig. 1.5), isolado do pimentão doce infectado, é o composto mais representativo do grupo dos eremofilanos.

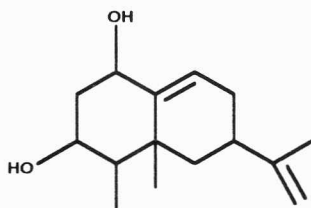


Fig. 1.5. Capsidiol.

Vetispiranos- Constituem um grupo de compostos que, provindo do catião eudesmano, se diferenciam por factores estereoquímicos e/ou estádios de oxidação diversos. A lubimina (Fig. 1.6), a hidroxilubimina, a isolubimina, as *epilubiminas* e a solavetivona são os vetispiranos mais frequentemente isolados de Solanaceae (Stoessl, 1982).

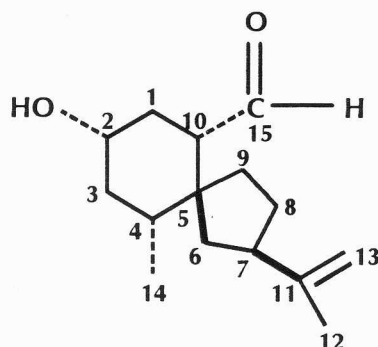


Fig. 1.6. Lubimina.

As fitoalexinas sesquiterpénicas, geralmente encontradas nas Solanaceae, são provenientes da via acetato-mevalonato. No entanto, têm sido também detectadas fitoalexinas derivados da via do acetato-malonato (Kuc, 1982). Compostos poliacetilénicos como, por exemplo, falcarindiol e, provavelmente, falcarinol têm sido considerados fitoalexinas. Estes compostos foram isolados do tomate e das folhas do tomateiro, inoculados com *Cladosporium fulvum* (Kuc, 1982).

Algumas espécies de Solanaceae acumulam, ainda, outros compostos que não as fitoalexinas. São exemplos, alguns compostos fenólicos dos quais os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e clorogénico são os mais frequentes. Embora alguns destes compostos tenham sido descritos como fitoalexinas, outros autores, porém, preferem considerá-los como compostos de stress, uma vez que a sua acumulação ocorre em sistemas envolvendo vários microrganismos não patogénicos (Kuc, 1982; Stoessl, 1982). Verificou-se que na batata, no pimento e no tabaco, a acumulação de compostos fenólicos e bem assim de compostos resultantes da sua oxidação era uma consequência da infecção destas plantas por um fungo, bactéria ou vírus (Kuc, 1982). Nalguns casos, a sua acumulação decorre de danos provocados nas células, sendo a sua presença um sinal de alarme para as células vegetais (Kuc, 1982). Segundo Ampomah e Friend (1988) em cultivares de batata resistentes a *Phytophthora infestans* ou a *Phoma exigua*, os compostos fenólicos acumulados nas paredes celulares das células hospedeiras desempenhavam papel mais importante na defesa das plantas do que as fitoalexinas. Neste caso, os compostos acumulados eram, fun-

damentalmente, polímeros de ácido clorogénico oxidado, ácidos *p*-cumárico e ferúlico esterificados, além da lenhina e suberina.

A suberina é uma mistura complexa de ácidos gordos de cadeia longa, ácidos gordos hidroxilados, ácidos dicarboxílicos e alcoois de cadeia longa, além de compostos fenólicos, dos quais o ácido ferúlico é o componente principal. A suberina deposita-se na face interna da parede celular, podendo funcionar como uma barreira à penetração de agentes microbianos. Os ácidos gordos da suberina podem ser libertados pela acção de esterases e funcionarem como fitoalexinas. Os peróxidos, os hidroperóxidos e os epóxidos, produzidos na sequência da infecção, pela acção de lipo-oxigenases, podem aumentar a toxicidade do meio aos agentes infecciosos (Kuc, 1982).

A α -solanina e α -chaconina são glicoalcalóides esteróides que, ocorrendo, fundamentalmente, na batata, a sua presença tem sido relacionada com mecanismos de resistência à doença. Estes compostos, derivados da via do acetato-mevalonato, ocorrem tanto em tecidos sãos, como em tecidos sujeitos a condições de stress, nomeadamente mecânico (Kuc, 1982). A acumulação de glicoalcalóides esteróides é suprimida pela infecção por diversos microrganismos, patogénicos ou não (Kuc, 1982). A administração de um elicitador, proveniente de *Phytophthora infestans*, a secções de tubérculo de batata levou à supressão da acumulação destes compostos e, simultaneamente, à acumulação de rishitina, lubimina, solavetivona e fituberina, fitoalexinas de natureza sesquiterpénica. Estas fitoalexinas têm sido alvo de atenção particular, por serem compostos que se acumulam na sequência de infecções, e, quase sempre, mais rapidamente e em maior extensão nas interacções hóspede-hospedeiro resistentes (Kuc, 1982).

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. MATERIAL VEGETAL

As cápsulas de *Hyoscyamus albus* foram colhidos na Quinta de Santo António, na Costa da Caparica, Costa Oeste de Portugal.

1.2. REAGENTES E SOLVENTES

À excepção do hipoclorito de cálcio, utilizado na desinfecção do material vegetal, todos os reagentes e solventes empregues no presente trabalho eram de qualidade analítica, ou purificados pelas técnicas habituais.

2. MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DE CALLI E DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.1.1. GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *HYOSCYAMUS ALBUS*

As cápsulas foram desinfectadas superficialmente com uma solução de hipoclorito de cálcio comercial a 10 % (p/v), durante 20 min, com agitação, tendo-se seguido uma lavagem cuidadosa com água destilada e esterilizada. As sementes foram então removidas, colocadas em água destilada e esterilizada, durante 3-4 h, e desinfectadas com uma solução de hipoclorito de cálcio comercial 10 % (p/v), durante 20 min. Seguiu-se uma lavagem com água destilada e esterilizada.

As sementes foram inoculadas em meio Schulz (1981) (Tabela 2.1, *vide* pág. 27) ou em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Tabela 2.2, *vide* pág. 28), solidificado com 0,8 g/l de agar. As sementes inoculadas foram mantidas às escuras, 24 ± 1 °C até à eclosão dos cotilédones, tendo em seguida sido transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h ($37 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - lâmpadas fluorescentes "day-light") a 24 ± 1 °C.

2.1.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE *CALLI*

Para a obtenção de *calli* utilizaram-se, como explantes primários, hipocótilos, obtidos de plantas germinadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em diversos meios de cultura base: 1) Murashige e Skoog (1962) (MS); 2) Schenk e Hildebrandt (1972) (SH) e 3) Gamborg *et al.* (1968) (B5), (Tabela 2.2, *vide* pág. 28). Em qualquer dos casos, os meios foram suplementados com 20 g/l de sacarose, 20 mg/l de ácido ascórbico (antioxidante) e nas regulações hormonais referidas na Tabela 2.3. O pH foi ajustado depois de se terem adicionado 0,8 g/l de agar.

As inoculações primárias e bem assim os *calli* foram mantidos em fotoperíodo de 16 h, a 24 ± 1 °C. Os *calli* foram subcultivados com intervalos de 30-40 dias.

Tabela 2.3. Meios base e combinações de reguladores de crescimento usados na indução de *calli* de *Hyoscyamus albus*

	2,4-D mg/ml	NAA mg/ml	BA mg/ml	Kin mg/ml
Meio MS	1,0	-	-	1,0
	1,0	-	1,0	-
	-	1,0	1,0	-
	0,5	-	-	1,0
Meio SH	1,0	-	-	1,0
	1,0	-	1,0	-
	-	1,0	1,0	-
Meio B5	1,0	-	-	1,0

2.1.3. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

As culturas de células em suspensão foram iniciadas por transferência de 2-3 *calli* friáveis, com 3-4 semanas de subcultura, mantidos em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin para erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura líquido MS, com a mesma suplementação. As culturas foram mantidas às escuras, a 24 ± 1 °C, sob agitação orbital (115 rpm).

As primeiras repicagens foram efectuadas, com intervalos de 8 dias, por decantação do meio de cultura e sua substituição por 50 ml de meio fresco. Após o estabelecimento das suspensões, as repicagens subsequentes foram efectuadas com intervalos de 12 dias, pelo método de pipetagem. A 50 ml de meio de cultura fresco, adicionaram-se 10 ml da suspensão de células devidamente homogeneizada.

As suspensões estabelecidas foram utilizadas em diversos ensaios. Sempre que, nesses ensaios foi necessário introduzir alterações à composição do meio de cultura, os correspondentes registos só foram efectuados após 3-4 repicagens nas novas con-

dições. Por outro lado, todos os ensaios decorreram às escuras, a 24 ± 1 °C, sob agitação orbital.

2.1.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS EM SUSPENSÃO

As culturas de células em suspensão foram caracterizadas, atendendo aos seguintes parâmetros: 1) crescimento celular, 2) dimensão das células, 3) viabilidade celular, 4) mobilização dos hidratos de carbono do meio de cultura, 5) mobilização do nitrato e de 6) amónio do meio de cultura. Nestes ensaios seguiu-se a metodologia descrita em 2.1.4.2., 2.1.4.3., 2.1.4.4., 2.1.4.5., 2.1.4.5.1., 2.1.4.6., 2.1.4.6.1. e 2.1.4.7., respectivamente (*vide* pág. 29-34).

2.1.5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.1.5.1. Densidade de inóculo

Nestes ensaios utilizaram-se duas densidades de inóculo: 2 g/50 ml e 2,5 g/50 ml (p. f.). A massa de inóculo, obtida após filtração asséptica sob vácuo, foi inoculada em erlenmeyers contendo 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

O crescimento celular foi seguido pelo método de dissimilação.

2.1.5.2. Concentração de sacarose

A influência da concentração de sacarose, no crescimento das células, foi testada, transferindo 2 g (p. f.) de células, obtidas por filtração asséptica, sob vácuo, para erlenmeyers contendo 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. As concentrações de sacarose ensaiadas foram: 1) 10 g/l; 2) 20g/l; 3) 30 g/l; 4) 40 g/l; 5) 50 g/l; 6) 60 g/l; 7) 80 g/l.

O crescimento celular foi seguido pelo método de dissimilação.

2.1.5.3. Regulação hormonal

Nos ensaios para estudar o efeito da regulação hormonal no crescimento celular, inocularam-se 2 g (p. f.) de células em 50 ml de meio líquido MS suplementado com 20 g/l de sacarose e uma das seguintes combinações hormonais: 1) 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin; 2) 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin.

Em ambos os ensaios, o crescimento celular foi seguido pelo método de dissimilação.

2.2. PRODUÇÃO DE METABOLITOS DE STRESS PELAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.2.1. ELICITAÇÃO E EXTRACÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS

Nos ensaios preliminares, utilizaram-se culturas de células em suspensão, com 8 dias de subcultura, mantidos em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. As culturas foram inoculadas com 2 ml de uma suspensão de micélio liofilizado e autoclavado de *Phytophthora cinnamomi* a 1,25 % (p/v), 2 ml de uma suspensão de células liofilizadas e autoclavadas de *Candida albicans* 5 % (p/v) ou com 2 ml de uma solução aquosa de celulase 0,025 % (p/v) esterilizado por filtração com filtro Millipore com poro de 0,2 µm de diâmetro.

Depois de incubadas durante 72 h, as células foram separadas do meio de cultura por filtração, e o meio (200 ml) extraído, por 3 vezes, com alíquotas de 50 ml de acetato de etilo. As fases orgânicas foram juntas e evaporadas à secura em evaporador rotativo a 37 °C. O resíduo foi retomado com diclorometano e utilizado nos ensaios subsequentes.

2.2.2. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS

2.2.2.1. Isolamento e identificação da lubimina e 10-epilubimina

2.2.2.1.1. Cromatografia em camada delgada semipreparativa

A amostra obtida em 2.2.1. foi aplicada, em risco contínuo, sobre uma placa de sílica gel 60 F₂₅₄, com suporte de vidro e com 1 mm de espessura de camada adsorvente. A placa foi eluída, por 3 vezes, com uma mistura de clorofórmio:metanol (19:1), em câmara de desenvolvimento ascendente com saturação. A mancha maioritária, correspondente à lubimina e 10-epilubimina, foi recuperada por raspagem da camada adsorvente e a sílica extraída, por 5 vezes, com alíquotas de 20 ml de metanol. Em cada extracção, a sílica foi separada do metanol por centrifugação a 6000 g, durante 10 min. As fracções obtidas, foram juntas e evaporadas à secura em evaporador rotativo a 37 °C. O resíduo foi retomado com diclorometano e utilizado nos ensaios subsequentes: GC, GC-MS, ¹H-NMR.

2.2.2.1.2. Cromatografia analítica em camada delgada

A amostra obtida em 2.2.2.1.1. foi aplicada pontualmente sobre três placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) com suporte de alumínio, 5 x 10 cm, com 0,25 mm de espessura de camada adsorvente. As placas foram eluídas, por 3 vezes, com uma mistura de clorofórmio:metanol (19:1 v/v) em câmara de desenvolvimento ascendente com saturação.

2.2.2.1.2.1. *Testes cromogénicos*

As placas, depois de secas sob uma corrente de ar quente, foram reveladas com:

1) *Dinitro-2,4-fenilhidrazina* (reagente para grupos carbonilo livres) - solução alcoólica de dinitro-2,4-fenilhidrazina a 0,1 % (p/v), acidificada com 1 ml de HCl fumante.

2) *Benzidina* (reagente para aldeídos terpénicos, flavonóides e hidratos de carbono) - Solução de 0,5 g de benzidina em 20 ml de ácido acético e 20 ml de etanol.

3) *Vanilina* (reagente para álcoois, aldeídos e cetonas terpénicas) - Solução de vanilina a 1 % (p/v) em H₃PO₄ a 50 % (v/v).

2.2.2.1.3. Redução da lubimina e 10-epilubimina

A cerca de 1 mg de amostra, obtida em 2.2.2.1.2. e dissolvida em 100 µl de éter dietílico, adicionaram-se 100 µl de uma solução aquosa de NaBH₄ 1 M. A mistura foi agitada, vigorosamente, durante 15 min, à temperatura ambiente. A fase etérea foi recolhida e o solvente evaporado à secura, sob uma ligeira corrente de azoto. O resíduo foi retomado com 10 µl de acetato de etilo e analisado por GC e GC-MS.

2.2.2.1.4. Derivatização das amostras

Acetilação

Cerca de 100 µg das amostras obtidas em 2.2.2.1.1. e 2.2.2.1.3. foram dissolvidos em 60 µl de uma mistura de piridina:anidrido acético (1:1). A mistura foi deixada a reagir, durante 1 h, a 80 °C. Depois de arrefecida, à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob uma ligeira corrente de azoto. O resíduo foi retomado com 10 µl de diclorometano e analisado por GC-MS.

Trimetilsililação

Num frasco de derivatização de paredes espessas, adicionaram-se 20 μ l de BSTFA a cerca de 100 μ g da amostra obtida em 2.2.2.1.1. e dissolvidos em 10 μ l de piridina. A mistura foi deixada a reagir, durante 30 min, a 80 °C. Depois de arrefecida à temperatura ambiente, a mistura foi usada directamente em ensaios de GC-MS.

2.2.2.1.5. Determinação dos índices de retenção linear

Os índices de retenção linear da amostra obtida em 2.2.2.1.1. foram determinados em relação a uma mistura de *n*-alcanos de C-10 a C-26, segundo a fórmula:
 $I = 100 [n (tr (A) - tr (X) / tr (Y) - tr (X)) + X]$; tr (A) = tempo de retenção do composto A; tr (X) = tempo de retenção do hidrocarboneto com X átomos de carbono; tr (Y) = tempo de retenção do hidrocarboneto com Y átomos de carbono; $n = Y-X$).

2.2.2.1.6. Condições de análise

2.2.2.1.6.1. Cromatografia gás-líquido de alta resolução

Os índices de retenção linear da amostra obtida em 2.2.2.1.1. foram determinados num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois detectores de ionização de chama, um sistema de tratamento de dados e um injector, no qual se instalaram duas colunas de polaridade diferente: uma coluna de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, DB-1 (30 m x 0,25 mm d. i., espessura de filme 0,25 μ m; J & W Scientific Inc.) e uma coluna de sílica fundida de fase imobilizada de polietilenoglicol DB-Wax (30 m x 0,25 mm d. i., espessura de filme 0,25 μ m; J & W Scientific Inc.).

Condições de operação

- A temperatura do forno foi mantida isotérmica, durante 5 min, a 170 °C, e depois programada de 170 °C a 220 °C, com incrementos de 2 °C.
- Temperaturas do injector e dos detectores, 220 e 240 °C, respectivamente.
- Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s.
- Relação de repartição de fluxo, 1:50.

2.2.2.1.6.2. Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa

As amostras obtidas em 2.2.2.1.1. e 2.2.2.1.3., bem como os respectivos derivados foram analisados por cromatografia gás-líquido / espectrometria de massa (GC-MS). Nestes ensaios, utilizou-se um cromatógrafo Carlo Erba 6000 Vega equipado com uma coluna de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, DB-1, (30 m x 0,25 mm d. i. x 0,25 μ m espessura de filme; J & W Scientific Inc.) acoplada a um detector de captura iônica Finnigan MAT 800 (Ion Trap Detector).

Condições de operação

- A temperatura do forno foi mantida isotérmica, durante 5 min, a 170 °C, e depois programada de 170 a 220 °C, com incrementos de 2 °C;
- Temperatura do injetor, 220 °C;
- Temperatura da linha de transferência, 280 °C;
- Temperatura da fonte de ionização, 220 °C;
- Gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s;
- Energia de ionização, 70 eV;
- Corrente de ionização, 60 μ A;
- Tempo de varrimento, 1 seg;
- Relação da repartição de fluxo, 1:40.

2.2.2.1.6.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton ($^1\text{H-NMR}$)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos num espectrómetro Bruker WM-300, equipado com um sistema de análise de dados Aspect 2000, a operar a 300 MHz. As amostras foram dissolvidas em Clorofórmio Deuterado, contendo 1 % de tetrametilsilano (TMS), como padrão interno.

2.2.2.2. Isolamento e identificação da solavetivona e rishitina

A solavetivona e a rishitina foram isoladas como descrito em 2.2.2.4. a partir de culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com 4 dias de subcultura e 96 h de incubação com 2 ml de uma suspensão de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, e identificadas por GC e GC-MS. No caso da solavetivona, a identificação foi também feita com base nos espectros de UV e $^1\text{H-NMR}$.

2.2.2.2.1. Obtenção de padrões de rishitina e solavetivona

2.2.2.2.1.1. *Obtenção de rishitina*

Secções de batatas infectadas (cerca de 250 g), adquiridas no mercado, foram postas a macerar em 250 ml de metanol durante 1 h em banho de ultra-sons. O processo foi repetido, por duas vezes, as fracções juntas e o metanol evaporado em evaporador rotativo a 37 °C. Ao resíduo, adicionaram-se 50 ml de água e procedeu-se a uma extracção, líquido-líquido, com alíquotas de 20 ml de acetato de etilo. As fracções orgânicas foram juntas, evaporadas à secura em evaporador rotativo a 37 °C, e o resíduo foi retomado com acetato de etilo e utilizado nos ensaios subsequentes.

2.2.2.2.1.2. *Obtenção de solavetivona*

A solavetivona foi isolada a partir de secções de batatas infectadas (cerca de 250 g), adquiridas no mercado, por destilação-extracção, durante 3 h, num aparelho do tipo Likens-Nickerson, utilizando o éter dietílico como solvente. O extracto foi concentrado à temperatura ambiente, em evaporador rotativo, até ao volume de cerca de 1 ml e lavado com 2 ml de NaOH 2 M. O solvente foi evaporado sob uma ligeira corrente de azoto e amostra utilizada nos ensaios subsequentes.

2.2.2.2.2. Redução da solavetivona

Num frasco de derivatização, de paredes espessas, dissolveram-se cerca de 100 µg de amostra em 20 µl de éter dietílico e adicionaram-se 100 µl de uma solução aquosa de NaBH₄ 1 M. A mistura foi deixada num banho de ultra-sons, durante 5 min, findos os quais se adicionaram mais 500 µl de uma solução aquosa de NaBH₄ 1 M. A mistura foi, então, deixada a reagir, durante 2 h, em banho de água a 40 °C. Findo este período, adicionou-se 1 ml de éter dietílico, agitou-se vigorosamente, durante 5 min, e separaram-se as fases por centrifugação a 10000 g, durante 5 min. A fase etérea foi recuperada, o solvente evaporado à secura sob ligeira corrente de azoto, e o resíduo utilizado nos ensaios subsequentes.

2.2.2.2.3. Derivatização das amostras

Os derivados acetilados da solavetivona e bem assim da solavetivona reduzida foram preparados como descrito em 2.2.2.1.4..

2.2.2.2.4. Condições de análise

2.2.2.2.4.1. *Espectrofotometria de ultravioleta*

O espectro de absorção de ultravioleta foi traçado em metanol num espectrofotómetro Shimadzu UV-visível 160A, entre os 200 e 400 nm.

2.2.2.3. **Isolamento e identificação das acetofenonas**

As acetofenonas foram isoladas como descrito em 2.2.2.4. a partir de culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com 14 dias de subcultura e 48 h de incubação com 2 ml de uma suspensão de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, e identificadas por GC e GC-MS.

2.2.2.3.1. Derivatização das amostras

Acetilação

As amostras foram acetiladas como descrito em 2.2.2.1.4..

Trimetilsililação

Num frasco de derivatização, de paredes espessas, adicionaram-se 5 μ l de piridina e 10 μ l de BSTFA a cerca de 50 μ g de amostra. A mistura foi deixada a reagir a 110 °C, durante 10-15 min. Depois de arrefecida à temperatura ambiente, a mistura foi analisada por GC-MS. Alternativamente, a amostra foi dissolvida em 10 μ l de uma mistura de THF, HMDS e TMCS (5:5:1), e a mistura deixada a reagir, durante 40 min, à temperatura ambiente. Findo este período, a mistura foi utilizada directamente, em ensaios de GC e GC-MS.

2.2.2.4. **Extracção e quantificação dos metabolitos de stress**

Nos ensaios de rotina, utilizaram-se suspensões de dois erlenmeyers, mantidos em meio MS suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. As suspensões foram sonicados a 20 KHz, durante 3 min, e o meio separado das células por centrifugação a 10000 g, durante 10 min. O volume do meio de cultura foi ajustado para 100 ml com água destilada ultra pura e retiraram-se 20 ml, que se fizeram passar por um cartucho Sep-Pak C18-Waters Millipore. Depois de lavado com 10 ml de água destilada, o cartucho foi eluído, por 2 vezes, com alíquotas de

10 ml de metanol. O solvente foi evaporado à securo, em evaporador rotativo, a 37 °C, o resíduo retomado com diclorometano para um frasco de derivatização e o solvente evaporado sob uma ligeira corrente de azoto. Ao extracto adicionaram-se 30 µl de palmitato de metilo em diclorometano a 0,56 % (p/v) e procedeu-se à análise por GC.

Cada ensaio foi efectuado em duplicado e os valores apresentados correspondem à média de, pelo menos, 3 injeções de cada amostra.

2.2.2.4.1. Síntese do palmitato de metilo (padrão)

O palmitato de metilo foi preparado por adição, em excesso, de uma solução etérea de diazometano a ácido palmítico.

2.2.2.4.2. Cálculo do factor de resposta relativo da lubimina

Num frasco de derivatização, dissolveram-se 0,94 mg de lubimina e 1,2 mg de palmitato de metilo em 50 µl de diclorometano. O factor de resposta $K=1,92$ corresponde ao valor médio de, pelo menos, 5 injeções.

Este valor, calculado para a lubimina, foi também utilizado para a determinação da concentração da 10-*epi*lubimina, da rishitina, da solavetivona e das acetofenonas.

2.2.2.4.3. Condições de análise

As análises cromatográficas foram efectuadas num cromatógrafo Perkin Elmer 8600, equipado com um detector de ionização de chama, um sistema de tratamento de dados e uma coluna de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, DB-1 (30 m x 0,25 mm d. i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.)

Condições de operação

- A temperatura do forno foi mantida isotérmica, durante 5 min, a 170 °C, e depois programada de 170 a 220 °C, com incrementos de 2 °C.
- Temperaturas do injecto e detector, 220 e 240 °C, respectivamente.
- Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s.
- Relação de repartição de fluxo, 1:50.

2.2.2.5. Estudo de diversos factores na acumulação dos metabolitos de stress

2.2.2.5.1. Estádio do crescimento celular e tempo de incubação

As culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin e com 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 14 dias de subcultura foram inoculadas com 2 ml de uma suspensão de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans* 5 % (p/v), e incubadas durante 6, 12, 24, 48, 96 e 192 horas.

2.2.2.5.2. Influência da concentração do elicitador

As concentrações de elicitador (suspensão de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*) ensaiadas nas culturas mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com 2 dias de subcultura, foram: 1) 0,2 mg/l; 2) 0,3 mg/l; 3) 0,4 mg/l; 4) 0,5 mg/l; 5) 1 mg/l; 6) 1,5 mg/l; 7) 2 mg/l; 8) 3 mg/l; 9) 4 mg/l e 10) 6 mg/l. Em qualquer dos ensaios, as culturas foram incubadas durante 48 h.

2.2.2.5.3. Adição de acetato de sódio e farnesol ao meio de cultura

Dois gramas (p. f.) de células foram inoculadas em 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l Kin e 100 mg/l de acetato de sódio. Ao fim de 48 h, as culturas foram inoculadas com 2 ml de uma suspensão de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans* a 5 % (p/v) e incubadas durante 48 h.

Dois gramas (p. f.) de células foram inoculadas em 50 ml de meio líquido MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l Kin e 25 μ l de farnesol. No segundo dia de subcultura, as culturas foram inoculadas com 2 ml de uma suspensão de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans* a 5 % (p/v) e incubadas durante 48 h. Em alternativa, o farnesol só foi adicionado às culturas aquando da inoculação do elicitador.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS *IN VITRO*

1.1. OBTENÇÃO DE CALLI

1.1.1. GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Tal como em *O. natrix*, os meios de Schulz (1981) e MS, sem fitohormonas, revelaram-se igualmente eficientes na germinação das sementes de *H. albus*, tendo-se atingido taxas de germinação da ordem de 70-80 %.

1.1.2. SELECÇÃO DO MEIO DE CULTURA E REGULAÇÃO HORMONAL

O meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 1 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin foi o mais favorável à obtenção de *calli*. Nos restantes meios e regulações hormonais ensaiados, os explantes rapidamente acastanhavam e morriam. Esporadicamente, formavam-se *calli*, sem haver, no entanto, reprodutibilidade de resultados.

1.2. OBTENÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

As culturas de células em suspensão mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin apresentavam-se homogéneas, de cor branca, tornando-se cinzentas na fase estacionária. Ao microscópio, observavam-se células isoladas, ou formando pequenos agregados, sendo as células, geralmente, isodiamétricas, com diâmetro médio de $13,4 \pm 1,29 \mu\text{m}$. As culturas possuíam viabilidade elevada, da ordem de 80 %.

A forma alongada ou arredondada das células, para além de depender do estágio de desenvolvimento das células e da composição do meio (Yeoman e Street, 1977; Sakuta e Komamine, 1987; Fevereiro, 1991), depende, também, da espécie em estudo. Com efeito, nas culturas de *Ononis natrix*, estabelecidas ao mesmo tempo que as de *H. albus*, as células apresentavam formas algo diversas, em fase pré-estacionária de crescimento.

1.2.1. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NO CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

1.2.1.1. Influência da regulação hormonal

No estabelecimento das culturas de *H. albus*, em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, utilizaram-se culturas mantidas no mesmo meio base, mas suplementadas com 0,5 mg/l NAA e 1 mg/l Kin. As culturas mantidas nas novas condições começaram a acinzentar, ao fim da segunda repicagem. Ao fim da terceira-quarta repicagem, com as células completamente necrosadas, não foi possível efectuar o estudo do crescimento celular. Estes resultados estão em concordância com os de outros autores que utilizaram, em culturas de *H. niger* e *H. albus*, o 2,4-D como auxina (Dhoot e Henshaw, 1977; Raghavan e Nagmani, 1983; Cheng e Raghavan, 1985; Jaziri *et al.*, 1988; Raghavan e Nagmani, 1989; Sauerwein e Shimomura, 1991). Dado não ter sido possível estabelecer as culturas de *H. albus* em meio contendo NAA/Kin, os ensaios subsequentes foram efectuados com 2,4-D/Kin.

1.2.1.2. Influência da densidade do inóculo

Nestes ensaios inocularam-se 2 g ou 2,5 g (p. f.) de células em 50 ml de meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

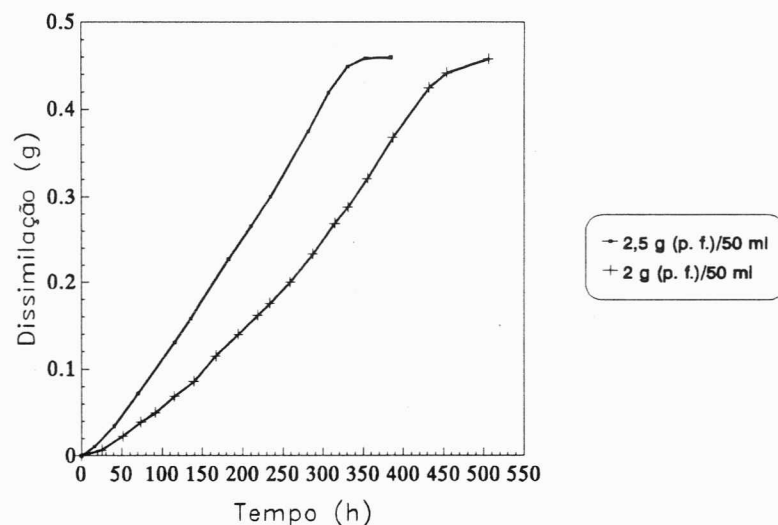


Fig. 1.1. Curvas de dissimilação de culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com diversas concentrações iniciais de inóculo.

As culturas iniciadas com 2 g de células apresentaram um crescimento mais lento, com valores de dissimilação sempre inferiores ao das culturas iniciadas com 2,5 g. Nestas culturas, a fase estacionária foi atingida ao fim de 290-300 h, cerca de 110-130 h mais cedo do que no primeiro caso (Fig. 1.1). Os valores máximos de dissimilação, 0,41-0,42 g, das culturas iniciadas com 2 g, foram atingidos às 500 h, ao passo que nas culturas iniciadas com 2,5 g estes valores foram atingidos, logo ao fim de 300-310 h (Fig. 1.1). Destes resultados, e comparando com os obtidos nas culturas de *O. natrix*, pode concluir-se que a concentração inicial de inóculo é determinante para o crescimento celular e variável, dependendo da espécie em estudo.

1.2.1.3. Influência da concentração de sacarose no crescimento celular

Neste estudo, ensaiaram-se seis concentrações de sacarose (10, 20, 30, 40, 50 e 80 g/l) utilizando meio MS, suplementado com 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. De um modo geral, quanto maior a concentração de sacarose utilizada, maiores os valores de dissimilação obtidos, no início da fase estacionária de crescimento. Exceptuaram-se as culturas mantidas com 30 e 40 g/l de sacarose, que apresentaram por esta altura, praticamente os mesmos valores (Fig. 1.2). Os valores de dissimilação obtidos, variaram entre um mínimo de 0,15 g, para as culturas mantidas com 10 g/l de sacarose, e um máximo de 0,95 g, para as culturas mantidas com 80 g/l de sacarose (Fig. 1.2). Além disso, quanto maior a concentração de sacarose, mais tarde se atingia a fase estacionária. Também neste caso, se exceptuaram as culturas mantidas com 30 ou 40 g/l de sacarose (Fig. 1.2).

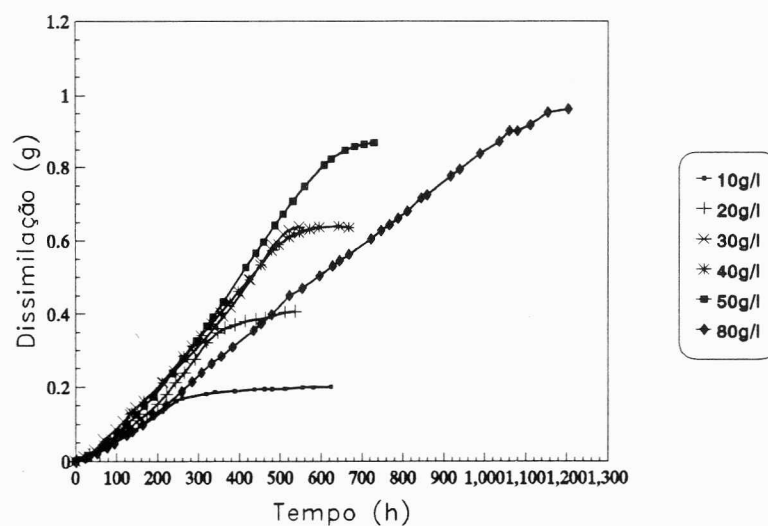


Fig. 1.2. Curvas de dissimilação das culturas de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com diversas concentrações de sacarose e 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

Embora qualquer das concentrações ensaiadas tenha permitido a manutenção e o crescimento celulares, concentrações muito baixas (10 g/l) ou muito elevadas (80 g/l) induziram menor crescimento, com tempos de duplicação de 62 h e 60 h, respectivamente. Estes valores são significativamente superiores aos das culturas mantidas com 40 g/l de sacarose, onde se obtiveram tempos de duplicação de 48 h. Para a maioria das culturas de células em suspensão, o aumento da concentração de sacarose é determinante de um menor crescimento e de uma maior produção de fenóis (Westcott e Henshaw, 1976; Phillips e Henshaw, 1977). Porém, nas culturas de *H. albus*, este facto não foi muito significativo havendo mesmo autores (Sauerwein e Shimomura, 1991) que referem, que o melhor crescimento das culturas de "hairy roots" de *H. albus*, é registado em meio contendo 80 g/l de sacarose.

1.2.2. MOBILIZAÇÃO DE ALGUNS NUTRIENTES DO MEIO DE CULTURA

1.2.2.1. Mobilização dos açúcares

À semelhança do referido em 1.3.1. também aqui a sacarose sofreu hidrólise com a autoclavagem. Aquando da inoculação, existiam apenas 16-17 g/l de sacarose e 1,8-2 g/l de glucose e frutose (Fig. 1.3).

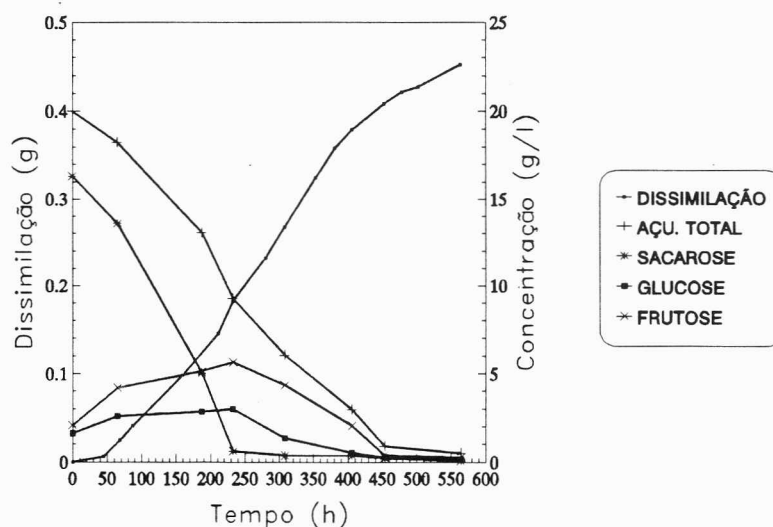


Fig. 1.3. Mobilização dos açúcares do meio nas culturas de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

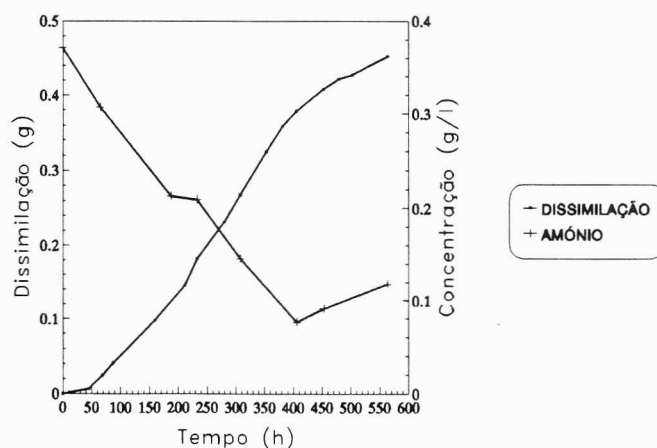
Após a inoculação e durante as primeiras 250 h, registou-se um ligeiro aumento de glucose e frutose no meio de cultura (Fig. 1.3), pese embora o teor em açúcares

totais tenha diminuído, o que sugere uma actividade das invertases superior ao consumo dos monossacáridos. Resultados idênticos foram obtidos em culturas de células em suspensão de *Achillea millefolium* (Figueiredo, 1992). As culturas de *H. albus* parecem revelar alguma preferência para glucose, se se atender ao perfil das curvas de mobilização da glucose e da frutose (Fig. 1.3). Neste caso, a mobilização da frutose foi mais acentuada quando, por volta das 300 h, a concentração da glucose atingia valores da ordem de 1-2 g/l (Fig. 1.3). O atingir da fase estacionária foi coincidente com a exaustão dos açúcares do meio de cultura (Fig. 1.3).

1.2.2.2. Mobilização do amónio e nitrato do meio

A mobilização do amónio do meio de cultura das células em suspensão de *H. albus*, foi significativa, desde a inoculação até ao início da fase estacionária (Fig. 1.4a). Em contraste, o consumo do nitrato foi moderado até à fase estacionária (Fig. 1.4b). A partir desta altura, que coincidiu com os níveis mais baixos de amónio no meio, a sua mobilização foi intensa (Fig. 1.4b). Resultados idênticos foram descritos por Fowler *et al.* (1982). Segundo estes autores, quando o amónio e o nitrato são fornecidos simultaneamente, o amónio é consumido em primeiro lugar, sendo o nitrato mobilizado quando parte do amónio foi já consumido. Nas culturas de *H. albus* parece haver uma certa inibição da mobilização do nitrato pelo amónio, pois só começa a ser mobilizado quando o amónio deixa de ser assimilado pelas células. Estes resultados contrastam com os obtidos com as culturas de células em suspensão de *O. natrix*.

O ligeiro aumento dos teores de amónio e nitrato no meio de cultura ao fim de 400-450 h pode dever-se à libertação dos conteúdos celulares, por morte das células.



a

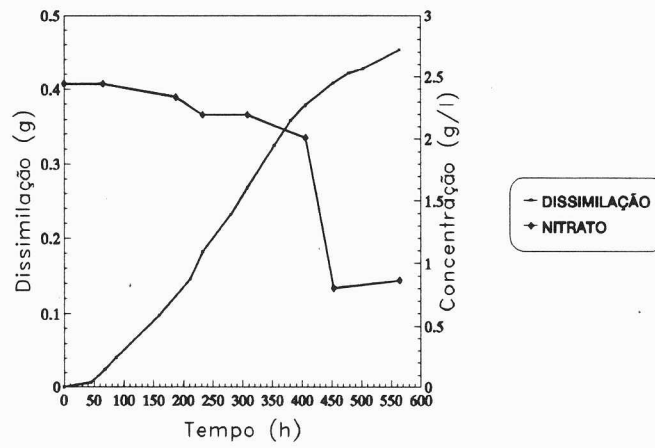
**b**

Fig. 1.4. Mobilização do amônio (a) e nitrato (b) do meio, nas culturas de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin.

2.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE METABOLITOS DE STRESS NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

2.1.1. IDENTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS

A análise por cromatografia gás-líquido de alta resolução do extracto obtido de cultura de células em suspensão de *H. albus*, elicitadas com *Phytophthora cinnamomi* ou *Candida albicans*, revelou a presença de diversos compostos de stress ausentes das culturas não elicitadas (Fig. 2.1).

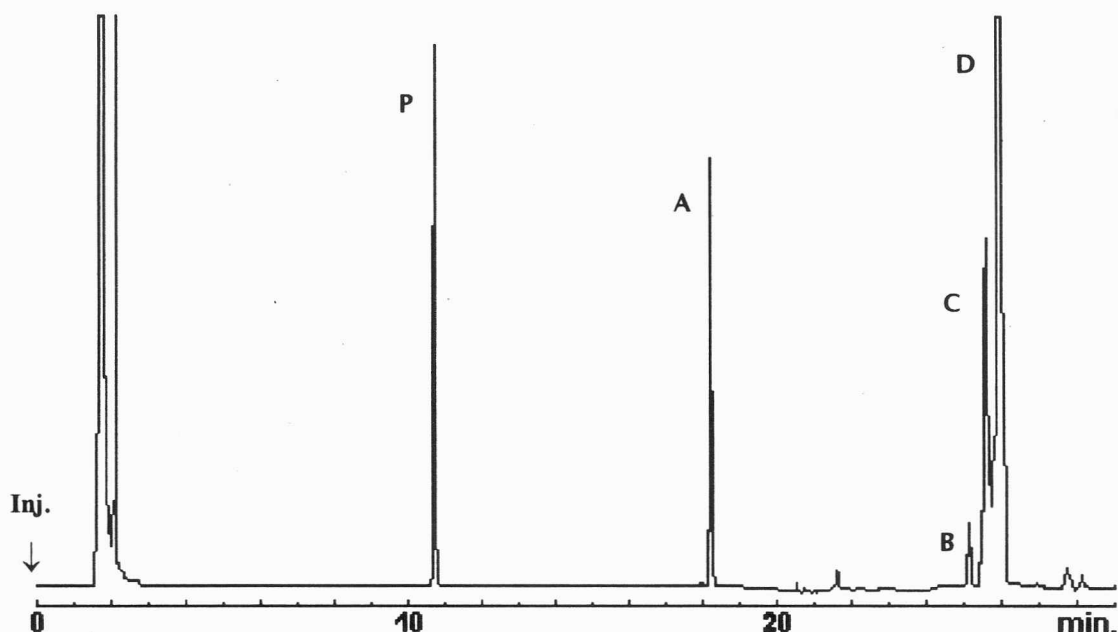


Fig. 2.1. Cromatograma, obtido em cromatografia gás-líquido, numa coluna DB-Wax, de alguns metabolitos de stress, após elicitação, das culturas de células em suspensão de *H. albus*, mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com quatro dias, com *C. albicans*, e incubadas durante 96 h. A-solavetivona; B-rishitina; C-10-*epilubimina*; D-lubimina; P-padrão (palmitato de metilo). Inj.-injecção. Atenuação 8.

No espectro de massa de impacto electrónico do composto A (índice de retenção linear IR=1775, em coluna DB-1), da Fig. 2.1, observa-se o ião molecular, pouco intenso, a m/z 218 $[M]^+$ (Fig. 2.2), compatível com a fórmula empírica $C_{15}H_{22}O$, constituindo o primeiro elemento da série formada pelos iões m/z 190 $[M-28]^+$, 175 $[M-43]^+$ e 147 $[190-43]^+$. O fragmento m/z 190 indica a presença de uma cetona alicíclica (McLafferty, 1980), já sugerida pelos reagentes cromogénicos dinitro-2,4-fenilhidrazina e benzidina, e os fragmentos m/z 175 e 147 suportam a presença de um grupo isopropenilo na molécula (Esquema 2.1). Observa-se, ainda, a série constituída pelos iões m/z 79, 91, 93, 105, 107, 119, 121, 133 e 135 comum aos terpenos (Kalan e Osman, 1976; Enzell e Wahlberg, 1980), sendo os fragmentos m/z 79,

93, 107 e 121 iões de rearranjo, da série C_nH_{2n-5} , característica dos terpenos alicíclicos (McLafferty, 1980).

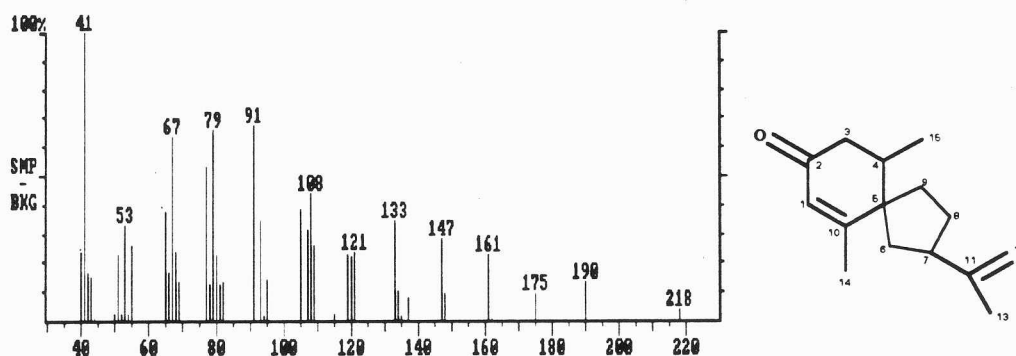
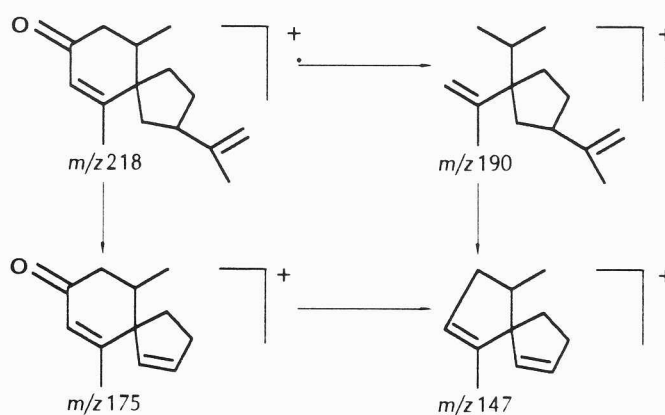


Fig. 2.2. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, do composto A, obtido das culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, elicítadas, ao fim de quatro dias, com *C. albicans* e incubadas durante 96 h.



Esquema 2.1. Esquema da fragmentação provável da solavetivona.

Por redução do composto A com tetra-hidretoborato de sódio obtiveram-se dois compostos com tempos de retenção e padrões de fragmentação diversos. Ao primeiro composto correspondeu o padrão de fragmentação representado na Fig. 2.3.

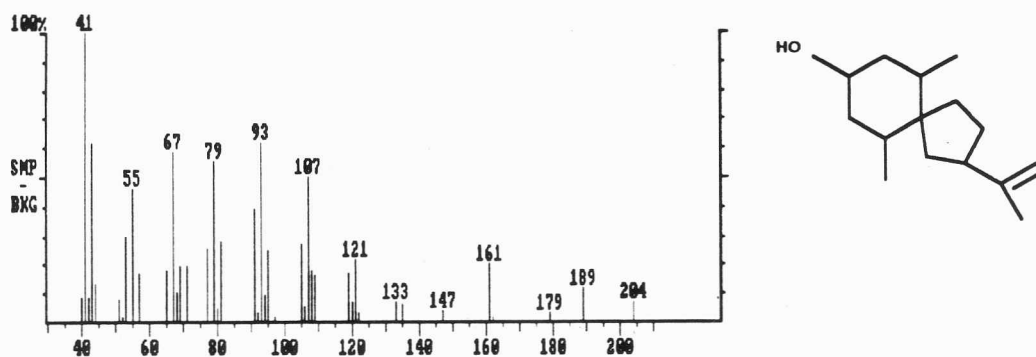


Fig. 2.3. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, de um dos dois compostos (composto minoritário) obtido após redução do composto A com tetra-hidretoborato de sódio.

O espectro de massa de impacto electrónico deste composto não apresentou ião molecular, sendo o primeiro sinal a m/z 204, pouco intenso. O fragmento m/z 204 [M-18]⁺ corresponderia, então, à perda de uma molécula de água a partir do ião molecular, característico dos álcoois. No espectro de massa de impacto electrónico do composto maioritário, o ião de massa mais elevada (Fig. 2.4) surge a m/z 205 [M-15]⁺, compatível com a perda de um grupo metilo pelo ião molecular. Observa-se, ainda, o ião m/z 145 [205-18-43]⁺ além da série dos iões característicos dos terpenos.

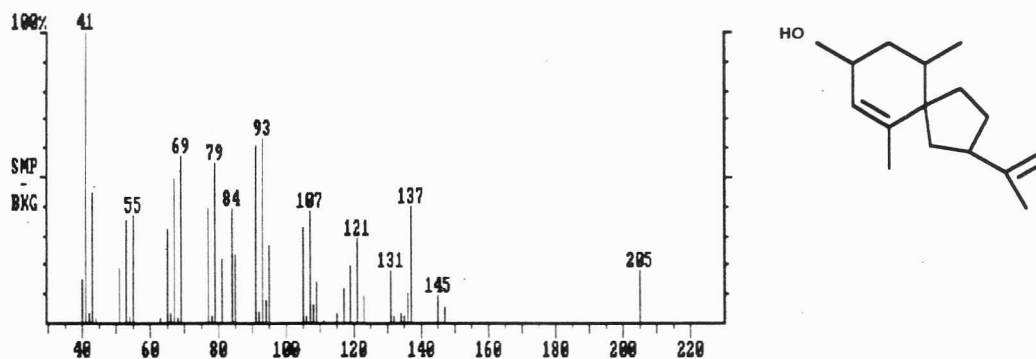
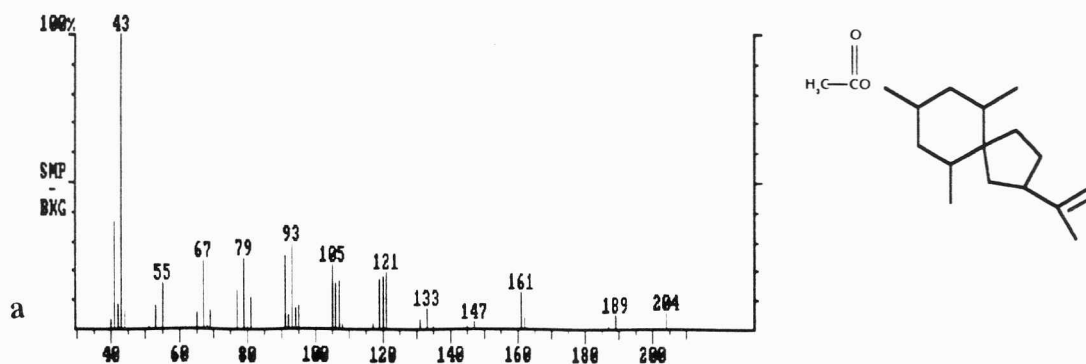


Fig. 2.4. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, do composto maioritário, obtido por redução do composto A com tetra-hidretoborato de sódio.



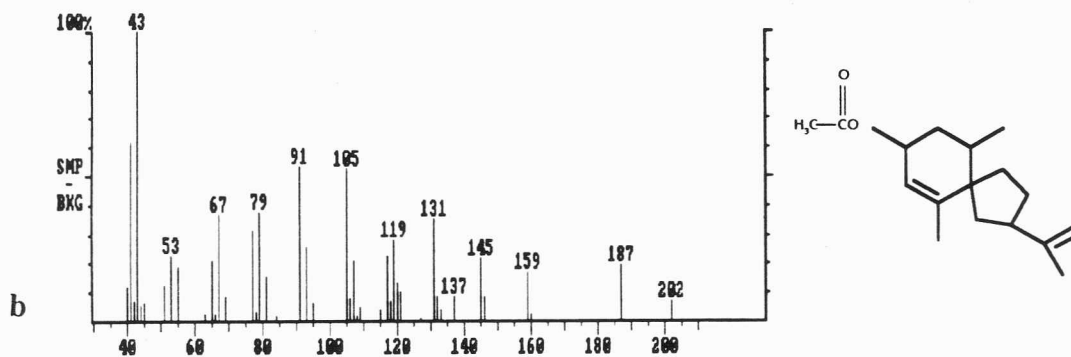


Fig. 2.5. Espectros de massa de impacto electrónico, de 70 eV, dos derivados acetilados do composto minoritário (a) e do composto maioritário (b).

O ião m/z 202 $[M-60]^+$, observado no espectro de massa do correspondente derivado acetilado (Fig. 2.5a) constitui a prova inequívoca da presença de um grupo hidroxilo livre na molécula. Informação complementar sobre a estrutura do composto A foi obtida pela análise do espectro de massa do composto minoritário. Neste espectro, o ião de massa mais elevado surge a m/z 204 $[M-18]^+$ (Fig. 2.3), seguindo-se os iões característicos dos terpenos. Além disso, no espectro do correspondente derivado acetilado (Fig. 2.5b), o fragmento de massa mais elevado surge também a m/z 204 $[M-60]^+$, que se justifica pela eliminação de ácido acético por parte do ião molecular. Estes resultados explicam-se através de uma redução simultânea, quer do carbonilo, quer de uma ligação dupla carbono-carbono. Por outro lado, tal redução, com hidretos metálicos, só é possível se na molécula existir um grupo carbonilo α,β -insaturado (Brown e Hess, 1969). A presença deste sistema conjugado é, de facto, comprovada pela absorção máxima a $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 242,6 nm, observada no espectro de UV do composto A, e pelos sinais registados no espectro de ressonância magnética nuclear de protão (CDCl_3 ; ppm) a 1,89 (3H, s) e 5,72 (1H, s def.), atribuíveis a um grupo metilalílico, de uma cadeia fechada e a um protão vinílico ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$), de uma ligação dupla trissubstituída, respectivamente. No espectro de $^1\text{H-NMR}$ observam-se, ainda, entre outros (Tabela 2.1), sinais a 1,74 (3H, s def.), atribuível a três protões alílicos ($\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$), 4,71 (2H, s def.), atribuível a dois protões olefínicos terminais ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$), ambos característicos de um grupo isopropenilo, e a 0,96 (3H, d, $J=6$ Hz). Os dados obtidos levam a identificar o composto A como sendo a solavetivona (Coxon *et al.*, 1974; Stoessl *et al.*, 1976).

Tabela 2.1. Dados do espectro de ressonância magnética nuclear de próton da solavetivona. δ -desvio químico; J -constante de acoplamento; d-dublete; m-multiplete; s-singlete; s def.-singlete deformado

atribuição	δ (ppm)	J (Hz)	multiplicidade
15	0,96	6	d
4, 6, 8, 9	1,62	-	m
13	1,74	-	s def.
14	1,89	-	s
7	2,22	-	m
3a e 3e	2,67	-	m
12	4,71	-	s def.
1	5,72	-	s def.

O composto B da Fig. 2.1, com índice de retenção linear IR=1789, em coluna DB-1, apresentou um padrão de fragmentação compatível com o de um terpeno (Fig. 2.6) e muito semelhante ao descrito para a rishitina (Brindle *et al.*, 1985). A identidade deste composto foi comprovada por comparação do tempo de retenção e do espectro de massa com os correspondentes de uma amostra autêntica de rishitina.

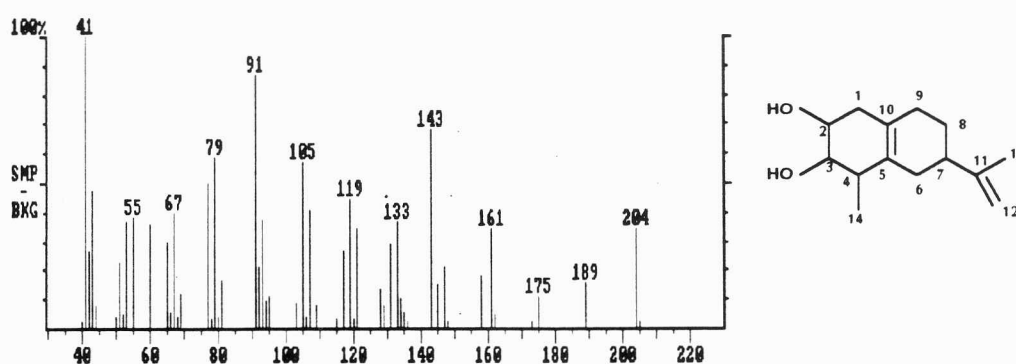
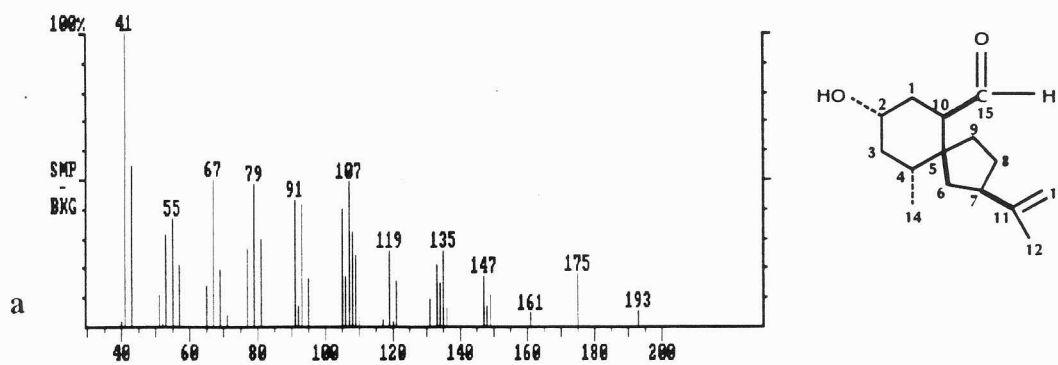


Fig. 2.6. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, do composto B, obtido das culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, elicitadas, ao fim de quatro dias, com *C. albicans* e incubadas durante 96 h.

No espectro de massa de impacto electrónico do composto C, (IR=1859 em coluna DB-1) da Fig. 2.1, o ião de massa mais elevado foi observado a m/z 193 [M-43]⁺ (Fig. 2.7a), constituindo o primeiro elemento da série formada pelos iões m/z 175 [M-43-18]⁺, 161, 133, 119, 105, 91. Após acetilação, observou-se alteração do tempo de retenção e o aparecimento de um fragmento de massa m/z 218 [M-60]⁺, no correspondente espectro de massa, o que confirma a presença de um grupo hidroxilo livre na molécula (Fig. 2.7b). A presença deste grupo hidroxilo foi ainda

confirmada por análise do espectro do correspondente derivado trimetilsililado. Neste caso, o ião de massa mais elevado é observado a m/z 293 $[M-15]^+$, correspondendo à eliminação de um grupo metilo, pelo ião molecular, fragmentação característica dos derivados sililados (Fig. 2.7c). No espectro de massa de impacto electrónico do composto C, reduzido com tetra-hidretoborato de sódio (Fig. 2.8a), observa-se um fragmento de massa m/z 195 $[M-43]^+$, seguido dos iões m/z 187 $[M-18-18-15]^+$, 177 $[M-18-43]^+$ e 159 $[M-18-18-43]^+$, que confirma a presença de um grupo carbonilo, já sugerido pelo desenvolvimento de uma reacção corada com dinitro-2,4-fenilhidrazina e benzidina. A presença de dois grupos hidroxilo livres na molécula do produto reduzido é, por seu turno, confirmada pelos iões m/z 262 $[M-60]^+$ e 202 $[M-60-60]^+$, observados no espectro de massa do correspondente derivado acetilado (Fig. 2.8b).

No espectro de ressonância magnética nuclear de protão ($CDCl_3$; ppm) do composto C (Tabela 2.2) observa-se um sinal a 9,86 (s def.) cuja frequência de ressonância é compatível com a de um protão formilo. Os sinais observados a 1,70 (s def) e 4,69 (m), atribuíveis a três protões alílicos e dois protões vinílicos terminais, respectivamente, sugerem a presença de um grupo isopropenilo. Observam-se, ainda, sinais a 3,74 (m) e 2,48 (m) atribuíveis à ressonância dos protões $\underline{HC-OH}$ e $\underline{HC-C=O}$, respectivamente. Os dados espectroscópicos obtidos permitem identificar o composto C como sendo a 10-epilubimina (Katsui *et al.*, 1974; Kalan e Osman, 1976; Katsui *et al.*, 1977; Stoessl *et al.*, 1976, 1978; Stoessl e Stothers, 1980; Brindle *et al.*, 1985; Ewing *et al.*, 1990).



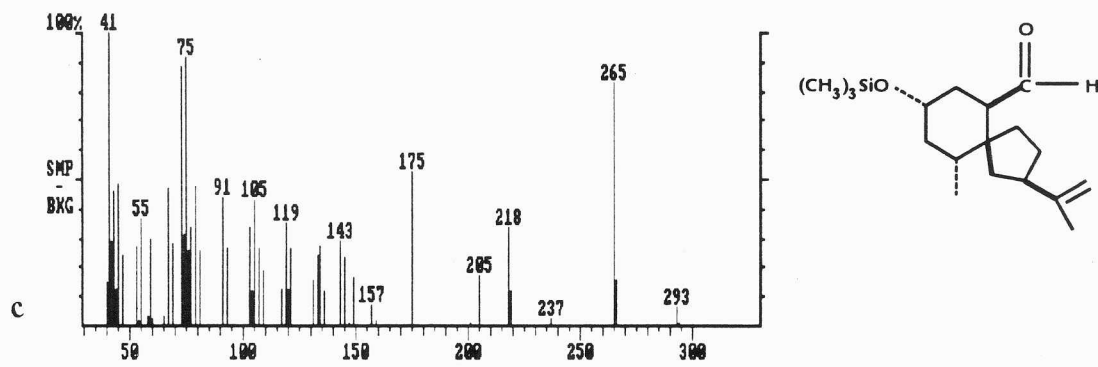
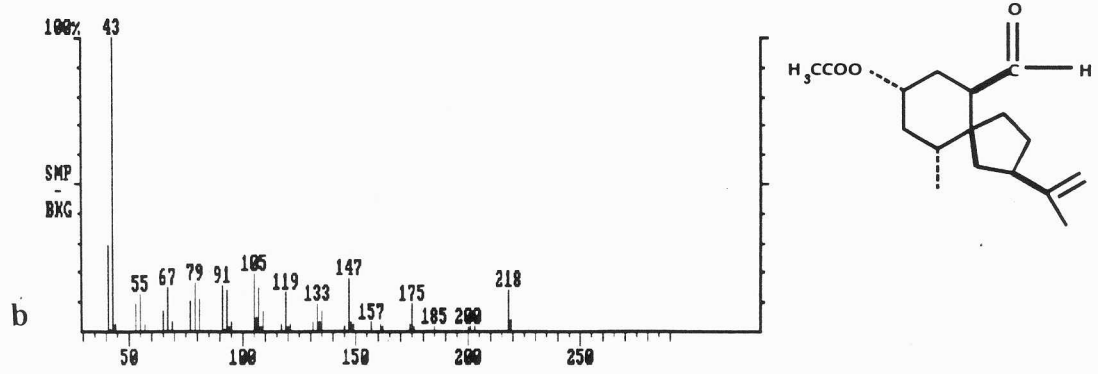
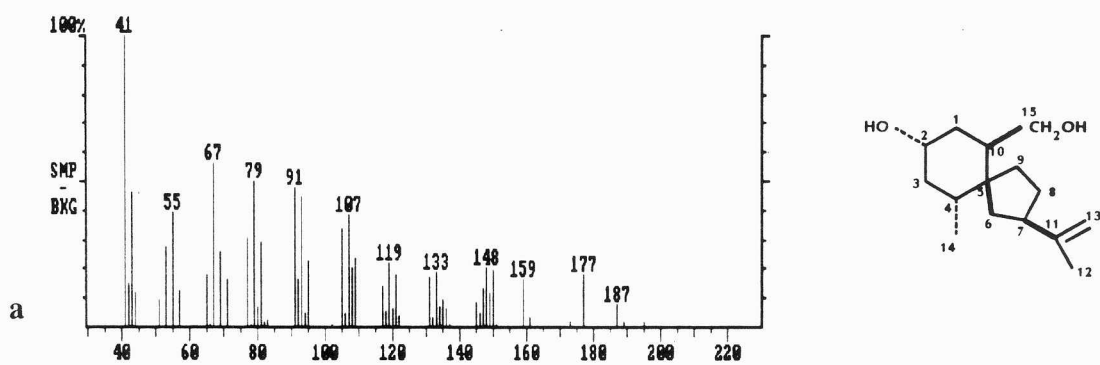


Fig. 2.7. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, do composto C, obtido das culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, elicítadas, ao fim de quatro dias, com *C. albicans* e incubadas durante 96 h (a) e dos respectivos derivados acetilado (b) e trimetilsililado (c).



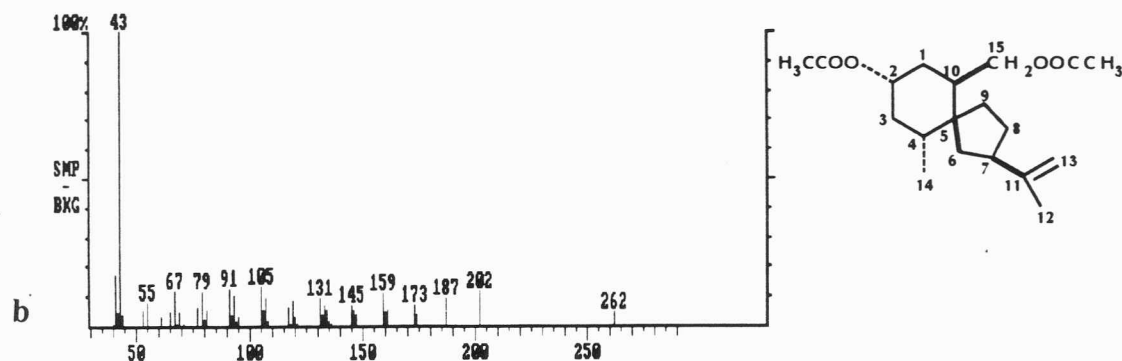


Fig. 2.8. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, do composto C reduzido com tetra-hidretoborato de sódio (a) e do respectivo derivado acetilado (b).

Tabela 2.2. Dados do espectro de ressonância magnética nuclear de protão da 10-epilubimina. δ -desvio químico; J -constante de acoplamento; d-dublete; m-multiplete; s-singlete; s def.-singlete deformado

atribuição	δ (ppm)	J (Hz)	multiplicidade
14	0,93	7	d
3a	1,13	-	m
1a e 3e	1,64	-	m
13	1,70	-	s def.
1e	2,24	-	m
7	2,45	-	m
10	2,48	-	m
2	3,74	-	m
12	4,69	-	m
15	9,86	-	s def.

No espectro de massa de impacto electrónico do composto D (IR=1855 em coluna DB-1), da Fig. 2.1, (Fig. 2.9a) observa-se o ião molecular de baixa intensidade a m/z 236 $[M]^+$ (Esquema 2.2), compatível com a fórmula empírica $C_{15}H_{24}O_2$, que constitui o primeiro elemento da série formada pelos iões m/z 218 $[M-18]^+$, 193 $[M-43]^+$, 175 $[M-18-43]^+$, 161, 147, 133, 119, 105 e 91. Também neste caso, e à semelhança do observado nos espectros de massa dos compostos A, B e C, estão presentes os iões da série C_nH_{2n-5} (m/z 79, 93, 107 e 121), característica dos terpenos alicíclicos. A alteração do tempo de retenção e do padrão de fragmentação observado nos dos correspondentes derivados acetilado e trimetilsililado (Fig. 2.9b e 2.9c) confirmam a presença de um grupo hidroxilo livre na molécula. De salientar que, neste caso, o ião m/z 265 $[M-43]^+$, do espectro de massa do derivado sililado,

tem uma intensidade inferior à do composto C, justificável por uma menor estabilidade do fragmento, por razões conformacionais.

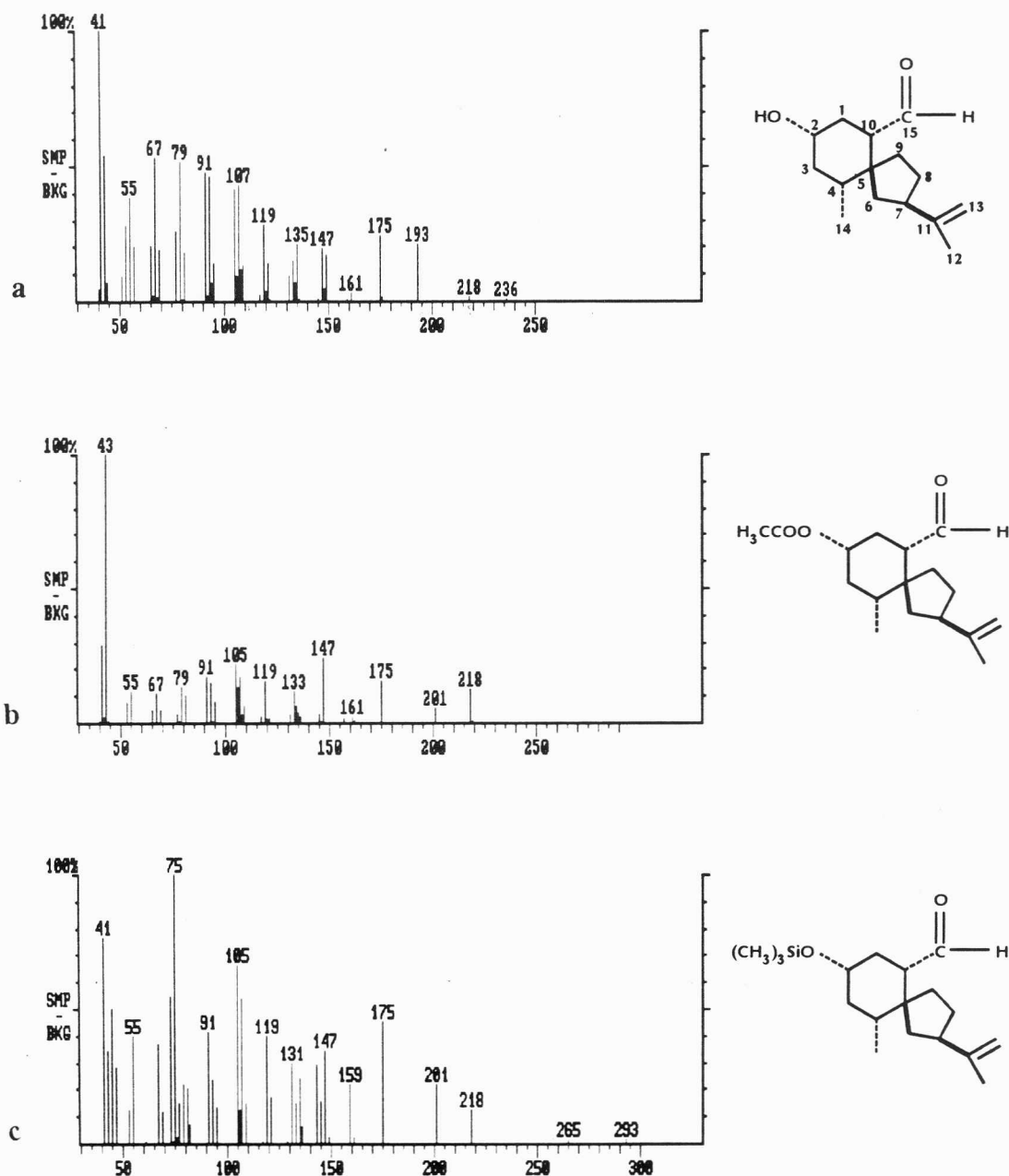
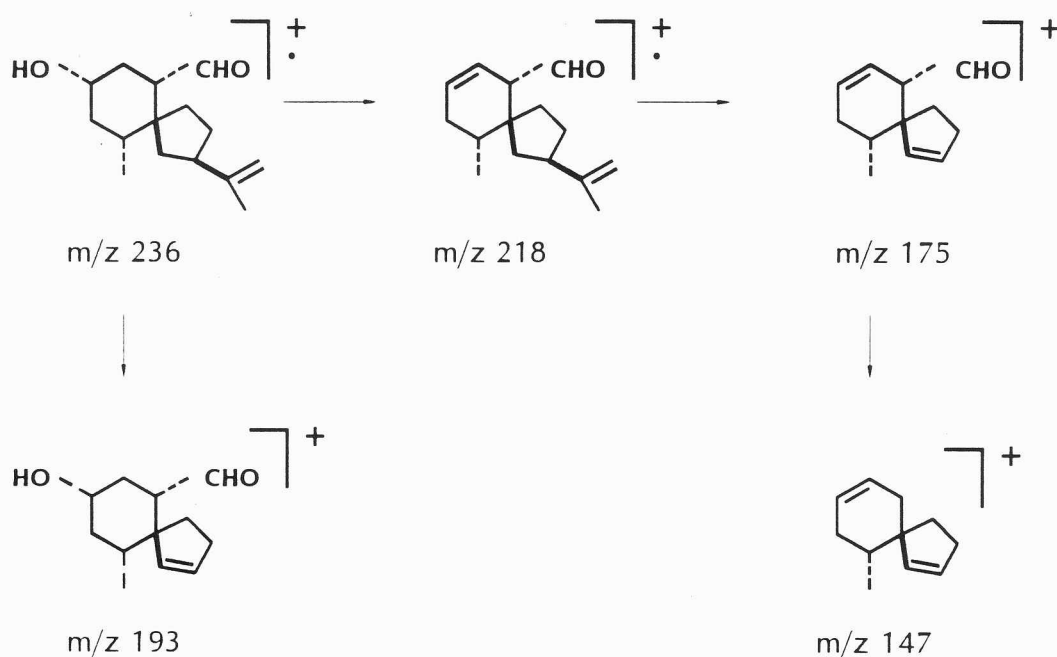


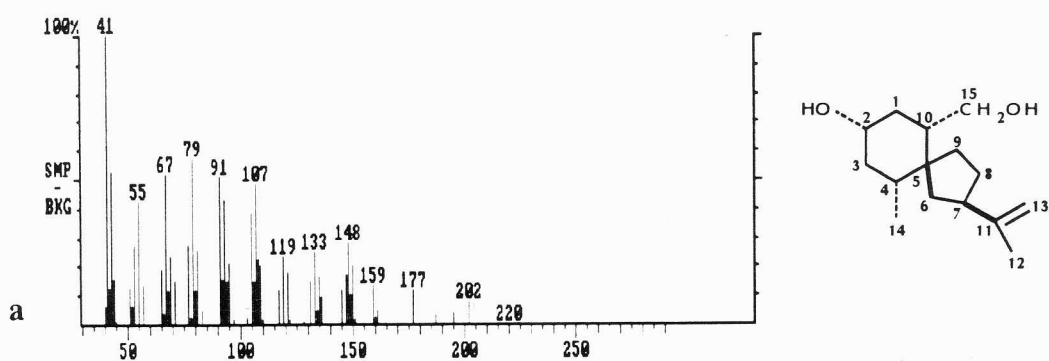
Fig. 2.9. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, do composto D, obtido das culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, elicítadas, ao fim de quatro dias, com *C. albicans* e incubadas durante 96 h (a) e dos respectivos derivados acetilado (b) e trimetilsililado (c).

No espectro de massa de impacto electrónico do composto D, reduzido com tetra-hidretoborato de sódio (Fig. 2.10a), observa-se um fragmento de massa m/z 220 $[M-18]^+$, seguido dos fragmentos m/z 202 $[M-18-18]^+$, 177 $[M-18-43]^+$ e 159 $[M-18-18-43]^+$, que confirma a presença de um grupo carbonilo, já sugerido pelo de-

envolvimento de uma reacção corada com dinitro-2,4-fenilhidrazina e benzidina. A presença de dois grupos hidroxilo livres na molécula do produto reduzido é, por seu turno, confirmada pelos iões m/z 262 $[M-60]^+$, 220 $[M-60-42]^+$ e 202 $[M-60-60]^+$ observados no espectro de massa do correspondente derivado acetilado (Fig. 2.10b). As ligeiras diferenças observadas nas fragmentações quer da lubimina e 10-epilubimina, quer dos respectivos compostos reduzidos e seus derivados acetilados, justificam-se por razões conformacionais.



Esquema 2.2. Esquema da fragmentação provável da lubimina.



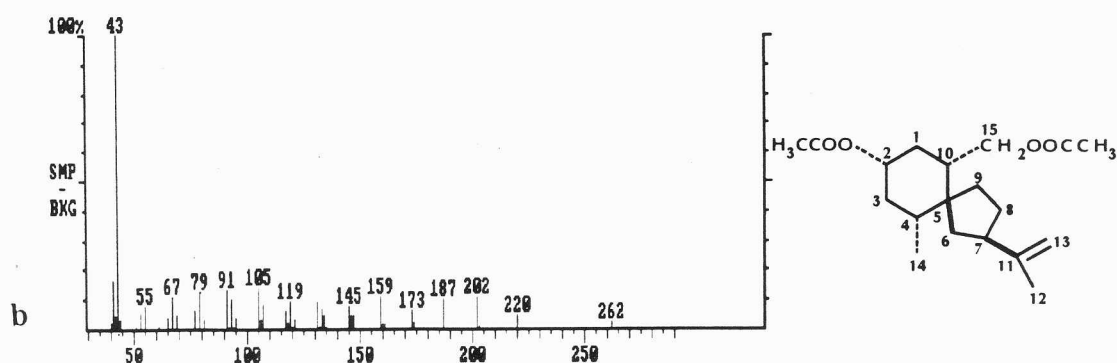


Fig. 2.10. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, do composto D reduzido com tetra-hidretoborato de sódio (a) e do respectivo derivado acetilado (b).

A existência de um grupo formilo no composto D é também confirmado pelo duplete observado a 9,80 (H, $J=3$ Hz), no espectro de $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; ppm). Observam-se, ainda, entre outros (Tabela 2.3), os sinais característicos de um grupo isopropenilo a 1,70 (s def.) e 4,69 (m).

Tabela 2.3. Dados do espectro de ressonância magnética nuclear de protão da lubimina. δ -desvio químico; J -constante de acoplamento; d-dublete; m-multiplete; s-singlete; s def.-singlete deformado

atribuição	δ (ppm)	J (Hz)	multiplicidade
14	0,93	7	d
3a	1,10	-	m
1a	1,55	-	m
3e	1,64	-	m
13	1,70	-	s def.
1e	1,99	-	m
10	2,26	-	m
7	2,45	-	m
2	3,65	-	m
12	4,69	-	m
15	9,80	3	d

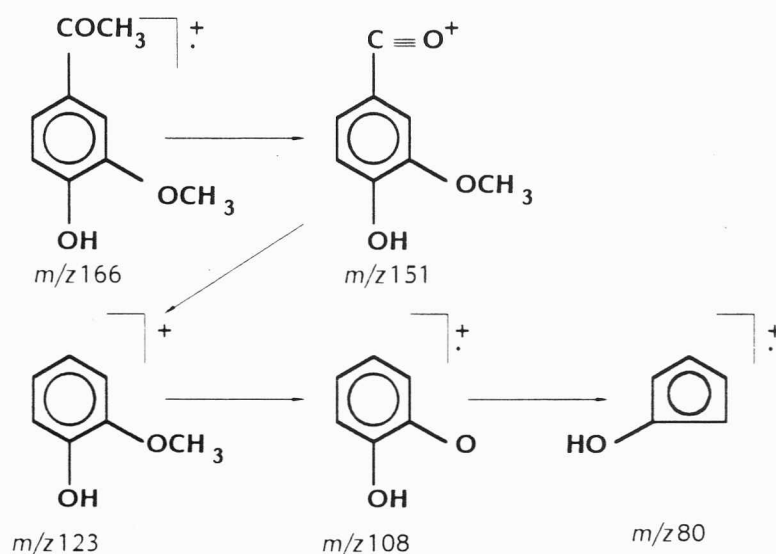
A informação obtida permite identificar o composto como sendo a lubimina (Katsui *et al.*, 1974; Kalan e Osman, 1976; Stoessl *et al.*, 1976, 1978; Katsui *et al.*, 1977; Stoessl e Stothers, 1980; Brindle *et al.*, 1985; Ewing *et al.*, 1990). Neste caso, o deslocamento da frequência de ressonância do protão formilo, para campos

mais altos, relativamente ao da 10-*epilubimina*, é justificado pelo facto do grupo formilo se encontrar em posição equatorial e, conseqüentemente os prótons H-15 e H-10 assumirem uma posição *quasi*-antiperiplanar (Ewing *et al.*, 1990).

A identidade dos compostos C (10-*epilubimina*) e D (*lubimina*) foi confirmada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa com os de amostras autênticas.

Em algumas culturas de células em suspensão de *H. albus*, tratadas com elicitador, verificou-se a acumulação de compostos pertencente a um grupo diverso dos metabolitos de stress sesquiterpénicos até agora referidos. Na identificação dos compostos, efectuada por GC-MS, utilizaram-se amostras, quer em natureza, quer após derivatização e, sempre que possível, compararam-se os correspondentes espectros de massa e os tempos de retenção com os de amostras autênticas.

No espectro de massa de impacto electrónico (Fig. 2.11a) do composto com menor tempo de retenção, (4,9 min) observa-se o ião molecular intenso a m/z 166 $[M]^+$, compatível com a fórmula empírica $C_9H_{10}O_3$, seguido do ião m/z 151 $[M-15]^+$ (pico base), 123 $[M-15-28]^+$ ou $[M-43]^+$ e 108 $[123-15]^+$ (Esquema 2.3). A presença de um ião molecular intenso e dos fragmentos m/z 151 e 123, sugere tratar-se de uma arilalquilcetona. Com efeito, neste grupo de compostos, o pico base corresponde, na generalidade dos casos, ao fragmento $ArC\equiv O^+$, formado por cisão da ligação β , relativamente ao anel aromático. No passo seguinte dá-se a eliminação da espécie $C=O$ e a formação do correspondente ião arilo.



Esquema 2.3. Esquema da fragmentação provável da acetovanilona.

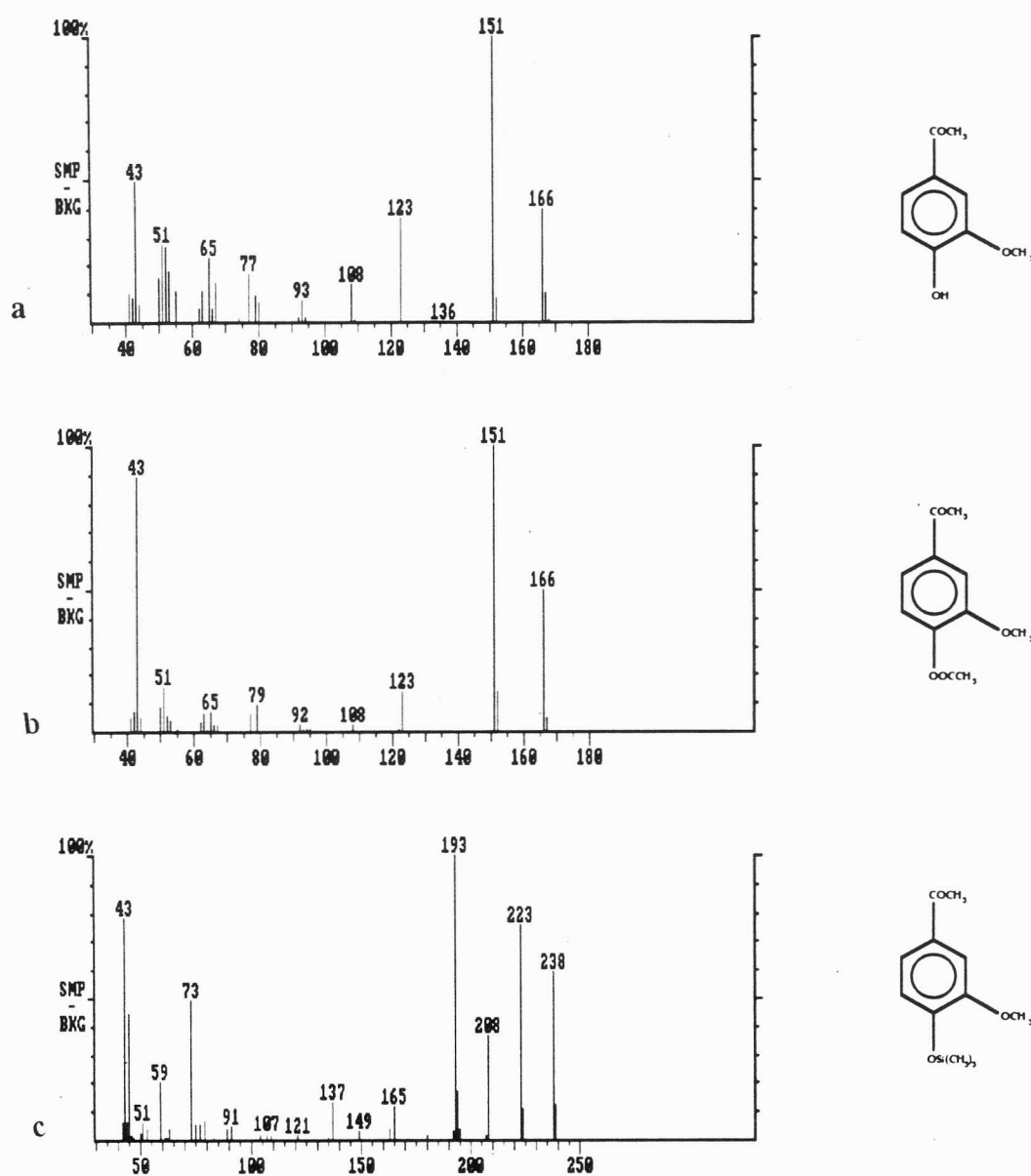
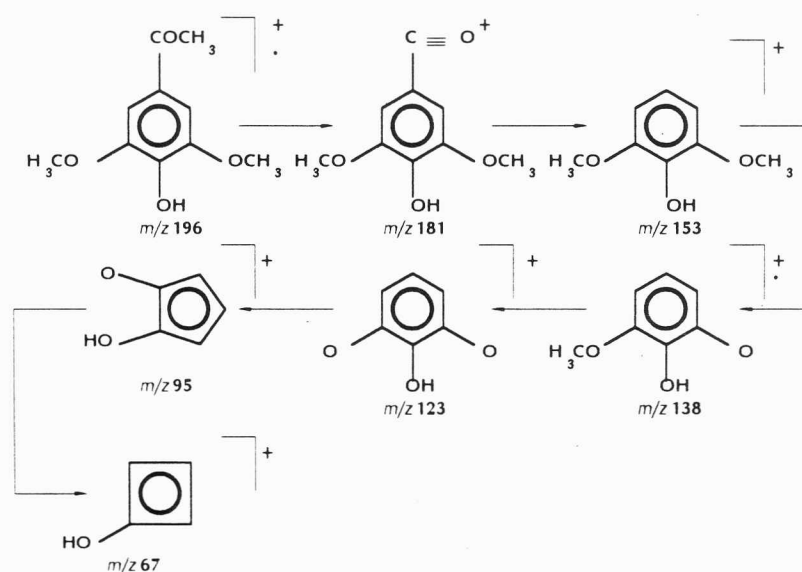


Fig. 2.11. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, da acetovanilona (a), extraída das culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com 14 dias, e dos respectivos derivados acetilado (b) e trimetilsililado (c).

Informação complementar, sobre a estrutura do composto, foi obtida a partir dos derivados acetilado e sililado (Fig. 2.11b e 2.11c). O espectro de massa do derivado acetilado apresenta um padrão de fragmentação idêntico ao da amostra não derivatizada (Fig. 2.11b). Também neste caso, o ião de massa mais elevada aparece a m/z 166 [M-42]. Seguem-se-lhe os iões m/z 151, 123 e 108. No entanto, a prova inequívoca da acetilação do composto reside, quer no facto de se ter registado alteração do tempo de retenção, após a derivatização, quer pela maior intensidade do ião m/z 43, relativamente à amostra não derivatizada. Por outro lado, a eliminação

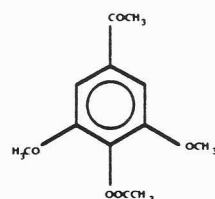
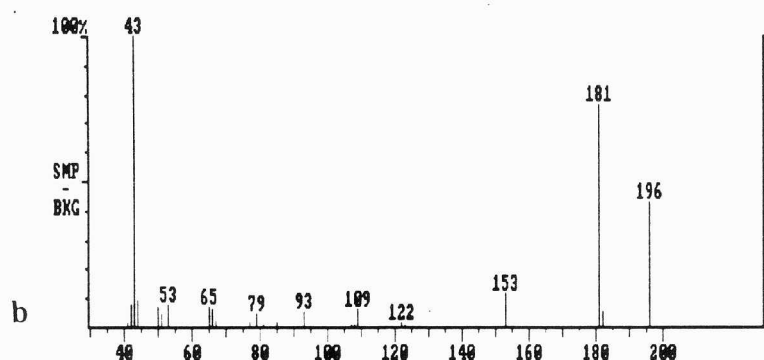
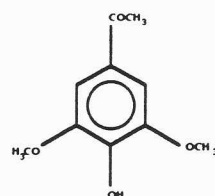
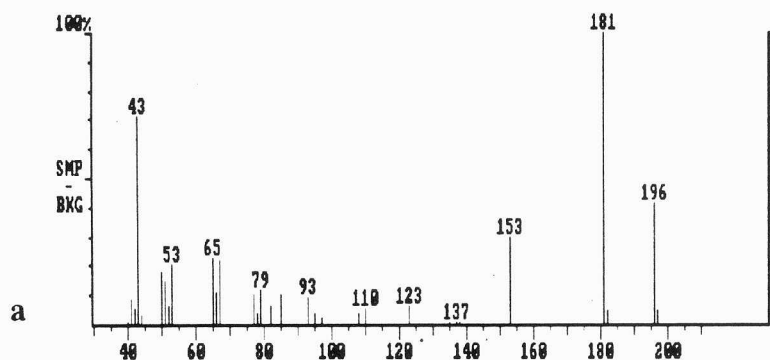
de 42 u. m. a. (CH_2CO ; cetena) é indicativa da presença de um hidroxilo ligado a um anel aromático. A trimetilsililação confirma a presença de um grupo hidroxilo livre na molécula. No espectro de massa deste derivado (Fig. 2.11c), observa-se o ião molecular intenso a m/z 232 $[\text{M}]^+$, seguido dos iões m/z 223 $[\text{M}-15]^+$, 208 $[\text{M}-15-15]^+$, 193 $[\text{M}-15-15-15]^+$ (pico base) e 165 $[\text{M}-15-15-15-15]^+$. Os fragmentos m/z 193 e 165 confirmam a natureza arilalquilcetónica do composto. O conjunto dos dados obtidos, permite identificar este composto como sendo a acetovanilona.

A massa molecular do segundo composto, com tempo de retenção 9,5 min, é superior à do composto precedente, em 30 u. m. a., sugerindo a presença de mais um grupo metoxilo. No seu espectro de massa de impacto electrónico (Fig. 2.12a) observa-se o ião molecular intenso a m/z 196 $[\text{M}]^+$, compatível com a fórmula empírica $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$, seguido do ião m/z 181 $[\text{M}-15]^+$ (pico base) e 153 $[\text{M}-15-28]^+$ ou $[\text{M}-43]^+$, característicos das cetonas aromáticas. Observam-se, ainda, os iões m/z 138 $[\text{M}-15-15]^+$, 123 $[\text{M}-15-15-15]^+$, 95 $[\text{M}-15-15-15-15]^+$ e 67 $[\text{M}-15-15-15-15-15]^+$, típicos da fragmentação dos éteres aromáticos, que confirmam a presença de dois grupos metoxilo (Esquema 2.4).



Esquema 2.4. Esquema da fragmentação provável da acetosiringona.

À semelhança do composto precedente, também, neste caso, não se observa ião molecular no espectro de massa do derivado acetilado (Fig. 2.12b). O padrão de fragmentação é de todo idêntico ao da amostra não derivatizada (Fig. 2.12a). O fragmento de massa mais elevada surge a m/z 196 $[M-42]^+$, constituindo o primeiro elemento da série formada pelos iões m/z 181 $[M-42-15]^+$ e 153 $[M-42-15-28]^+$. O pico base é, neste derivado, o ião m/z 43 $[CH_3CO]^+$. A presença de um grupo hidroxilo livre na molécula é confirmada pela análise do espectro de massa do derivado trimetilsililado (Fig. 2.12c). Aqui observa-se o ião molecular intenso a m/z 268 $[M]^+$, constituindo o primeiro elemento da série formada pelos iões m/z 253 $[M-15]^+$, 238 $[M-15-15]^+$, 223 $[M-15-15-15]^+$ e 195 $[223-28]^+$. A fragmentação observada leva a identificá-lo como sendo a acetosiringona e está de acordo com a descrita por Stachel *et al.* (1985) para o mesmo composto.



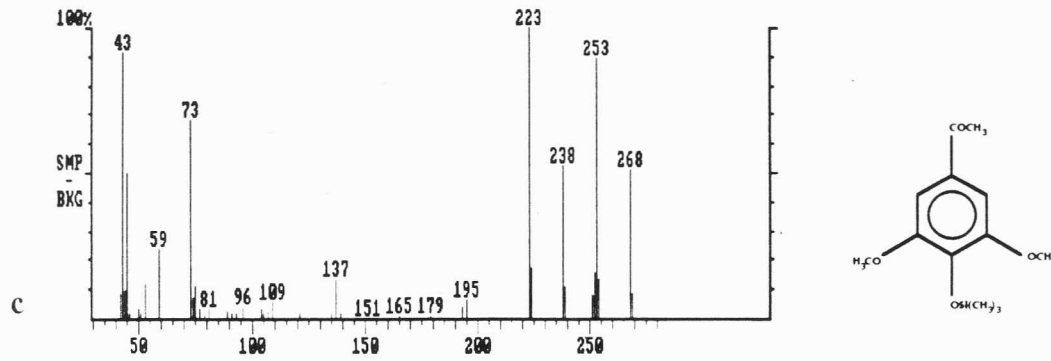
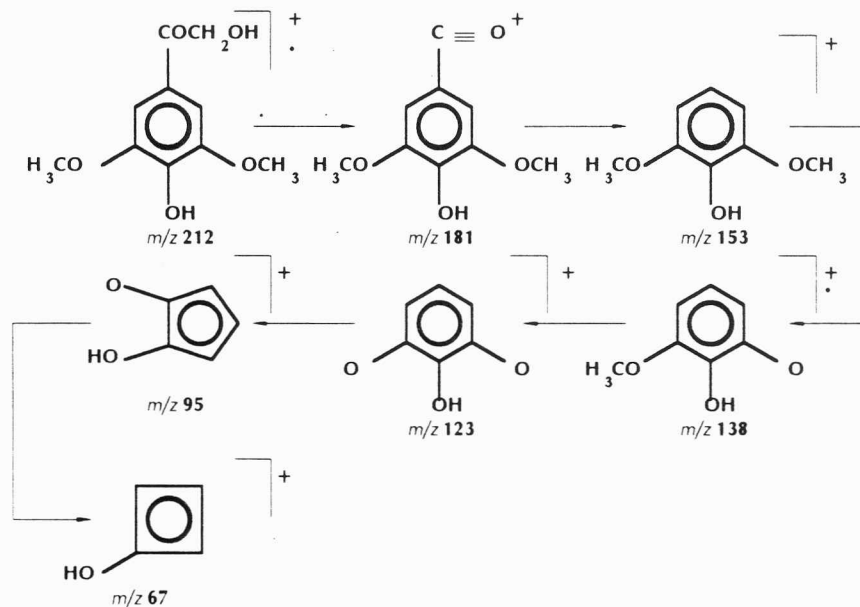


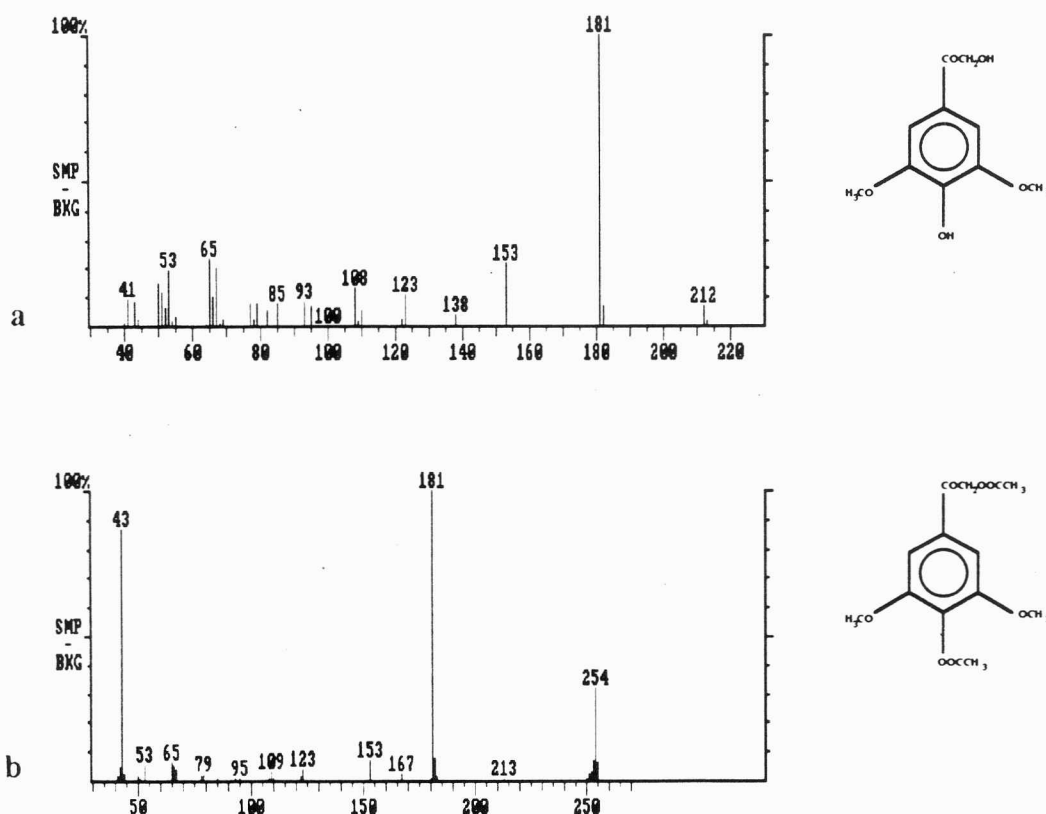
Fig. 2.12. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, da acetosiringona (a), extraída das culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com 14 dias, e dos respectivos derivados acetilado (b) e trimetilsililado (c).

No espectro de massa de impacto electrónico (Fig. 2.13a) do composto com maior tempo de retenção (15,4 min) o ião molecular m/z 212 $[M]^+$, pouco intenso, é compatível com a fórmula empírica $C_{10}H_{12}O_5$. O ião molecular constitui o primeiro elemento da série formada pelos iões m/z 181 $[M-31]^+$ e 153 $[181-28]^+$, ambos característicos das arilalquilcetonas. A restante fragmentação é muito semelhante à da acetosiringona (Esquema 2.5).



Esquema 2.5. Esquema da fragmentação provável da α -hidroxiacetosiringona.

A fragmentação observada no espectro de massa do derivado acetilado (Fig. 2.13b) é compatível com o de uma aril- α -hidroxialquilcetona. O fragmento m/z 254 é justificado pela eliminação de ceteno, por parte do ião molecular, o que apoia a existência de um grupo hidroxilo ligado a um anel aromático, e o fragmento m/z 181 $[M-42-73]^+$, é explicável pela eliminação do grupo acetoxialquilo, por parte do fragmento m/z 254 (Esquema 2.6). Esta hipótese é apoiada pela fragmentação observada no espectro de massa do derivado trimetilsililado (Fig. 2.13c). O ião molecular m/z 356 $[M]^+$, pouco intenso, é o primeiro elemento da série formada pelos iões m/z 341 $[M-15]^+$ e 253 $[M-103]^+$ (pico base). Este último corresponde à eliminação da espécie CH_2OTMS , por ruptura da ligação β , relativamente ao anel aromático da arilalquilcetona, o que é comprovado pela presença do ião m/z 103 $[CH_2OTMS]^+$. De referir que este composto aloja três grupos trimetilsililo quando a derivatização é efectuada em presença de piridina e sob aquecimento (Fig. 2.13d). Um tal comportamento é explicável pela relativa facilidade de enolização do carbonilo, devida à presença de um grupo hidroxilo livre ao carbono α . O padrão de fragmentação do composto em natureza e dos seus derivados, permite identificá-lo como α -hidroxiacetosiringona e está de acordo com o descrito por Spencer *et al.* (1990) e Spencer e Towers (1991) para o mesmo composto.



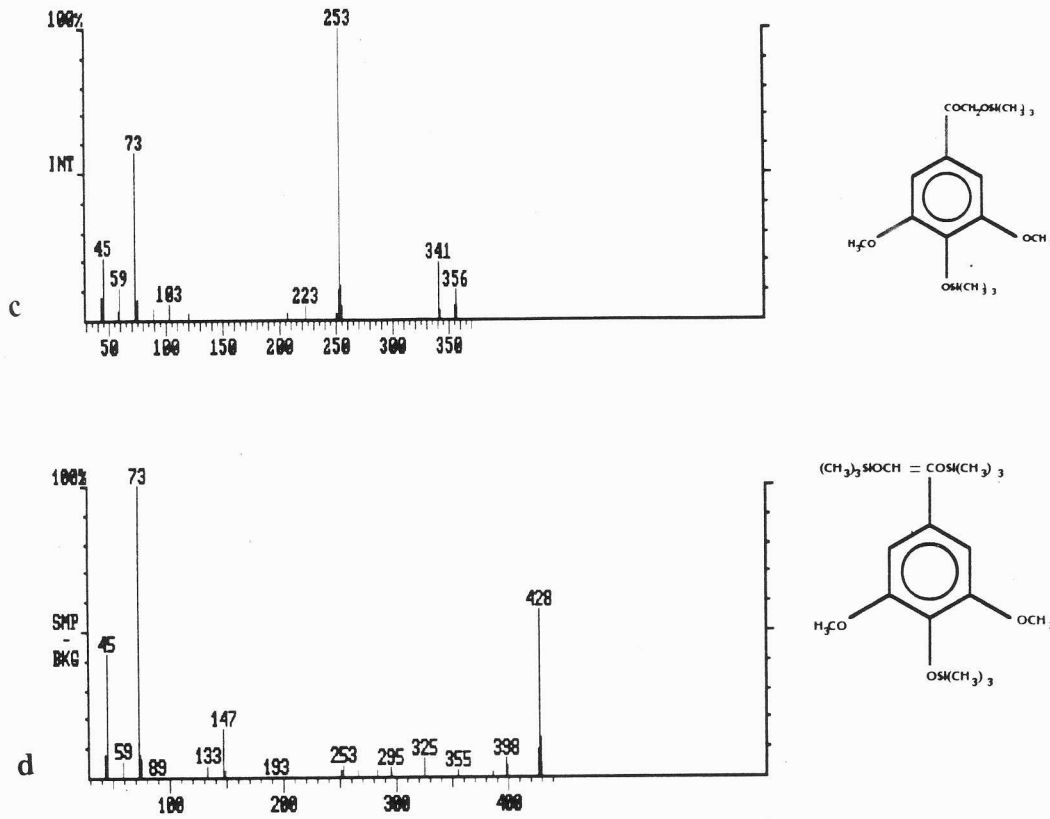
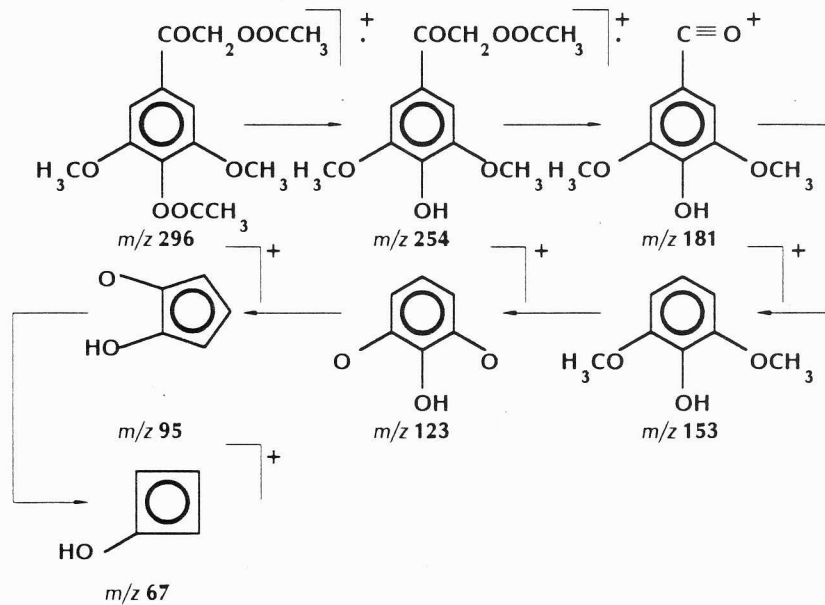


Fig. 2.13. Espectro de massa de impacto electrónico, de 70 eV, da α -hidroxiacetosiringona (a), extraída das culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementadas com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com 14 dias, e dos respectivos derivados acetilado (b), trimetilsililado com uma mistura de THF, HMDS e TMCS (c) e trimetilsililado com piridina a quente (d).



Esquema 2.6. Esquema da fragmentação provável do derivado acetilado da α -hidroxiacetosiringona.

2.1.2. ACUMULAÇÃO DOS METABOLITOS DE STRESS APÓS ELICITAÇÃO BIÓTICA

2.1.2.1. Estudo da produção dos metabolitos de stress, pelas culturas de células em suspensão de *Hyoscyamus albus*, com diversos elicitadores

As culturas de células em suspensão de *H. albus*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, e elicitadas no início da fase estacionária com micélio autoclavado e liofilizado de *Phytophthora cinnamomi* ou com células autoclavadas e liofilizadas de *Candida albicans* produziram, maioritariamente, lubimina e 10-epilubimina, além de pequenas quantidades de solavetivona e rishitina. Por seu turno, nas culturas tratadas com celulase, não se registou a presença de qualquer dos compostos referidos.

A produção de fitoalexinas sesquiterpénicas tem sido verificada noutras plantas pertencentes à família Solanaceae. De um modo geral, os compostos formados, em resposta à elicitação, são característicos da planta e independentes do elicitador empregue. Assim, uma planta ou a correspondente cultura de células acumularão o mesmo tipo de compostos independentemente da origem do elicitador. Refira-se a título de exemplo que a batata (*Solanum tuberosum*) sintetiza e acumula várias fitoalexinas sesquiterpénicas, como a rishitina, a lubimina e a fituberina, quando infectadas por microrganismos de espécie diversa (Tomiya *et al.*, 1968; Varns *et al.*, 1971; Lyon, 1972; Lisker e Kuc, 1977; Mansfield, 1982). Segundo Lisker e Kuc (1977), a acumulação de rishitina e lubimina neste tubérculo pode ser induzida, quer por *Phytophthora infestans*, *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, quer por micélio sonicado e autoclavado dos respectivos fungos. Estes resultados sugerem não haver uma relação activa e directa entre fungo e planta, na acumulação de fitoalexinas, mas apenas a presença de determinados compostos no microrganismo que dispoletam a reacção na planta. Vários estudos têm sido feitos no sentido de determinar os constituintes responsáveis pela acumulação de fitoalexinas em plantas ou cultura de células de Solanaceae. Segundo Bostock *et al.* (1981), o ácido araquidónico e o ácido eicosapentaenóico, extraídos do micélio de *P. infestans*, são responsáveis pela necrose e elicitação da lubimina e da rishitina na batata. A presença de um carboxilo livre, o tamanho da cadeia carbonada e a posição das ligações duplas na molécula parecem ser importantes no processo de elicitação (Preisig e Kuc, 1983; Kuc e Preisig, 1984; Kuc e Rush, 1985). Embora o ácido araquidónico se tenha revelado eficiente na elicitação de secções de tubérculo de batata, o mesmo não se verificou em culturas de células em suspensão (Threlfall e Whitehead, 1988a). Noutros ensaios, ainda, foi detectada a acumulação de rishitina e lubimina, em secções de tubérculo de batata, somente na presença de glucanos extraídos de *Phytoph-*

thora megasperma var *sojae*, *P. cinnamomi* e *P. infestans* (Lisker e Kuc, 1977; Cline *et al.*, 1978). Mais tarde, alguns autores (Preisig e Kuc, 1983; Kuc e Preisig, 1984; Kuc e Rush, 1985) verificaram que alguns destes glucanos, com ligações β 1-3, incluindo oligossacáridos extraídos do micélio de *P. infestans*, embora não possuindo características de elicitor, levaram a uma maior acumulação de sesquiterpenos na batata, elicitados por determinados ácidos gordos. Por outro lado, e segundo Zook e Kuc (1987), a produção de rishitina pela batata, na presença do fungo *Helminthosporium carbonum*, não parece ser devida à presença dos ácidos araquidónico e eicosapentaenóico, uma vez que não fazem parte da constituição quer da parede, quer da membrana do fungo. A acumulação desta fitoalexina seria, assim, devida a um estímulo químico diferente (Zook e Kuc, 1987). Mais recentemente, outros autores verificaram que determinadas holoproteínas, de baixo peso molecular, secretadas por diversas espécies de *Phytophthora*, elicitam a acumulação de fitoalexinas. Estas proteínas, que denominaram elicinas, promovem a necrose das folhas do tabaco e induzem a acumulação de proteínas relacionadas com patogénese e resistência a *Phytophthora nicotianae* (Huet e Pernollet, 1989; Ricci *et al.*, 1989; Nespoulous *et al.*, 1992; Zanetti *et al.*, 1992). Além disso, elicitam a acumulação de capsidiol, em cultura de células em suspensão de tabaco (Blein *et al.*, 1991). Estas proteínas diferem, porém, das proteínas elicitoras, isoladas também de fungos (Farmer e Helgeson, 1987; Nespoulous *et al.*, 1992). No caso das culturas de células em suspensão de *H. albus*, a elicitação induzida pelo micélio de *P. cinnamomi* e pelas células de *C. albicans* não parece dever-se a proteínas porquanto os microrganismos foram previamente autoclavados. Assim, é de admitir que, em consequência da autoclavagem, tenha havido hidrólise da parede celular, com a consequente formação de oligossacáridos, com actividade elicitoras.

Embora as culturas de células de *H. albus* tenham manifestado reacção aos preparados obtidos quer de *P. cinnamomi*, quer de *C. albicans*, nos ensaios de elicitação ulteriores, utilizou-se apenas *C. albicans* por apresentar um crescimento mais rápido e por isto permitir obter a quantidade de biomassa apreciável num curto período de tempo.

A acumulação de metabolitos de stress (rishitina, lubimina e solavetivona) por cultura de células em suspensão de *S. tuberosum*, infectados com fungo, ocorre tanto nas células como no meio de cultura, embora com maior significado neste último (Brindle *et al.*, 1983). Comportamento semelhante foi verificado por Barz *et al.* (1988b) em cultura de células de *C. arietinum*. Segundo estes autores, a libertação de metabolitos de stress, para o meio de cultura, parece ser uma característica das culturas de células vegetais.

Com o objectivo de estabelecer um protocolo de extracção que permitisse obter níveis elevados de metabolitos de stress, determinaram-se, em ensaios preliminares, os teores de lubimina e 10-epilubimina, no meio de cultura e nas células de *H. albus*, elicitadas ao segundo dia após a repicagem e incubadas durante 48h e compararam-se com os obtidos de culturas, mantidas nas mesmas condições, mas em que a extracção só foi efectuada após sonicação das células no respectivo meio de cultura. O teor em lubimina, encontrado no meio de cultura (21,25 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ cultura) foi muito semelhante ao obtido nos ensaios em que se procedeu ao rebentamento prévio das células (21,73 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ cultura). No que diz respeito à 10-epilubimina, o seu teor era, no primeiro caso, inferior ao do segundo (4,32 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ e 7,30 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$, respectivamente). Os níveis de lubimina (0,31 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ cultura) e de 10-epilubimina (0,23 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ cultura) registados nas células, eram relativamente baixos. Face a estes resultados, nos ensaios subsequentes, a extracção foi efectuada após rebentamento prévio das células no meio de cultura.

2.1.2.2. A importância da idade das culturas de células em suspensão e do tempo de incubação com o elicitador na acumulação de metabolitos de stress

Em diversos sistemas estudados, a resposta ao elicitador, em termos, quer qualitativos, quer quantitativos, parece depender da fase de crescimento das células em cultura (Eilert, 1987).

A adição do elicitador (células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*) às culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, em intervalos de tempo regulares e, portanto, em diferentes fases de crescimento provocou sempre acastanhamento das células, visível logo ao fim de 6 horas. Concomitantemente, verificou-se a acumulação de lubimina e 10-epilubimina, como compostos principais, numa relação que variou entre 2 e 3. Relação semelhante foi detectada por outros autores, em batata infectada com *Monilinia fructicola* (Stoessl *et al.*, 1978). Em muitos outros sistemas, quer na planta quer em cultura de células, a acumulação de fitoalexinas tem sido verificada poucas horas após a adição do elicitador (Chappell e Nable, 1987; Funk *et al.*, 1987; Brindle *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1991; Marinelli *et al.*, 1991).

As culturas de células de *H. albus* manifestaram resposta diferenciada ao tratamento com o elicitador, no que diz respeito ao tipo e teor de compostos acumulados. A resposta inicial mais lenta foi observada nas culturas inoculadas aquando da subcultura. Neste caso, teores mais elevados de lubimina e 10-epilubimina foram

atingidos ao fim de 96 h de incubação. Em contraste, as culturas com 4 e 6 dias foram as que apresentaram a resposta inicial mais rápida (Fig. 2.14 e 2.15).

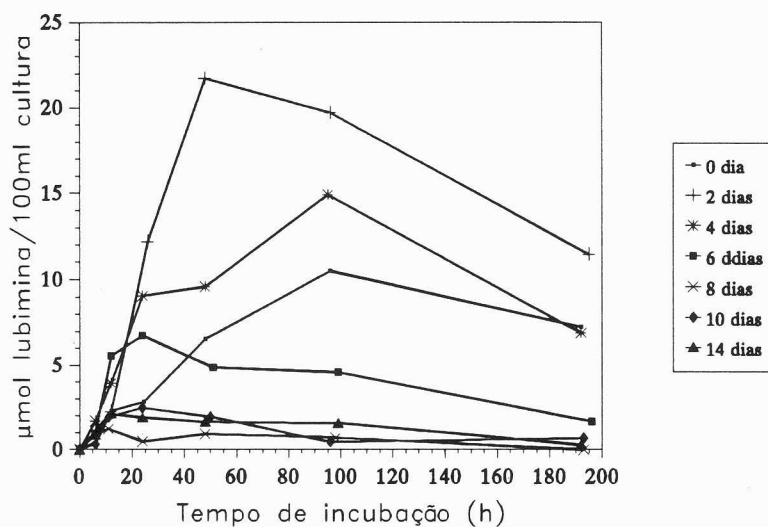


Fig. 2.14. Acumulação de lubimina nas culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, em diversos estádios de crescimento, elicitadas com 2 mg/ml células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, ao longo do tempo.

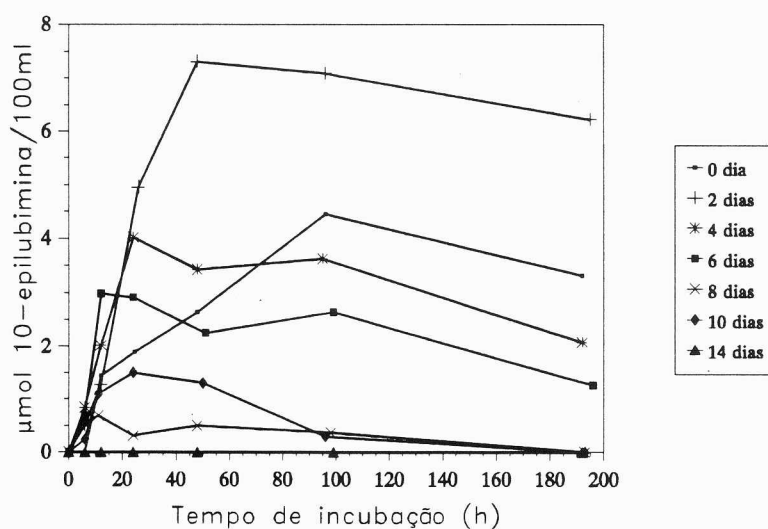


Fig. 2.15. Acumulação de 10-epilubimina nas culturas de células em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, em diversos estádios de crescimento, elicitadas com 2 mg/ml células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, ao longo do tempo.

Também na produção de shikonina, por cultura de células em suspensão de *Lithospermum erythrorhizon*, Kim e Chang (1990) verificaram que as culturas elicitadas durante a repicagem apresentavam uma resposta inicial mais lenta. Em todo o

caso, à exceção das culturas com quatro dias e apenas para a lubimina, os teores máximos dos dois compostos foram inferiores aos das culturas elicítadas aquando da subcultura. Estes resultados sugerem que as células têm um período inicial de adaptação ao meio de cultura e só depois reagem à presença do elicítador.

Os níveis mais elevados de lubimina e 10-*epilubimina* foram registados nas culturas inoculadas ao segundo dia após a repicagem e incubadas durante 48 h. Pelo contrário, a menor acumulação de ambos os compostos foi verificada nas culturas com 8-14 dias (Fig. 2.14 e 2.15). Os níveis de hidratos de carbono eram, por esta altura, cerca de 1/2 a 1/4 dos presentes no meio de cultura aquando da inoculação (Fig. 1.3). Ora, sabendo-se que a biossíntese de acetato e mevalonato, dois precursores dos sesquiterpenos (Chappell e Nable, 1987; Brindle *et al.*, 1988), é fortemente dependente dos hidratos de carbono, a sua redução para aqueles níveis pode ter determinado a menor acumulação da lubimina e 10-*epilubimina*, verificada nestas culturas.

Nas culturas de *H. albus* elicítadas do sexto ao décimo quarto dia após a repicagem, os teores de lubimina e 10-*epilubimina* sofreram um declínio ao fim de 24 h de incubação. Nas restantes culturas, os níveis da lubimina e 10-*epilubimina* declinaram ao fim de 48-96 h de incubação (Fig. 2.14 e 2.15). Em qualquer dos casos, os níveis dos dois compostos diminuíram acentuadamente com períodos de incubação prolongados (Fig. 2.14 e 2.15). A diminuição dos níveis de fitoalexinas, associada a períodos de incubação prolongados, foi também verificada por outros autores noutros sistemas (Chappell e Nable, 1987; Funk *et al.*, 1987; Zook e Kuc, 1987; Brindle *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1991; Marinelli *et al.*, 1991). Como as fitoalexinas não são, necessariamente, produtos finais do metabolismo vegetal, a sua metabolização pode explicar estes resultados. Vários são os exemplos de biotransformação de fitoalexinas, pelas plantas, noutros metabolitos, geralmente, menos tóxicos (Vanetten *et al.*, 1982; Zacharius *et al.*, 1985). A adição de capsidiol e debneyol a culturas de células em suspensão de *Nicotiana tabacum* não elicítadas, levou à sua rápida metabolização (Threlfall e Whitehead, 1988b). Também culturas de *calli* e de células em suspensão de *Solanum tuberosum* biotransformaram a rishitina exógena em compostos não identificados. Outro tanto não se verificou com a lubimina. No entanto, nas culturas de células em suspensão de soja, a lubimina foi reduzida a 15-dihidrolubimina (Zacharius *et al.*, 1985). Existem também referências de biotransformação de solavetivona, rishitina e capsidiol exógenos em derivados hidroxilados por culturas de células de espécies diversas (Ishiguri *et al.*, 1978; Stothers *et al.*, 1978; Zacharius e Kalan, 1984).

Nas culturas de *H. albus* elicítadas aos 0, 2 e 4 dias após a repicagem e incubadas durante 96 h, verificou-se a acumulação de pequenas quantidades de solavetivo-

na e rishitina. Nas culturas com 14, 16, 18 dias, a acumulação de ambos os compostos, foi registada logo ao fim de 48 h de incubação (Tabelas 2.4 e 2.5). Como a acumulação destes sesquiterpenos foi concomitante com a diminuição dos teores de lubimina e 10-*epilubimina* tudo indica que, pelo menos, parte da lubimina tenha sido metabolizada em rishitina. Com efeito, a bioconversão da lubimina em rishitina, em tecidos de batata, é um dado adquirido (Murai *et al.*, 1982). Por outro lado, a presença de solavetivona pode revelar uma supressão da biossíntese da lubimina. Segundo Threlfall e Whitehead (1988b) a solavetivona é um precursor da lubimina (Fig. 2.16).

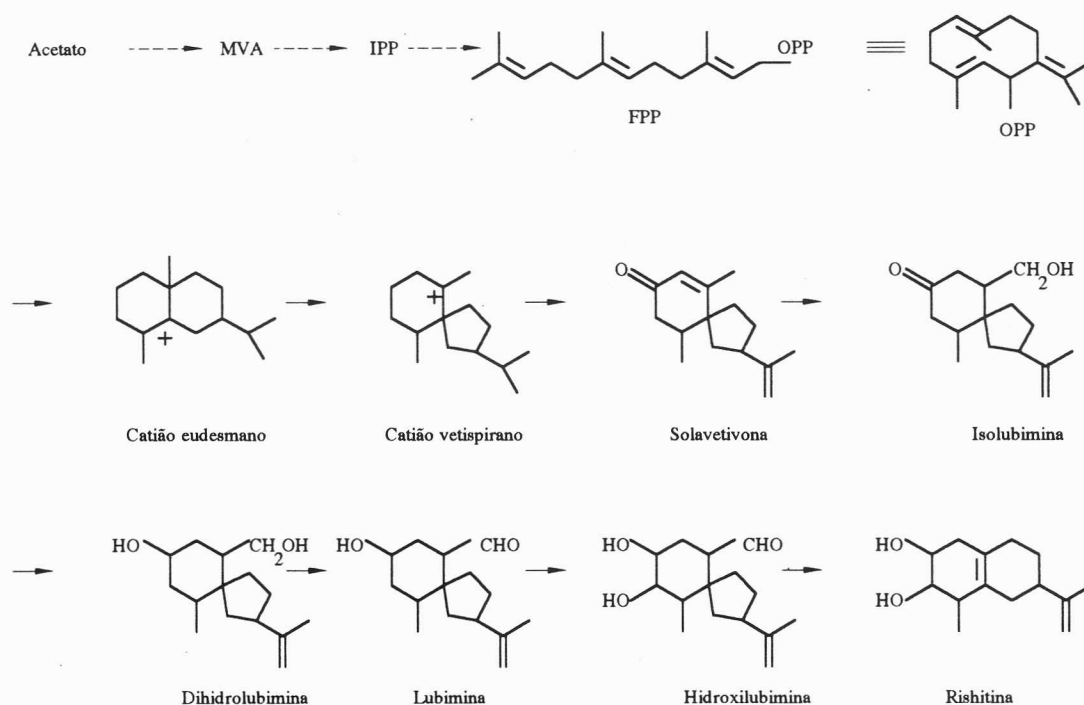


Fig. 2.16. Biossíntese da Solavetivona, lubimina e rishitina (Threlfall e Whitehead, 1988b).

Tabela 2.4. Acumulação de solavetivona ($\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ de cultura) nas culturas em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, elicitadas com 2 mg/ml de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, em diversos estádios de crescimento

	0 dia	2 dias	4 dias	14 dias	16 dias	18 dias
48 h	0,22	0,00	0,00	3,78	3,72	4,74
96 h	0,83	0,39	3,76	0,00	-	-
192 h	2,54	1,55	5,27	0,00	-	-

Tabela 2.5. Acumulação de rishitina ($\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ de cultura) nas culturas em suspensão de *H. albus* mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, elicitadas com 2 mg/ml de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, em diversos estádios de crescimento

	0 dia	2 dias	4 dias	14 dias	16 dias	18 dias
48 h	0,00	0,00	0,00	2,26	2,07	1,88
96 h	0,16	0,16	1,31	1,41	-	-
192 h	0,56	0,41	1,47	0,53	-	-

É de realçar, no entanto, que nas culturas de *H. albus* elicitadas ao sexto, oitavo ou décimo dia após a repicagem não se detectaram a solavetivona e a rishitina, pese embora a diminuição dos níveis de lubimina e 10-epilubimina registados nas culturas incubadas por períodos longos. Embora estes resultados sejam de difícil explicação, podem denotar a biotransformação da lubimina e 10-epilubimina em compostos não identificados e/ou não detectados pelos métodos usados.

Para além dos sesquiterpenos já referidos, algumas culturas acumularam também compostos do grupo das acetofenonas, nomeadamente acetovanilona e acetosiringona. Estes compostos foram detectados quer em culturas elicitadas na altura da repicagem e incubadas durante 24 h, quer em culturas elicitadas a partir do décimo dia após a repicagem. Como nota de realce, refira-se que nas culturas não elicitadas, com 14-18 dias, detectou-se também, para além das acetofenonas referidas, a hidroxiaacetosiringona. O aparecimento das acetofenonas não parece ter, contudo, qualquer relação com a elicitação, porquanto a sua presença foi detectada em culturas não elicitadas. Os níveis de acetovanilona, acetosiringona e hidroxiaacetosiringona foram, nas culturas não elicitadas, geralmente, superiores aos das culturas elicitadas, atingindo valores máximos da ordem de 49, 167 e 270 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ cultura de células, respectivamente. A acumulação da acetosiringona foi também referida por Threlfall e Whitehead (1988b) em cultura de *Nicotiana tabacum* elicitadas com celulase. Recentemente, Borg-Olivier e Monties (1993) detectaram acetofenóis, nomeadamente vanilina, *p*-hidroxibenzaldeído, ácido vanilínico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e siringaldeído, em rodela de batata, após 14 dias de seccionamento. A presença de acetofenonas em cultura de células de *H. albus* não elicitadas, em níveis superiores aos das culturas elicitadas pode explicar-se pelo facto de, no primeiro caso, as culturas se encontrarem mais activas do ponto de vista metabólico, apesar de, algumas destas culturas, estarem já em fase estacionária. Com efeito, Stachel *et al.* (1985) verificaram que nas culturas de raízes transformadas de *Nicotiana tabacum*, a acumulação de acetosiringona e hidroxiaacetosiringona era mais significativa nas culturas em que havia danificação celular mas também maior actividade metabólica.

Reconhecida que é a produção de acetofenonas por diversos membros das Solanaceae, quer em resposta a ferimentos (Spencer e Towers, 1991), quer quando man-

tidas em cultura, tudo indica que a sua acumulação é uma característica geral das espécies pertencentes a esta família, em resposta a condições de stress.

2.1.2.3. Influência da concentração do elicitador na acumulação de lubimina e 10-epilubimina pelas culturas de células em suspensão

A concentração de elicitador, fornecida a uma cultura de células vegetais, afecta profundamente a acumulação de metabolitos de stress. De um modo geral, consideram-se dois tipos de curvas de resposta em função da concentração de elicitador administrado: uma das curvas apresenta a forma típica de saturação, em que uma sobredosagem do elicitador não provoca efeitos adversos, ou seja, não se regista uma diminuição dos teores de metabolitos de stress acumulados. A outra, mais frequente, apresenta um valor óptimo bem nítido de elicitador, acima do qual a concentração de metabolitos de stress acumulado diminui. Em muitos casos, quando se utilizam preparações de elicitador não purificado, registam-se dois valores óptimos, pertencendo, cada um deles, a um elicitador diferente, presente no extracto usado (Eilert, 1987). Exemplos do primeiro tipo de curva são os descritos por Davis *et al.* (1993), na acumulação de fitoalexinas por cultura de células de *Gossypium hirsutum*, elicidadas com um preparado obtido de *Verticillium dahliae* 277. Exemplos do segundo tipo de curva foram descritos por Dixon *et al.* (1981). Estes autores verificaram existir concentrações óptimas diversas, de um elicitador não purificado, obtido a partir das paredes celulares do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, para a indução da fenilalanina amónia liase e flavanona sintase, em culturas de células em suspensão de *Phaseolus vulgaris*. Resultados idênticos foram obtidos por Brodelius (1988) e Funk *et al.* (1987) na acumulação de berberina por culturas de células de *Thalictrum rugosum*, elicidadas com glucanos; e por Tyler *et al.* (1989), na acumulação de sanguinarina em cultura de células de *Papaver somniferum* L., elicidadas com *Botrytis*.

Em *H. albus*, os níveis mais elevados de lubimina foram registados nas culturas elicidadas com 0,4 mg de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans* / ml de cultura em suspensão (Fig. 2.17). Quanto à 10-epilubimina, registaram-se dois valores óptimos (0,4 e 3 mg/ml) (Fig. 2.17). Estes resultados podem ficar a dever-se à presença, no extracto bruto, de diversos compostos elicitadores activos capazes de induzir diferentes formas das enzimas envolvidas na síntese e epimerização da lubimina.

Os nossos resultados apontam claramente para a necessidade de se determinar, para cada cultura de células vegetais, a concentração óptima do elicitador.

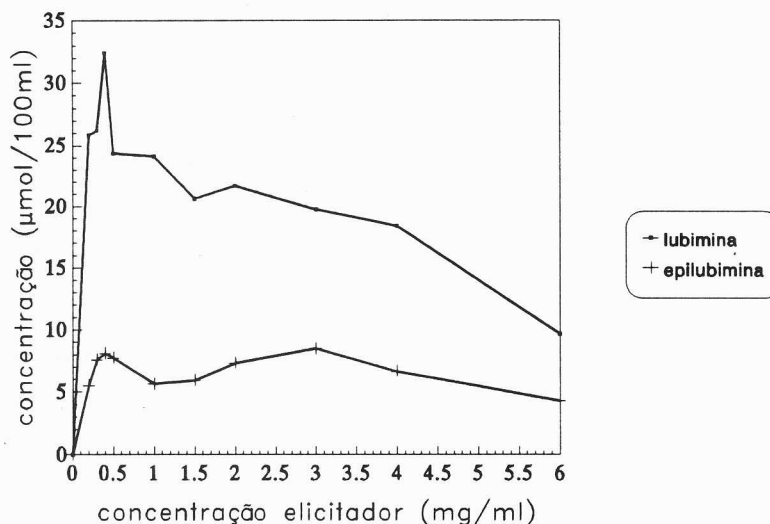


Fig. 2.17. Acumulação de lubimina e 10-epilubimina nas culturas de células em suspensão de *H. albus*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin, com dois dias, na presença de diversas concentrações de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans* e ao fim de 48 h de incubação.

2.1.2.4. Influência do acetato e farnesol, adicionados às culturas de células em suspensão, na acumulação de fitoalexinas sesquiterpênicas

As enzimas do metabolismo secundário não apresentam, por vezes, taxas máximas de catálise devido a insuficiência, entre outros, de precursores e cosubstratos indispensáveis à biossíntese dos compostos em estudo. Neste contexto, a adição de determinados precursores, ao meio de cultura, pode obviar a essas limitações e determinar um aumento da síntese e acumulação de metabolitos secundários de interesse.

Embora se tenha verificado em tecidos ou em cultura de células vegetais, nomeadamente de *N. tabacum* e *S. tuberosum*, a incorporação de ^{14}C , proveniente quer de acetato quer de mevalonato, nas fitoalexinas sesquiterpênicas por elas produzidos (Shih e Kuc, 1973; Stoessl *et al.*, 1978; Coolbear e Threlfall, 1985; Brindle *et al.*, 1988; Stermer e Bostock, 1987), nas culturas de células em suspensão de *H. albus*, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin e elicitadas com 2 mg/ml de células liofilizadas e autoclavadas de *C. albicans*, a administração de acetato de sódio, quer antes, quer aquando da adição do elicitador não levou a uma maior acumulação de lubimina e 10-epilubimina. Os nossos resultados podem ficar a dever-se a uma utilização do acetato no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e/ou outras vias do metabolismo primário. Segundo Shih e Kuc (1973), a incorporação do ^{14}C proveniente do mevalonato era superior ao do proveniente do acetato.

Embora Brindle *et al.* (1988) tenha verificado um aumento da concentração final de fitoalexinas acumuladas nas culturas de células de *S. tuberosum*, elicidadas com fungo, na sequência da administração quer de mevalonato, quer de acetato, verificaram também que o ácido mevalónico era a maior e a única fonte de carbono utilizada na síntese para a síntese de fitoalexinas.

A adição de farnesol, às culturas de *H. albus*, na ausência de elicitor, não levou acumulação de lubimina, 10-*epilubimina*, solavetivona ou rishitina. Nestas culturas, a sua presença promoveu o acastanhamento e morte celulares. Por outro lado, a adição do farnesol, quer 48h antes da elicitação, quer na altura da adição do elicitor, levou a uma diminuição dos níveis de lubimina e 10-*epilubimina*. Além disso, no primeiro caso, os valores encontrados (9,07 e 3,23 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$, respectivamente) eram inferiores aos do segundo (17,46 e 5,46 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$, respectivamente). Face a estes resultados ser-se-ia levado a pensar que o farnesol não era um precursor eficiente da síntese da lubimina e 10-*epilubimina*, contrariando o estabelecido por outros autores, que verificaram ser o farnesilpirofosfato um precursor dos sesquiterpenos (Stoessl, 1982; Kuc e Rush, 1985; Brindle *et al.*, 1988). Por outro lado, Henfling *et al.* (1980) verificaram que, em secções de batata, elicidadas com *P. infestans*, os níveis de lubimina eram, na presença de farnesol, vinte e sete vezes superiores aos registados na sua ausência. Assim, a menor acumulação da lubimina e da 10-*epilubimina* verificada nas culturas de *H. albus* pode dever-se, essencialmente, à elevada fitotoxicidade do farnesol. Esta hipótese é apoiada pelos baixos teores de lubimina e 10-*epilubimina* detectados nas culturas em que a adição de farnesol foi efectuada aquando da repicagem e elicidadas ao fim de 48 h. Diversos mono- e sesquiterpenos produzidos ou adicionados a culturas de células têm revelado grande toxicidade (Charlwood e Brown, 1988; Fowler e Stafford, 1992).

IV. RESUMO E CONCLUSÕES

A resistência das plantas à doença envolve mecanismos diversos e complexos que vão desde a formação de calose e lenhina até à produção de fitoalexinas, metabolitos de stress de baixo peso molecular, com largo espectro antibiótico.

As culturas de células vegetais têm sido consideradas como fontes potenciais para a obtenção de metabolitos com interesse, constituindo, ainda, sistemas úteis para estudar os processos de elicitação além das reacções bioquímicas envolvidas na biosíntese das fitoalexinas. A utilização de elicitadores aliada à selecção de linhas altamente produtoras e manipulação das condições de cultura têm sido estratégias seguidas na tentativa de produzir compostos que dificilmente seriam obtidos por síntese química ou fermentação microbiológica.

A acumulação de metabolitos de stress sesquiterpenóides por culturas de células de Solanaceae tem sido intensamente investigada. Vários sesquiterpenos oxigenados têm sido isolados a partir de culturas de células elicidadas, quer de batata, quer de tabaco, quer ainda de pimentão. Tais compostos, nomeadamente o noreudesmano rishitina, o vetispirano lubimina, *seco*-eudesmano fituberol e fituberina e o eremofilano capsidiol, foram também isolados de plantas pertencentes às Solanaceae e a sua presença correlacionada com mecanismos de defesa a agentes patogénicos.

Neste capítulo, consideraram-se as seguintes áreas de estudo:

1) Obtenção e caracterização das condições de crescimento das culturas de células em suspensão de *H. albus* e 2) Influência da idade da cultura, da concentração e tempo de incubação com elicitador biótico e da adição de precursores na acumulação dos metabolitos secundários de stress em culturas de células em suspensão de *H. albus*.

1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *H. ALBUS*

Os *calli* friáveis foram obtidos a partir da desdiferenciação de segmentos de hipocótilos de *H. albus* em meio MS sólido, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin ou 1 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. Estes *calli* foram utilizados na obtenção de culturas de células em suspensão em meio MS líquido, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin. Nas culturas de células em suspensão testaram-se a concentração de inóculo, a concentração de sacarose e suplementação hormonal mais eficazes para o crescimento celular. Nestes estudos, os registos só foram efectuados depois de estabilizar as culturas, nas novas condições, durante pelo menos 3-4 repicagens. A concentração de inóculo que indu-

ziu melhor crescimento foi 2,5 g (p. f.)/50 ml. Concentrações muito baixas (10 g/l) ou muito altas (80 g/l) de sacarose determinaram menor crescimento, tendo-se registado tempos de duplicação de 62 e 60 h, respectivamente, em contraste com as culturas suplementadas com 40 g/l de sacarose, onde se registaram tempos de duplicação de 48 h. De entre as duas auxinas ensaiadas (2,4-D e NAA) só o 2,4-D permitiu manter a viabilidade e o crescimento celulares das culturas de células em suspensão de *H. albus*.

Nas culturas de células em suspensão, mantidas em meio MS, suplementado com 20 g/l de sacarose, 0,5 mg/l 2,4-D e 1 mg/l Kin procedeu-se ao estudo da mobilização de amónio, nitrato e hidratos de carbono do meio de cultura, durante o ciclo de crescimento celular.

O amónio do meio de cultura foi consumido intensamente desde a inoculação até ao início da fase estacionária de crescimento. Em relação ao nitrato, a sua concentração no meio de cultura manteve-se praticamente constante até ao início da fase estacionária. A partir daí, decaiu abruptamente, o que coincidiu com o atingir dos níveis mais baixos de amónio. Nestas culturas não se verificou a depleção total do amónio e do nitrato do meio de cultura, mesmo em fase estacionária tardia.

A sacarose do meio de cultura, das células em suspensão de *H. albus*, foi hidrolisada em glucose e frutose, desaparecendo quase totalmente, ao fim de 10 dias. Estas culturas pareceram revelar alguma preferência pela glucose porquanto foi consumida primeiro do que a frutose. O consumo rápido da frutose verificou-se quando, praticamente, não existia glucose no meio. A exaustão dos hidratos de carbono do meio de cultura coincidiu com o atingir da fase estacionária de crescimento.

2. INFLUÊNCIA DA IDADE DA CULTURA, DA CONCENTRAÇÃO DE ELICITADOR E DA ADIÇÃO DE PRECURSORES NA ACUMULAÇÃO DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DE STRESS

Os metabolitos de stress (lubimina, 10-*epilubimina*, rishitina e solavetivona) produzidos pelas culturas de células em suspensão de *H. albus*, foram identificadas por cromatografia gás-líquido acoplado a espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear de protão, ultravioleta e testes cromogénicos. Os tempos de retenção e os espectros de massa foram comparados com os de amostras autênticas.

As acetofenonas, presentes nos extractos, foram caracterizadas por cromatografia gás-líquido acoplado a espectrometria de massa e os espectros de massa obtidos comparados com os descritos na literatura.

As culturas de células em suspensão de *H. albus* em início de fase estacionária, tratadas com diversos elicitadores apresentaram resposta diversa. Quer o micélio au-

toclavado e liofilizado de *Phytophthora cinnamomi*, quer as células autoclavadas e liofilizadas de *Candida albicans* levaram à acumulação de lubimina e 10-epilubimina, como principais metabolitos de stress, além de pequenas quantidades de solavetivona e rishitina. Estes compostos acumularam-se, fundamentalmente, no meio de cultura. A celulase, um outro elicitador utilizado em ensaios preliminares, não induziu a acumulação de qualquer dos metabolitos referidos.

A acumulação da lubimina, 10-epilubimina, solavetivona e rishitina foi fortemente influenciada pelo estágio de crescimento das culturas, pelo tempo de incubação e concentração de elicitador. Os teores mais elevados de lubimina e 10-epilubimina foram registados em culturas inoculadas dois dias após a repicagem e incubadas durante 48 h com células autoclavadas e liofilizadas de *Candida albicans*. Em contraste, os níveis mais baixos foram detectados em culturas com 8-14 dias de subcultura. Os níveis de ambos os compostos decresceram, ainda, substancialmente com tempos de incubação prolongados. Nas culturas elicitadas ao 6^o - 14^o dias após a repicagem, a quantidade de lubimina e 10-epilubimina começou a decrescer ao fim de 24 h de incubação, enquanto, nas restantes culturas, tal só se verificou ao fim de 48 ou 96 h. Estes resultados podem revelar uma biotransformação destes compostos em metabolitos geralmente menos tóxicos.

Nas culturas elicitadas aquando da repicagem ou ao 2^o, 4^o e 14^o dias detectaram-se ainda, pequenas quantidades de solavetivona e rishitina, 96 h após a incubação. Já nas culturas elicitadas ao 16^o e 18^o dias ambos os compostos foram detectados logo ao fim de 48 h de incubação. De realçar que, as culturas tratadas ao 6^o, 8^o ou 10^o dias não acumularam solavetivona e rishitina, qualquer que fosse o tempo de incubação (0, 12, 24, 48, 96 ou 192 h).

As culturas elicitadas ao décimo dia após a repicagem acumularam acetovanilona e acetosiringona. Estes compostos apareceram também nas culturas inoculadas na altura da repicagem, após 24 h de incubação. Além destas acetofenonas, detectou-se, também, nas culturas elicitadas ao 14^o-18^o dias, a hidroxiaacetosiringona. Qualquer das três acetofenonas foi detectada nas culturas não elicitadas, com 14-18 dias. Os teores da acetovanilona, acetosiringona e hidroxiaacetosiringona foram, geralmente mais elevados nas culturas não elicitadas, atingindo valores da ordem de 49, 167 e 270 µg/100 ml, respectivamente.

A concentração de elicitador, que induziu maior acumulação da lubimina e 10-epilubimina foi 0,4 mg de células autoclavadas e liofilizadas de *C. albicans*/ml de cultura de células em suspensão de *H. albus*. Na acumulação da 10-epilubimina foram encontradas duas concentrações óptimas (0,4 e 3 mg/ml).

A adição de acetato de sódio e farnesol, às culturas de células em suspensão de *H. albus*, tratadas com *C. albicans*, dois precursores de compostos sesquiterpénicos,

não permitiu obter maior acumulação da lubimina e 10-*epi*lubimina. Pelo contrário, a concentração de farnesol (25 μ l/50 ml) utilizada reduziu a viabilidade celular e induziu menor acumulação daqueles compostos.

IV. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Plant disease resistance involves different and complex mechanisms such as callose formation, lignification and phytoalexin production. Phytoalexins are a diverse group of stress secondary metabolites of low molecular weight with a broad antibiotic activity.

Plant cell cultures have been regarded as potential sources for useful secondary metabolites and proved to be useful systems for studies on elicitation process and on biochemical reactions involved in phytoalexin biosynthesis. This method along with the selection of high yielding strains and manipulation of culture conditions have been used in an attempt to obtain those compounds hardly produced by chemical synthesis and / or microbiological fermentation.

Accumulation of sesquiterpenoid stress metabolites in cell cultures from members of the Solanaceae has been investigated. Several oxygen-containing sesquiterpenoids have been isolated from elicitor-induced potato, tobacco or pepper cell cultures. Such compounds, namely the noreudesmane rishitin, the vetispirane lubimin, the *seco*-eudesmanes phytuberol and phytuberin and the eremophilene capsidiol, were also isolated from plants within the Solanaceae and their presence correlated with the defence mechanisms to the pathogen agents.

In this chapter, the following topics considered were:

1) Establishment and characterisation of cell growth pattern of suspension cultures of *Hyoscyamus albus* and 2) Influence of the cell growth stage, the incubation time with the elicitor, elicitor concentration and the addition of precursors on the accumulation of stress secondary metabolites.

1. OBTAINMENT AND CHARACTERISATION OF THE GROWTH CONDITIONS OF CELL SUSPENSION CULTURES OF *H. ALBUS*

Friable calli were obtained from dedifferentiated hypocotils of *H. albus* in MS basal medium, supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin or 1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin. These calli were used for establishment of cell suspension cultures in MS liquid medium, supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin.

The cell growth was followed by the dissimilation method in cultures maintained in MS basal medium assayed for different inoculum densities, sucrose concentration and hormonal regulation. The assays were performed with cultures previously stabilised in the new conditions for at least, 3-4 subcultures. The best growth was attained with an inoculum concentration of 2.5 g/l (f. w.) / 50 ml. Low (10 g/l) or high sucrose concentrations (80 g/l) were responsible for the worst growth, with

doubling times of 62 and 60 h, respectively, in contrast to cultures supplemented with 40 g/l sucrose, that showed 48 h doubling time. Of the auxin tested, only 2,4-D sustained cell growth and viability.

Cell suspension cultures of *H. albus* maintained in MS basal medium, supplemented with 20 g/l sucrose, 0.5 mg/l 2,4-D and 1 mg/l Kin were used to perform the study on the ammonium, nitrate and carbohydrates mobilisation from the culture medium, during the cell growth cycle.

Ammonium was constant and rapidly consumed from the culture medium soon after the inoculation until the early stationary phase. Nitrate concentration remained almost constant until the early stationary phase. By this time, a deep decrease was observed, that was coincident with the lower levels of ammonium in the medium. Both nutrients were not completely depleted from the culture medium, even in the late stationary phase.

Sucrose of the culture medium, was hydrolysed into glucose and fructose, and its concentration was negligible after ten days of subculture. In these cultures, glucose was the first monosaccharide to be mobilised. A rapid consumption of fructose was observed only when low levels of glucose were present in the medium. The carbohydrate exhaustion from the medium was coincident with the beginning of the stationary phase.

2. INFLUENCE OF THE CELL GROWTH STAGE, THE INCUBATION TIME WITH THE ELICITOR, ELICITOR CONCENTRATION AND THE ADDITION OF PRECURSORS ON THE ACCUMULATION OF STRESS SECONDARY METABOLITES

The stress metabolites lubimin, 10-*epilubimin*, rishitin and solavetivone accumulated in cell suspension cultures of *H. albus* were identified by GC-MS, ¹H-NMR, UV and chromogenic tests. Retention times and mass spectra of the compounds present in the extracts were compared with those of authentic samples.

Acetophenones were only characterised by GC-MS and the mass spectra were compared with those reported in the literature or with the corresponding reference compounds when available.

Cell cultures of *H. albus* in early stationary phase showed a differential response to elicitor treatment. Either freeze dried *Phytophthora cinnamomi* autoclaved mycelium or freeze dried *Candida albicans* autoclaved cells induced the accumulation of lubimin and 10-*epilubimin* as main stress metabolites along with small amounts of solavetivone and rishitin. Both compounds mainly accumulated in the culture medium. Cellulase, another elicitor used in preliminary assays, does not induce accumulation of any of the reported metabolites.

The accumulation of lubimin, 10-*epilubimin*, solavetivone and rishitin was influenced by the cell growth stage, incubation time and elicitor concentration. The higher accumulation of lubimin and 10-*epilubimin* was recorded two days after subculturing and after incubation for 48 hr with freeze dried *Candida albicans* autoclaved cells. In contrast, the lower accumulation of these compounds occurred in 8-14-day-old-cultures. The levels of both compounds decreased markedly with prolonged incubation. In elicitor-treated 6-14-day-old cultures, the amount of lubimin and 10-*epilubimin* started declining 24 hr after incubation while in all the other cultures, such decline was only observed 48 or 96 hr after incubation. These results suggest a biotransformation of such compounds into less toxic metabolites.

In this work, 0-, 2-, 4- and 14-day-old cultures also accumulated small amounts of solavetivone and rishitin, 96 hr after incubation with freeze dried *C. albicans* autoclaved cells, while 16-, and 18-day-old cultures accumulated both compounds earlier (48 hr after incubation). It is noteworthy that 6-, 8- and 10-day-old cultures did not accumulate solavetivone and rishitin in any assayed incubation time (0, 6, 12, 24, 48, 96 and 192 hr).

Cell cultures elicited on the 10th day after subculturing accumulated acetovanillone and acetosiryngone. These compounds also appeared in cultures inoculated at the time of subculturing and incubated for 24 hr with freeze dried *C. albicans* autoclaved cells. In addition to acetophenones, hydroxyacetosiryngone was also detected in 14-18-day-old elicitor-treated cultures. All the acetophenones reported above were also detected in the extracts from 14-18-day-old untreated cultures. The levels of acetovanillone, acetosiryngone and hydroxyacetosiryngone were, in general, higher in untreated cultures than in elicitor-treated ones, attaining values up to 49, 167 and 270 $\mu\text{g}/100$ ml cell culture, respectively.

In elicitor-treated cells of *H. albus*, maximum lubimin accumulation occurred with 0.4 mg *C. albicans* autoclaved cells/ml suspension culture. For 10-*epilubimin* two optima values (0.4 mg/ml and 3 mg/ml) were found.

The addition of sodium acetate and farnesol, two precursors of sesquiterpenoid metabolites, to the 2-day-old cultures of *H. albus* incubated for 48 hr with freeze dried *C. albicans* autoclaved cells, did not allow an increase in lubimin and 10-*epilubimin* accumulation. On the contrary, the farnesol concentration used (25 $\mu\text{l}/50$ ml) reduced the cell viability and the accumulation of both compounds.

D. Perspectivas futuras

As plantas possuem mecanismos sofisticados de defesa contra microrganismos, sintetizando *de novo* para tal, compostos com actividade antimicrobiana, a que se deu o nome de fitoalexinas. Estes compostos têm-se revelado, no entanto, menos eficazes do que os fungicidas sintéticos e a sua actividade restringe-se ao local da infecção. Por estas razões, as fitoalexinas não têm sido, até hoje, aplicadas nas Indústrias Farmacêutica ou na Agricultura. Estes factores não devem constituir, no entanto, um entrave ao prosseguimento do estudo das reacções bioquímicas envolvidas na sua formação.

As culturas de células vegetais em suspensão, ao revelarem-se sistemas pouco complexos, têm vindo a ser utilizadas em diversos estudos de natureza bioquímica e de Biologia Molecular, nomeadamente no esclarecimento das vias biossintéticas de vários metabolitos secundários, nos quais se incluem as fitoalexinas. Embora no presente trabalho se tenham atingido os objectivos inicialmente propostos, importará esclarecer no futuro alguns pontos que ficaram em aberto. Assim:

1) Nas culturas de células em suspensão de *O. natrix*, importa esclarecer qual ou quais os factores que levam a uma maior acumulação da medicarpina e da maackiaina, relativamente à planta na Natureza. A serem factores de stress, inerentes ao meio de cultura, há que identificá-los, bem como aos factores que levam a que, nuns casos, a acumulação dos pterocarpanos se verifique essencialmente em fase estacionária adiantada (ao fim de 30 dias, por exemplo) e noutros, seja ao longo de todo o crescimento das culturas, sem que isso afecte o crescimento celular.

2) Determinar qual ou quais os factores que levam a que as células em determinadas circunstâncias sintetizem preferencialmente fenóis da parede celular, em detrimento da síntese dos pterocarpanos. O esclarecimento de algumas destas questões pode passar pelo estudo simultâneo da acumulação dos pterocarpanos e da actividade das enzimas dos metabolismos primário e secundário, mais de perto envolvidas na síntese destes compostos.

3) Nas culturas de células em suspensão de *Hyoscyamus albus*, importa esclarecer o que determina a acumulação das acetofenonas, em apenas algumas culturas, elicitadas ou não.

4) Estudar a acumulação dos metabolitos de stress lubimina, 10-*epilubimina*, so-lavetivona e rishitina em condições nutricionais e hormonais diversas.

5) Estudar a acumulação dos metabolitos de stress na presença de concentrações diversas de precursores, nomeadamente de farnesilpirofosfato.

E. Bibliografia

- Aitchison, P. A.; A. J. MacLeod; M. M. Yeoman (1977) Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: *Plant Tissue and cell Culture. Botanical Monographs*, Vol. 11 (ed. H. E. Street), Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Melbourne.
- Amorim, H. V.; D. K. Dougall; W. R. Sharp (1977) The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul's Scarlet Rose cells grown in tissue culture, *Physiol. Plant.*, **39**: 91-95.
- Ampomah, Y. A.; J. Friend (1988) Insoluble phenolic compounds and resistance of potato tuber disc to *Phytophthora* and *Phoma*, *Phytochemistry*, **27**: 2533-2541.
- Anosike, E. O.; P. C. Ojimetukwe (1982) Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from Cocoyam, *Xanthosoma sagittifolium*, *J. Exp. Bot.*, **33**: 487-494.
- Apostol, I.; P. S. Low; P. Heinstejn (1989) Effect of age of cell suspension cultures on susceptibility to a fungal elicitor, *Plant Cell Rep.*, **7**: 692-695.
- Arfmann, H. A.; W. Kohl; V. Wray (1985) Effect of 5-azacytidine on the formation of secondary metabolites in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures, *Z. Naturforsch.*, **40c**: 21-25.
- Augé, R. (1982) Les phénomènes physiologiques liés à la réalisation des cultures *in vitro*. In: *La Culture in vitro et ses Applications Horticoles* (eds. R. Augé, G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, R. Minies, J. C. Morand, Y. Oudin, H. Vidalle), Technique et Documentation, Lavoisier Paris.
- Bailey, J. E.; D. F. Ollis (1977) *Biochemical engineering fundamentals*, (eds. J. E. Bailey e D. F. Ollis) McGraw-Hill Book Company.
- Bailey, J. A. (1982) Mechanisms of phytoalexins accumulation. In: *Phytoalexins*, (eds. J. A. Bailey e J. W. Mansfield), Blackie Glasgow London.
- Banthorpe, D. V.; S. A. Branch; V. C. O. Njar; M. G. Osborne; D. G. Watson (1986) Ability of plant callus cultures to synthesize and accumulate lower terpenoids, *Phytochemistry*, **25**: 629-636.
- Banthorpe, D. V. (1988) Monoterpenes and sesquiterpenes. In: *Cell Culture and Somatic Cell genetics of Plants* (eds. F. Constabel, I. Vasil), Academic Press.
- Barz, W.; B. E. Ellis (1981) Potencial of plant cell cultures for pharmaceutical production. In: *Natural Products as Medicinal Agents*, Supl. da *Planta Med.* e *Lloydia*. Hippokrates Verlag.
- Barz, W.; S. Daniel; W. Hinderer; U. Jaques; H. Kessmann; J. Koster; C. Otto; K. Tiemann (1988a) Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures. In: *Applications of plant cell and tissue culture*, (ed. Y. Yamada) CIBA Foundation Symposium 137, John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore.

- Barz, W.; S. Daniel; W. Hinderer; U. Jaques; H. Kessmann; J. Koster; K. Tiemann (1988b) Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures. In: *Plant Cell Biotechnology*, (ed. M. S. S. Pais), Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Barz, W.; W. Bless; S. Daniel; W. Gunia; W. Hinderer; U. Jaques; H. Kessmann; D. Meier; K. Tiemann; U. Wittkamp (1989) Elicitation and suppression of isoflavones and pterocarpan phytoalexins in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong.
- Battat, E.; J. S. Roken; I. Goldberg (1989) Growth of *Dioscorea deltoidea* at high sugar concentrations, *Plant Cell Rep.*, **7**: 652-654.
- Bayley, J. M.; J. King; O. L. Gamborg (1972) The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures, *Planta*, **105**: 15-24.
- Behrend, J.; R. I. Mateles (1975) Nitrogen in plant cell suspension cultures. II. Effect of amino acids on growth, *Plant Physiol.*, **56**: 584-589.
- Behrend, J.; R. I. Mateles (1976) Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on ammonia, *Plant Physiol.*, **58**: 510-512.
- Beiderbeck, B.; B. Knoop (1987) Two-phase culture. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Berger, R. G.; Z. Akkan; F. Drawert (1990) The essential oil of *Coleonema album* (Rutaceae) and a photomixotrophic cell culture derived thereof, *Z. Naturforsch.*, **45**: 187-195.
- Berlin, J.; L. Witte; W. Schubert; V. Wray (1984) Determination and quantification of monoterpenoids secreted into the medium of cell cultures of *Thuja occidentalis*, *Phytochemistry*, **23**: 1277-1279.
- Berlin, J. (1988) Formation of secondary metabolites in cultured plant cells and its impact on pharmacy. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, (ed. Y. P. S. Bajaj), Vol. 4, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Berlin, J.; B. Martin; J. Nowak (1989) Effects of permeabilization on the biotransformation of phenylalanine by immobilized tobacco cell cultures, *Z. Naturforsch.*, **44**: 249-254.
- Bianchini, F.; F. Corbetta (1978) *Atlas des Plantes Médicinales*, (ed. A. Mondadori).
- Bisson, W.; R. Beiderbeck; J. Reichling (1983) Die produktion ätherischer öle durch zellsuspensionen der kamille in einem zweiphasensystem, *Phytochemistry*, **47**: 164-168.
- Blein, J. P.; M. L. Milat; P. Ricci (1991) Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*, *Plant Physiol.*, **95**: 486-491.

- Bless, W.; W. Barz (1988) Isolation of pterocarpan synthase, the terminal enzyme of pterocarpan phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Cicer arietinum*, *FEBS Letters*, **235**: 47-50.
- Bohm, H. (1980) Formation of secondary metabolites. In: *International Review of Cytology*, suplemento 11B, Academic Press.
- Borg-Olivier, O.; B. Monties (1993) Lignin, suberin, phenolic acids and tyramine in the suberized, wound-induced potato periderm, *Phytochemistry*, **32**: 601-606.
- Borkowska, B.; J. Szczerba (1991) Influence of different sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures, *J. Exp. Bot.*, **42**: 911-915.
- Bostock, R. M.; J. A. Kuc; A. Laine (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato, *Science*, **212**: 67-69.
- Brindle, P. A.; P.J. Kuhn; D. R. Threlfall (1983) Accumulation of phytoalexins in potato-cell suspension cultures, *Phytochemistry*, **22**: 2719-2721.
- Brindle, P. A.; T. Coolbear; P. J. Kuhn; D. R. Threlfall (1985) An $^{18}\text{O}_2$ study of the biosynthesis and metabolism of rishitin, *Phytochemistry*, **24**: 1219-1222.
- Brindle, P. A.; P. J. Kuhn; D. R. Threlfall (1988) Biosynthesis and metabolism of sesquiterpenoid phytoalexins and triterpenoids in potato cell suspension cultures, *Phytochemistry*, **27**: 133-150.
- Brink, A. J.; G. . H. Rall; J. P. Engelbrecht (1974) Structures of some minor pterocarpan of *Neorautanenia edulis*, *Phytochemistry*, **13**: 1581.
- Brodelius, P. (1984) Immobilization of cultured plant cells and protoplasts. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Laboratory procedures and their applications*, (ed. I. K. Vasil), Vol. I, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- Brodelius, P. (1986) Immobilized plant cells and protoplasts. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, (eds. D. A. Evans, W. R. Sharp e P. V. Ammirato), Vol. 4, Macmillan Publishing Company New York.
- Brodelius, P. (1988) Stress induced secondary metabolism in plant cell cultures. In: *Plant Cell Biotechnology*, (ed. M. S. S. Pais), Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Brooks, C. J. W.; D. G. Watson; D. S. Rycroft; I. M. Freer (1987) The biosynthesis of sesquiterpenoid phytoalexins in suspended callus cultures of *Nicotiana tabacum*, *Phytochemistry*, **26**: 2243-2245.
- Brown, H. C.; H. M. Hess (1969) Selective reductions. XIII- The reaction of Δ^2 -cyclopentenones with representative complex hydrides. Aluminum hydride as a selective reagent for the reduction of the carbonyl group in Δ^2 -cyclopentenones, *J. Org. Chem.*, **34**: 2206-2209.
- Brown, J. T.; B. V. Charlwood (1986) The accumulation of essential oils by tissue cultures of *Pelargonium fragrans* Willd., *FEBS*, **204**: 117-120.

- Burden, R. S.; J. A. Bailey; G. G. Vincent (1974) Metabolism of phaseollin by *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phytochemistry*, **13**: 1789-1791.
- Burden, R. S.; J. A. Bailey (1975) Structure of the phytoalexin from soybean, *Phytochemistry*, **14**: 1389-1390.
- Butcher, D. N. (1977) Secondary products in tissue cultures. In: *Applied and Fundamental Aspects of plant Cell, Tissue and Organ Culture*, (eds. J. Reinert e Y. P. S. Bajaj) Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Carceller, M.; M. Davey; M. Fowler; H. Street (1971) The influence of sucrose, 2,4-D and Kinetin on the growth, fine structure and lignin content of cultured sycamore cells, *Protoplasma*, **73**: 367-385.
- Carew, D. P.; E. J. Staba (1965) Plant tissue culture: its fundamentals application and relationship to medicinal plant studies, *Lloydia*, **28**: 1-26.
- Chappell, J.; R. Nable (1987) Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor, *Plant Physiol.*, **85**: 469-473.
- Charlwood, B. V.; J. T. Brown (1988) Transport and storage of secondary metabolites in tissue-cultured plant cells, *Biochem. Soc. Trans.*, **16**: 61-63.
- Charlwood, B. V.; J. T. Brown; C. Moustou; G. S. Morris; K. A. Charlwood (1988) The accumulation of isoprenoid flavour compounds in plant cell cultures, *Bioflavour '87*, (ed. P. Schreier), Walter de Gruyter Berlin.
- Charlwood, B. V.; C. Moustou; J. T. Brown; P. K. Hegarty; K. A. Charlwood (1989) The regulation of accumulation of lower isoprenoids in plant cell cultures. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Cheng, J.; V. Raghavan (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Hyoscyamus niger*, *Amer. J. Bot.*, **72**: 580-587.
- Cline, K.; M. Wade; P. Albersheim (1978) Host-pathogen interactions. XV. Fungal glucans which elicit phytoalexin accumulation in soybean also elicit the accumulation of phytoalexins in other plants, *Plant Physiol.*, **62**: 918-921.
- Collin, H. A.; M. Watts (1983) Flavour production in culture, *Handbook of Plant Cell Culture*, (eds. D. A. Evans; W. R. Sharp; P. V. Ammirato; Y. Yamada), Macmillan Publishing Co, New York.
- Constabel, F. (1987) Cell culture in phytochemistry. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Constabel, F. (1989) Elicitors in *in vitro*. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Constabel, F. (1990) Medicinal plant biotechnology, *Planta Med.*, **56**: 421-425.

- Cook, J. T.; W. D. Ollis; I. O. Sutherland; O. R. Gottlieb (1978) Pterocarpan from *Dalbergia spruceana*, *Phytochemistry*, **17**: 1419-1422.
- Coolbear, T.; D. R. Threlfall (1985) The biosynthesis of lubimin from [1-14C] isopentenyl pyrophosphate by cell-free extracts of potato tuber tissue inoculated with an elicitor preparation from *Phytophthora infestans*, *Phytochemistry*, **24**: 1963-1971.
- Corduan, G.; E. Reinhard (1972) Synthesis of volatile oils in tissue cultures of *Ruta graveolens*, *Phytochemistry*, **11**: 917-922.
- Cormier, F.; C. B. Do (1988) Selection of monoterpene producing *Mentha piperita* cell lines, *Bioflavour '87*, (ed. P. Schreier), Walter de Gruyter Berlin.
- Cormier, F.; H. A. Crevier; C. B. Do (1990) Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension, *Can. J. Bot.*, **68**: 1822-1825.
- Coxon, D. T.; K. R. Price; B. Howard; S. F. Osman; E. B. Kalan; R. M. Zacharius (1974) Two new vetispirane derivatives: stress metabolites from potato (*Solanum tuberosum*) tubers, *Tetrahedron Lett.*, **34**: 2921-2924.
- Cresswell, R. C.; M. W. Fowler, A. Stafford; G. Stepan-Sarkissian (1989) Inputs and outputs: primary and secondary metabolism. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Daie, J.; C. K. Chin; L. Pitcher (1987) Differential rate of sucrose and hexose transport by asparagus cell cultures, *Plant Sci.*, **53**: 101-107.
- Daniel, S.; W. Hinderer; W. Barz (1988) Elicitor-induced changes of enzyme activities related to isoflavone and pterocarpan accumulation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures, *Z. Naturforsch.*, **43c**: 536-544.
- Daniel, S.; K. Tiemann; U. Wittkamp; W. Bless; W. Hinderer; W. Barz (1990) Elicitor-induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*, *Planta*, **182**: 270-278.
- Darvill, A. G.; P. Albersheim (1984) Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **35**: 243-312.
- Davies, M. E. (1972) Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet Rose, *Planta*, **104**: 50-65.
- Davis, D.; J. Merida; L. Legendre; P. S. Low; P. Heinsteint (1993) Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells, *Phytochemistry*, **23**: 607-611.
- De-Eknamkul, W.; B. E. Ellis (1985a) Effects of auxins and cytokinins on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*, *Plant Cell Rep.*, **4**: 50-53.

- De-Eknamkul, W.; B. E. Ellis (1985b) Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*, *Plant Cell Rep.*, **4**: 46-49.
- Delaveau, P. (1982) *Histoire et renouveau des Plantes Medicinales*, (ed. Sciences d'Aujourd'hui / Albin Michel).
- Deus, B.; M. H. Zenk (1982) Exploitation of plant cells for the production of natural compounds, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 1965-1974.
- Deverall, B. J. (1982) Introduction. In: *Phytoalexins*, (eds. J. A. Bailey e J. W. Mansfield), Blackie Glasgow London.
- Dewick, P. M. (1991) The biosynthesis of shikimate metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, **8**: 149-170.
- Dhoot, G. K.; G. G. Henshaw (1977) Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Hyoscyamus niger*, *Ann. Bot.*, **41**: 943-949.
- Dixon, R. A. (1980) Plant tissue culture methods in the study of phytoalexin induction. In: *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, (eds. D. S. Ingram e J. P. Helgeson), Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Boston Melbourne.
- Dixon, R. A.; P. M. Dey; D. L. Murphy; I. M. Whitehead (1981) Dose responses for *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-mediated enzyme induction in French bean cell suspension cultures, *Planta*, **151**: 272-280.
- Dixon, R. A. (1985) Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: *Plant Cell Culture. A Practical Approach* (ed. R. A. Dixon), IRL Press.
- Do, C. B.; F. Cormier (1991) Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension, *Plant Cell Rep.*, **9**: 500-504.
- Dougall, D. K. (1980) The use of tissue cultures in studies of metabolism. In: *The Biochemistry of Plants*, Vol. 2, (ed. D. D. Davies), Academic Press.
- Dougall, D. K. (1985) Chemicals from plant cell cultures. In: *Biotechnology in Plant Science, Relevance of Agriculture in the Eighties*, (eds. M. Zaitlin, P. Day e A. Hollander), Academic Press Orlando.
- Dougall, D. K. (1987) Cell cloning and the selection of high yielding strains. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Dudits, D. (1987) New approaches to genetic manipulation of plants. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Ebel, J. ; E. G. Cosio; D. Grab; H. Haberer (1989) Stimulation of phytoalexins accumulation in fungus-infected roots and elicitor-treated cell cultures of soybean

- (*Glycine max* L.). In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong.
- Edwards, R.; J. W. Blount; R. A. Dixon (1991) Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures, *Planta*, **184**: 403-409.
- Eilert, U. (1987) Elicitation: methodology and aspects of application. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Einstein, P. F. (1985) Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures, *J. Nat. Prod.*, **48**: 1-9.
- Ellis, J. S.; A. C. Jennings; L. A. Edwards; M. Mavandad; C. J. Lamb; R. A. Dixon (1989) Defense gene expression in elicitor-treated cell suspension cultures of french bean cv. *Imuna*, *Plant Cell Rep.*, **8**: 504-507.
- Elmore, H. W.; B. Samples; S. Sharma; M. Harrison (1990) Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **20**: 131-135.
- Enzell, C. R.; I. Wahlberg (1980) Terpenes and terpenoids. In: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Suppl. Vol.*, (eds. G. R. Waller e O. C. Dermer), Wiley.
- Ernst, D.; D. Oesterhelt; W. Schafer (1984) Endogenous cytokinins during embryogenesis in an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.), *Planta*, **161**: 240-245.
- Essman, E. J. (1984) The medicinal uses of herbs, *Fitoterapia*, **55**: 279-289.
- Everett, N. P.; H. E. Street (1979) Studies on the growth in culture of plant cells. XXIV- Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and light on the growth and metabolism of *Acer pseudoplatanus* L. suspension cultures, *J. Exp. Bot.*, **30**: 409-417.
- Ewing, D. F.; I. M. Whitehead; A. Atkinson; D. R. Threlfall (1990) ¹H NMR study of the stereochemistry of lubimin and related vetispirane sesquiterpenoids, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**: 343-348.
- Farmer, E. E.; J. P. Helgeson (1987) An extracellular protein from *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* is associated with stress metabolite accumulation in tobacco callus, *Plant Physiol.*, **85**: 733-740.
- Feliciano, A. S.; A. F. Barrero; M. Medarde; J. M. M Coral; M. V. Calle (1983) An isocoumarin and other phenolic components of *Ononis natrix*, *Phytochemistry*, **22**: 2031-2033.
- Fevereiro, P. (1991) Produção de proteases e metabolitos secundários em culturas de células em suspensão de *Silybum marianum* Gaerth., *Tese de Doutorado*, Faculdade de Ciências de Lisboa.

- Figueiredo, A. C.; P. Fevereiro; J. Cabral; J. Novais; M. S. Pais (1987) Callus and cell suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus* (Compositae), *Biotechnol. Lett.*, **9**: 213-218.
- Figueiredo, A. C. (1987) Cultura de células de *Cynara cardunculus*: produção de biomassa e obtenção de proteases, *Tese de Mestrado*, Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Figueiredo, A. C.; M. S. Pais (1991) *Achillea millefolium* (yarrow) cell suspension cultures: establishment and growth conditions, *Biotechnol. Lett.*, **13**: 63-68.
- Figueiredo, A. C. S. (1992) *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*. Produção de metabolitos secundários *in vivo* e *in vitro*, *Tese de Doutoramento*, Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Font Quer, P. (1981) *Plantas Medicinales El Dioscórides Renovado*, Editorial Labor, S. A.
- Fontanel, A.; M. Tabata (1987) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects. In: *Nestlé Research News*, Nestec LTD, Vevey Switzerland.
- Fowler, M. W.; R. Watson; I. Lyons (1982) Substrate utilization, carbon and nitrogen, by suspension cultured plant cells. In: *Plant Tissue Culture*, Proc. Int. Congr. Plant Tissue Cult. (ed. A. J. Fjiwara), Tokyo.
- Fowler, M. W. (1983) Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. In: *Plant Biotechnology*, (eds. S. H. Mantell e H. Smith), Cambridge University Press, London New York.
- Fowler, M. W. (1986) Process strategies for plant cell cultures, *Trends Biotechnol.*, **4**: 214-219.
- Fowler, M. W. (1988) Problems in commercial exploitation of plant cell cultures. In: *Applications of Plant Cell and Tissue Culture*, (Ciba Foundation Symposium, 137), John Wiley & Sons Ltd., Chichester New York Brisbane Toronto Singapore.
- Fowler, M. W.; A. H. Scragg (1988) Natural products from higher plant cell culture. In: *Plant Cell Biotechnology*, (ed. M. S. S. Pais), Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Fowler, M. W.; A. M. Stafford (1992) Plant cell culture, process systems and product synthesis. In: *Plant Biotechnology. Comprehensive Biotechnology*, (Second supplement), (eds. M. W. Fowler, G. C. Warren e M. Moo-Young), Pergamon Press Oxford Tokyo.
- Franco, J. A. (1984) *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*, Vol. I e II, Lisboa.
- Fujita, Y.; H. Yasuhiro; T. Ogino; C. Suga (1981a) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*, *Plant Cell Rep.*, **1**: 59-60.
- Fujita, Y.; Y. Hara; C. Suga; T. Morimoto (1981b) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives, *Plant Cell Rep.*, **1**: 61-63.

- Funk, C.; K. Gugler; P. Brodelius (1987) Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor), *Phytochemistry*, **26**: 401-405.
- Funk, C.; P. Brodelius (1990) Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*, *Phytochemistry*, **29**: 845-848.
- Gamborg, O. L.; R. A. Miller; K. Ojima (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean cells, *Exp. Cell Res.*, **50**: 151-158.
- Gamborg, O. L.; J. P. Shyluk (1970) The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source, *Plant Physiol.*, **45**: 598-600.
- Gamborg, O. L. (1982) Callus and cell culture. In: *Plant Tissue Culture methods* (eds. L. Wetter e F. Constabel), National research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory.
- Gautheret, R. J. (1955) The nutrition of plant tissue cultures, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **6**: 433-484.
- Goldner, W.; M. Thom; A. Maretzki (1991) Sucrose metabolism in sugarcane cell suspension cultures, *Plant Sci.*, **73**: 143-147.
- Goodwin, M. (1983) *Introduction to Plant Biochemistry*, Pergamon Press.
- Grey, D.; G. Stepan-Sarkissian; M. Fowler (1987) Nutrient uptake. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, (eds. J. Bonga e D. J. Durzan), Vol. 1, Martinus Nijhoff Publishers.
- Guern, J.; J. P. Renaudin; S. C. Brown (1987) The compartmentation of secondary metabolites in plant cell cultures. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto
- Gunia, W; W. Hinderer; U. Wittkamp; W. Barz (1991) Elicitor induction of cytochrome P-450 mono-oxygenases in cell suspension cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their involvement in pterocarpan phytoalexin biosynthesis, *Z. Naturforsch.*, **46c**: 58-66.
- Gustine, D. L.; B. G. Moyer (1982) Retention of phytoalexin regulation in legume callus cultures, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **1**: 255-263.
- Hahlbrock, K.; J. Ebel; A. Oaks; J. Auden; M. Liersch (1974) Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium, *Planta*, **118**: 75-84.
- Hall, R. D.; M. M. Yeoman (1991) The influence of intracellular pools of phenylalanine derivatives upon the synthesis of capsaicin by immobilized cell cultures of the chilli pepper, *Capsicum frutescens*, *Planta*, **185**: 72-80.
- Hamill, J. D.; A. J. Parr; M. J. C. Rhodes; R. J. Robins; N. J. Walton (1987) New routes to plant secondary products, *Bio/technology*, **5**: 800-804.

- Harkes, P.; L. Krijbolder; K. Libbenga; R. Wijnsma; T. Nsengiyareng; R. Verpoorte (1985) Influence of various media constituents on the growth of *Cinchona ledgeriana* tissue cultures and the production of alkaloids and anthraquinones, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **4**: 199-214.
- Haslam, E. (1986) Secondary metabolism-fact and fiction, *Nat. Prod. Rep.*, **3**: 217-249.
- Heijden, R. (1989) Indole alkaloids in cell and tissue cultures of *Tabernaemontana* species, *Ph. D. Thesis*, Leiden Universiteit Leiden.
- Heimer, Y. M.; P. Filner (1970) Regulation of the nitrate assimilation pathway of cultured tobacco cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **215**: 152-163.
- Heimer, Y. M.; P. Filner (1971) Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **230**: 362-372.
- Henfling, J. W.; D. M. R. Bostock; J. Kuc (1980) Effect of abscisic acid on rishitin and lubimin accumulation and resistance to *Phytophthora infestans* and *Cladodporium cucumerinum* in potato tuber tissue slices, *Phytopathology*, **70**: 1074-1078.
- Herouart, D.; R. S. Sangwan; B. S. Sangwan-Norreel (1991) Selection and characteristics of a lactose-adapted *Datura innoxia* cell line grown in suspension culture, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **24**: 97-104.
- Hippolyte, I.; B. Marin; J. C. Baccou; R. Jonard (1992) Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L., *Plant Cell Rep.*, **11**: 109-112.
- Hostettmann, K.; M. Hamburger (1991) Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine, *Phytochemistry*, **30**: 3864-3874.
- Hsiao, K. C.; C. H. Bornman (1991) An oxygen electrode assay to determine autoclaved-induced toxicity in tissue culture media, *Physiol. Plant.*, **81**: 55-58.
- Huet, J. C.; J. C. Pernollet (1989) Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitin family and its comparison to cryptogein and capsicein, *FEBS Letters*, **257**: 302-306.
- Ibrahim, R. K. (1987) Regulation of synthesis of phenolics. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Inagaki, N.; N. Nishimura; M. Okada; H. Mitsuhashi (1991) Verbascoside production in plant cell cultures, *Plant Cell Rep.*, **9**: 484-487.
- Ingham, J. L. (1976a) Isosativano: an isoflavan phytoalexin from *Trifolium hybridum* and other *Trifolium* species, *Z. Naturforsch.*, **31c**: 331-332.
- Ingham, J. L. (1976b) Fungal modification of pterocarpan phytoalexins from *Melilotus alba* and *Trifolium pratense*, *Phytochemistry*, **15**: 1489-1495.

- Ingham, J. L. (1978) Isoflavonoid and stilbene phytoalexins of the genus *Trifolium*, *Biochem. Syst. Ecol.*, **6**: 217-223.
- Ingham, J. L. (1979a) Phytoalexin production by species of the genus *Caragana*, *Z. Naturforsch.*, **34c**: 293-295.
- Ingham, J. L. (1979b) Isoflavonoid phytoalexins of the genus *Medicago*, *Biochem. Syst. Ecol.*, **7**: 29-34.
- Ingham, J. L. (1979c) Isoflavonoid phytoalexins of *Parochetus communis* and *Factorovskya aschersoniana*, *Z. Naturforsch.*, **34c**: 290-292.
- Ingham, J. L.; K. Markham (1980) Identification of the *Erythrina* phytoalexin cristacarpin and a note on the chirality of other 6a-hydroxypterocarpanes, *Phytochemistry*, **19**: 1203-1207.
- Ingham, J. (1981a) Isolation and identification of *Cicer* isoflavonoids, *Biochem. Syst. Ecol.*, **9**: 125-128.
- Ingham, J. L. (1981b) Phytoalexin induction and its chemosystematic significance in the genus *Trigonella*, *Biochem. Syst. Ecol.*, **9**: 275-281.
- Ingham, J. L.; K. R. Markham (1982) Tephrocarpin, a pterocarpan phytoalexin from *Tephrosia bidwilli* and a structure proposal for acanthocarpin, *Phytochemistry*, **21**: 2969-2972.
- Ingham, J. L. (1982a) Phytoalexins from the Leguminosae. In: *Phytoalexins*, (eds. J. A. Bailey e J. W. Mansfield), Blackie Glasgow London.
- Ingham, J. L. (1982b) Phytoalexin production by *Ononis* species, *Biochem. Syst. Ecol.*, **10**: 233-237.
- Ingham, J. L. (1990) A further investigation of phytoalexin formation in the genus *Trifolium*, *Z. Naturforsch.*, **45c**: 829-834.
- Ishiguri, Y; K. Tomiyama; N. Doke; A. Murai; N. Katsui; F. Yagihashi; T. Masamune (1978) Induction of rishitin-metabolizing activity in potato tuber tissue disks by wounding and identification of rishitin metabolites, *Phytopathology*, **68**: 720-725.
- Jaques, U.; H. Kessmann; W. Barz (1987) Accumulation of phenolic compounds and phytoalexins in sliced and elicitor-treated cotyledons of *Cicer arietinum* L., *Z. Naturforsch.*, **42c**: 1171-1178.
- Jaziri, M.; M. Legros; J. Homes; M. Vanhaelen (1988) Tropine alkaloids production by hairy root cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*, *Phytochemistry*, **27**: 419-420.
- Jessup, W.; M. W. Fowler (1977) Interrelationships between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. III. Effect of the nitrogen source on the pattern of carbohydrate oxidation in cells of *Acer pseudoplatanus* L. grown in culture, *Planta*, **137**: 71-76.

- Jones, R. W.; A. J. Abbott; E. J. Hewitt; D. M. James; G. R. Best (1976) Nitrate reductase activity and growth in Paul's Scarlet Rose suspension cultures in relation to nitrogen source and molybdenum, *Planta*, **133**: 27-34.
- Jordan, M.; C. H. Rolfs; W. Barz (1986) Characterization of volatile constituents from heterotrophic cell suspension cultures of *Ruta graveolens*, *Z. Naturforsch.*, **41c**: 809-812.
- Kalan, E. B.; S. Osman (1976) Isolubimin: a possible precursor of lubimin in infected potato slices, *Phytochemistry*, **15**: 775-776.
- Katsui, N.; A. Matsunaga; T. Masamune (1974) The structure of lubimin and oxylubimin, antifungal metabolites from diseased potato tubers, *Tetrahedron Lett.*, **51/52**: 4483-4486.
- Katsui, N. A.; A. Matsunaga; H. Kitahara; F. Yagihashi; A. Murai; T. Masamune; N. Sato (1977) Lubimin and oxylubimin. The structure elucidation, *Bull. Chem Soc. Jap.*, **50**: 1217-1225.
- Kermalvezin, J. P. A. P. (1988) *Flore des Campagnes*, (ed. Grund).
- Kessmann, H.; K. Tiemann; J. R. Jansen; H. Reuscher; G. Bringmann; W. Barz (1988) *In vivo* characterization of NADPH: 2'-hydroxy-isoflavone oxidoreductase in elicitor treated chickpea cell cultures and stereochemical aspects of the phytoalexins medicarpin and maackiain. In: *Plant Cell Biotechnology*, (ed. M. S. S. Pais), Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Kim, D. J.; H. N. Chang (1990) Increased shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* suspension cultures with *in situ* extraction and fungal cell treatment (elicitor), *Biotechnol. Lett.*, **12**: 443-446.
- King, P. J.; H. E. Street (1977) Growth patterns in cell cultures. In: *Plant Tissue and Cell Culture*, (ed. H. E. Street) Blackwell Scientific Publications Oxford.
- Kirby, E. G.; T. Leustek; M. S. Lee (1987) Nitrogen nutrition. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, (eds. J. Bonga e D. J. Durzan), Vol. 1, Martinus Nijhoff Publishers.
- Knobloch, K. H.; G. Beutnagel; J. Berlin (1981) Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*, *Planta*, **153**: 582-585.
- Knobloch, K.; G. Bast; J. Berlin (1982) Medium-induced and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Phytochemistry*, **21**: 591-594.
- Komamine, A.; M. Sakuta; M. Hirose; H. Hirano; T. Takagi; K. Kakegawa; Y. Ozeki (1989) Regulation of secondary metabolism in relation to growth and differentiation. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Kuc, J. (1982) Phytoalexins from the Solanaceae. In: *Phytoalexins*, (eds. J. A. Bailey e J. W. Mansfield), Blackie Glasgow London.

- Kuc, J.; C. Preisig (1984) Fungal regulation of disease resistance mechanisms in plants, *Mycologia*, **76**: 767-784.
- Kuc, J.; J. S. Rush (1985) Phytoalexins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**: 455-472.
- Langendorfer, R. L.; M. T. Watters; J. Smarrelli (1988) Metabolite control of squash nitrate reductase, *Plant Sci.*, **57**: 119-125.
- Larkin, P. (1976) Purification and viability determination of plant protoplasts, *Planta*, **128**: 213-216.
- Lima Costa, M. E. (1987) Optimização do crescimento da cultura de células em suspensão de *Cynara cardunculus*, *Tese de Mestrado*, Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Lindsey, K.; M. M. Yeoman (1983a) Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In: *Plant Biotechnology (Society for Experimental Biology Seminar Series)*, (eds. S. H. Mantell e H. Smith), Cambridge University Press.
- Lindsey, K.; M. M. Yeoman (1983b) The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures, *J. Exp. Bot.*, **34**: 1055-1065.
- Lindsey, K.; M. G. K. Jones (1989) Prospects for the future of plant biotechnology. In: *Plant Biotechnology in Agriculture*, Open University Press.
- Lips, S. H., M. I. M. Soares; J. J. Kaiser; O. A. M. Lewis (1987) K⁺ modulation of nitrogen uptake and assimilation in plants. In: *Inorganic nitrogen metabolism* (eds. W. R. Ullrich; P. J. Aparicio; P. J. Syrett; F. Castillo), Springer-Verlag.
- Lisker, N.; J. Kuc (1977) Elicitors of terpenoid accumulation in potato tuber slices, *Phytopathology*, **67**: 1356-1359.
- Lyon, G. D. (1972) Occurrence of rishitin and phytuberin in potato tubers inoculated with *Erwinia carotovora* var *atroseptica*, *Physiol. Plant Pathol.*, **2**: 411-416.
- Mabry, T. J.; A. Ulubelen (1980) Flavonoids and related phenolics. In: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Suppl. Vol.*, (eds. G. R. Waller e O. C. Dermer), Wiley.
- Mackenbrock, U.; W. Barz (1991) Elicitor-induced formation of pterocarpan phytoalexins in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures from constitutive isoflavone conjugates upon inhibition of phenylalanine ammonia lyase, *Z. Naturforsch.*, **46c**: 43-50.
- Mansfield, J. W. (1982) The role of phytoalexins in disease resistance. In: *Phytoalexins*, (eds. J. A. Bailey e J. W. Mansfield), Blackie Glasgow London.
- Mantell, S. H.; J. A. Matthews; R. A. Mckee (1985) Industrial plant products. In: *Principles of Plant Biotechnology (An Introduction to Genetic Engineering in Plants)*, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Boston Melbourne.
- Marinelli, F.; S. Di Gregorio; V. N. Ronchi (1991) Phytoalexin production and cell death in elicited carrot cell suspension cultures, *Plant Science*, **77**: 261-266.

- Martin, S. M.; D. Rose; V. Hui (1977) Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen, *Can J. Bot.*, **55**: 2838-2843.
- Masuda, H.; T. Takahashi; S. Sugawara (1988) Acid and alkaline invertases in suspension cultures of sugar beet cells, *Plant Physiol.*, **86**: 312-317.
- Mavituna, F. (1988) Introduction to plant biotechnology. In: *Plant Cell Biotechnology*, (ed. M. S. S. Pais), Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- McDonald, K. A.; A. P. Jackman (1989) Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures, *Plant Cell Rep.*, **8**: 455-458.
- McLafferty, F. W. (1980) *Interpretation of Mass Spectra* (ed. N. J. Turro), University Science Books, Mill Valley California.
- McMurry, T. B. H.; E. Martin; D. M. X. Donnelly; J. C. Thompson (1972) 3-Hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxypterocarpan, *Phytochemistry*, **11**: 3283-3286.
- McPherson, M. J.; J. H. Parish (1987) Applications of recombinant DNA in biotechnology, *Nat. Prod. Rep.*, **4**: 205-224.
- Mérillon, J. M.; J. C. Chénieux; M. Rideau (1983) Cinétique de croissance, evolution du métabolisme glucido-azoté et accumulation alcaloïdique dans une suspension cellulaire de *Catharanthus roseus*, *Planta Med.*, **47**: 169-176.
- Merillon, J. M.; M. Rideau; J. C. Chenieux (1984) Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine, and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro*, *Planta Med.*, :497-501.
- Miguel, M. G. (1989) *Centaurea calcitrapa*: Obtenção de *calli* e extracção de proteases com actividade coagulante do leite, *Tese de Mestrado*, Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Mingo-Castel, A. M.; A. M. Pelacho; M. R. de Filipe (1991) Amyloplast division in kinetin induced potato tubers, *Plant Sci.*, **73**: 211-217.
- Misawa, M; T. Suzuki (1982) Recent progress in plant cell culture. Research on the production of useful plant metabolites in Japan, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**: 205-216.
- Mizukami, H.; K. Tomita; H. Ohashi; N. Hiraoka (1988) Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *Plant Cell Rep.*, **7**: 553-556.
- Mohanty, B.; J. S. Fletcher (1976) Ammonium influence on the growth and nitrate reductase activity of Paul's Scarlet Rose suspension cultures, *Plant Physiol.*, **58**: 152-155.
- Molnar; S. J. (1988) Nutrient modifications for improved growth of *Brassica nigra* cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **15**: 257-267.
- Morris, P.; A. H. Scragg; N. Y. Smart; A. Stafford (1985) Secondary product formation by plant cell cultures. In: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*, (ed. R. A. Dixon), IRL Press Oxford Washington D. C..

- Morris, P. (1986) Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. II- Comparison of production media, *Planta Med.*, **2**: 121-126.
- Mulder-Krieger, Th.; R. Verpoorte; A. Baerheim Svendsen; J. J. Scheffer (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **13**: 85-154.
- Murai, A.; S. Sato; A. Osada; N. Katsui; T. Masamune (1982) *J. Chem Soc. Chem Commun.*, **1**: 32.
- Murashige, T.; F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- Nash, D. T.; M. E. Davies (1972) Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspensions, *J. Exp. Bot.*, **23**: 75-91.
- Nespoulous, C.; J. C. Huet; J. C. Pernollet (1992) Structure-function relationships of α and β elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction, *Planta*, **186**: 551-557.
- Newmann, K. H. (1989) Cytodifferentiation and Compartmentation. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Nigra, M.; M. A. Alvarez; A. M. Giulietti (1989) The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by *Solanum eleagnifolium* Cav. calli, *Plant Cell Rep.*, **8**: 230-233.
- Nigra, H. M.; M. A. Alvarez; A. M. Giulietti (1990) Effect of carbon and nitrogen sources on growth and solasodine production in batch suspension cultures of *Solanum eleagnifolium* Cav., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **21**: 55-60.
- Oaks, A. (1974) The regulation of nitrate reductase in suspension cultures of soybean cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **372**: 122-126.
- Owen, H. R.; D. Wengerd; A. R. Miller (1991) Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method, *Plant Cell Rep.*, **10**: 583-586.
- Ozeki, Y.; M. Matsuoka; Y. Ohashi; Y. Kano-Murakami; N. Yamamoto; Y. Tanaka (1989) Induction and suppression of anthocyanin synthesis in carrot suspension cell cultures regulated by 2,4-D. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Ozeki, Y.; A. Komamine; Y. Tanaka (1990) Induction and repression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase enzyme proteins and mRNAs in carrot cell suspension cultures by 2,4-D, *Physiol. Plant.*, **78**: 400-408.
- Pachler, K. G. R.; W. G. E. Underwood (1967) A proton magnetic resonance study of some pterocarpan derivatives, *Tetrahedron*, **23**: 1817-1826.

- Parr, A. J.; R. J. Robins; M. J. C. Rhodes (1987) Release of secondary metabolites by plant cell cultures. In: *Plant and Animal Cells*, (ed. E. Horwood) Chichester.
- Pedro, L.; M. J. Sousa; J. M. Novais; M. S. Pais (1990) Callus and suspension cultures from *Geranium robertianum* (Geraniaceae), *Biotechnol. Lett.*, **12**: 439-442.
- Pelter, A.; P. I. Amenechi (1969) Isoflavonoid and pterocarpinoid extractives of *Lonchocarpus laxiflorus*, *J. Chem. Soc. (C)*, 887-896.
- Phillips, R.; G. G. Henshaw (1977) The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L., *J. Exp. Bot.*, **28**: 785-794.
- Pintão, A. M. (1989) Cultura de células de *Tropaeolum majus*, *Tese de Mestrado*, Faculdade de Ciências de Lisboa.
- Preisig, C.; J. Kuc (1983) Regulation of the sesquiterpenoid -eliciting activity of C₂₀ fatty acids in potato by carbohydrate isolated from *Phytophthora infestans*, *Phytopathology*, **73**: 831.
- Preisig, C. L.; H. D. Vanetten; R. A. Moreau (1991) Induction of 6a-hydroxymaackiain 3-O-methyltransferase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA translational activities during the biosynthesis of pisatin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**: 468-473.
- Preston, W. W. (1977) Induced pterocarpan of *Psophocarpus tetragonolobus*, *Phytochemistry*, **16**: 2044-2045.
- Pryke, J.T.; Ap Rees (1977) The pentose phosphate pathway as a source of NADPH for lignin biosynthesis, *Phytochemistry*, **16**: 557-560.
- Raghavan, V.; R. Nagmani (1983) Morphogenesis of pollen callus cultures of *Hyoscyamus niger*, *Amer. J. Bot.*, **70**: 524-531.
- Raghavan, V.; R. Nagmani (1989) Cytokinin effects on pollen embryogenesis in cultured anthers of *Hyoscyamus niger*, *Can. J. Bot.*, **67**: 247-257.
- Renaudin, J. P.; J. Guern (1988) Compartmentation of ajmalicine in the vacuoles from *Catharanthus roseus*, *Biochem. Soc. Trans.*, **16**: 63-65.
- Ricci, P.; P. Bonnet; J. C. Huet; M. Sallanti; F. Beauvais-Cante; M. Bruneteau; V. Billard; G. Michel; J. C. Pernollet (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco, *Eur. J. Biochem.*, **183**: 555-563.
- Robeson, D. J.; J. L. Ingham (1979) New pterocarpan phytoalexins from *Lathyrus nissolia*, *Phytochemistry*, **18**: 1715-1717.
- Robins, R. J.; J. Payne; M. J. C. Rhodes (1986) Cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. I- Growth and quinoline alkaloid production, *Planta Med.*, **3**: 220- 226.
- Robins, R. J.; A. J. Parr; M. J. C. Rhodes (1988) The use of continuous product removal to influence the distribution and net production of alkaloids by cell cultures, *Bioch. Soc. Trans.*, **16**: 67-71.

- Rokem, J. S.; B. Tal; I. Goldberg (1985) Methods for increasing diosgenin production by *Dioscorea* cells in suspension cultures, *J. Nat. Prod.*, **48**: 210-222.
- Rose, D.; S. M. Martin (1975) Effect of ammonium on growth of plant cells (*Ipomoea* sp.) in suspension cultures, *Can. J. Bot.*, **53**: 1942-1949.
- Sahai, O. P.; M. L. Shuler (1984) Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*, *Biotech. Bioeng.*, **26**: 111-120.
- Saito, K.; M. Yamazaky; I. Murakoshi (1992) Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*- mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites, *J. Nat Prod.*, **55**: 149-162.
- Sakamoto, K.; K. Iida; K. Sawamura; K. Hajiro; Y. Asada; T. Yoshikawa; T. Furuya (1993) Effects of nutrients on anthocyanin production in cultured cells of *Aralia cordata*, *Phytochemistry*, **33**: 357-360.
- Sakamura, F.; T. Suga (1989) *Zingiber officinale* Roscoe (Ginger): in vitro propagation and the production of volatile constituents. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants II*, (ed. Y. P. S. Bajaj) Springer Verlag Berlin.
- Sakuta, M.; A. Komamine (1987) Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Sargent, P. A.; J. King (1974) Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine and amino acids, *Can J. Bot.*, **52**: 1747-1755.
- Sauerwein, M.; K. Shimomura (1991) Alkaloid production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Phytochemistry*, **30**: 3277-3280.
- Scheel, D.; J. Parker (1990) Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation, *Z. Naturforsch.*, **45c**: 569-575.
- Schenk, R.; A. Hildebrandt (1972) Medium techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.*, **50**: 199-204.
- Schripsema, J.; A. H. Meijer; F. van Iren; H. J. C. ten Hoopen; R. Verpoorte (1990) Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **22**: 55-64.
- Schripsema, J.; C. Erkelens; R. Verpoorte (1991) Intra- and extracellular carbohydrates in plant cell cultures investigated by ¹H-NMR, *Plant Cell Rep.*, **9**: 527-530.
- Schulz, A. (1981) Elektronmikroskopische Untersuchungen zur Entwicklung des Protonemas von *Funaria hygrometrica*. Ph. D. Thesis, Technische Universität Hannover.
- Scragg, A. (1986) The potential of plant cell culture in biotechnology, *Int. Biotechnol. Lab.*, **4**: 44-47.

- Shah, R. R.; K. V. Subbaiali; R. Mehta (1976) Hormonal effect on polyphenol accumulation in *Cassia* tissues cultured *in vitro*, *Can. J. Bot.*, **54**: 1240-1245.
- Shargool, P. D. (1982) Biotechnological applications of plant cells, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**: 239-257.
- Shih, M.; J. Kuc (1973) Incorporation of ¹⁴C from acetate and methylvalonate into rishitin and steroid glycoalkaloids by potato tuber slices inoculated with *Phytophthora infestans*, *Phytopathology*, **63**: 826-829.
- Smith, D. A.; S. W. Banks (1986) Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins, *Phytochemistry*, **25**: 979-995.
- Spencer, P. A.; A. Tanaka; G. H. N. Towers (1990) An *Agrobacterium* signal compound from grapevine cultivars, *Phytochemistry*, **29**: 3785-3788.
- Spencer, P. A.; G. H. N. Towers (1991) Restricted occurrence of acetophenone signal compounds, *Phytochemistry*, **30**: 2933-2937.
- Staba, E. J. (1977) Tissue culture and pharmacy. In: *Plant Tissue and Cell Culture (Botanical Monographs)*, (ed. H. E. Street), Vol. 11, Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Melbourne.
- Staba, E. J. (1982) Production of useful compounds from plant tissue cultures. In: *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, 25-30.
- Staba, E. J. (1985) Milestones in plant tissue culture systems for the production of secondary products, *J. Nat. Prod.*, **48**: 203-209.
- Stachel, S. E.; E. Messens; M. V. Montagri; P. Zambryski (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*, *Nature*, **318**: 624-629.
- Stafford, A.; P. Morris; M. W. Fowler (1986) Plant cell biotechnology: a perspective, *Enzyme Microb. Technol.*, **8**: 578-587.
- Stermer, B. A.; R. M. Bostock (1987) Involvement of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato, *Plant Physiol.*, **84**: 404-408.
- Stoessl, A.; J. B. Stothers; E. W. B. Ward (1976) Sesquiterpenoid stress compounds of the *Solanaceae*, *Phytochemistry*, **15**: 855-872.
- Stoessl, A.; J. B. Stothers; E. W. B. Ward (1978) Biosynthetic studies of stress metabolites from potatoes: incorporation of sodium acetate-¹³C₂ into 10 sesquiterpenes, *Can. J. Chem.*, **56**: 645-653.
- Stoessl, A.; J. B. Stothers (1980) 2-*epi*- and 15-dihydro-2-*epilubimin*: new stress compounds from the potato, *Can. J. Chem.*, **58**: 2069-2072.
- Stoessl, A. (1982) Biosynthesis of phytoalexins. In: *Phytoalexins*, (eds. J. A. Bailey e J. W. Mansfield), Blackie Glasgow London.

- Stones, T. W. (1988) The current and future role of plant tissue culture in the natural essential oils, fragrances and flavour materials industry. In: *Flavours and Fragrances: A World Perspective* (eds. B. M. Lawrence, B. D. Mookherjee, B. J. Willis), Elsevier, Amsterdam.
- Stothers, J. B.; A. Stoessl; E. W. B. Ward (1978) Eine untersuchung der *in vivo* oxidation des capsidiols mit hilfe der ¹³C-NMR spektroskopie, *Z. Naturforsch.*, **33c**: 149-150.
- Strange, R. N.; J. L. Ingham; D. L. Coh; M. E. Carvill; C. Edwards; C. J. Cooksey; P. J. Garatt (1985) Isolation of the phytoalexins medicarpin from leaflets of *Arachis hypogaea* and related species of the tribe *Aeschynomeneae*, *Z. Naturforsch.*, **40c**: 313-316.
- Street, H. E. (1977) Cell (suspension) cultures techniques. In: *Plant Tissue and Cell Culture*, (ed. H. E. Street) Blackwell Scientific Publications Oxford.
- Suga, T.; T. Hirata (1990) Biotransformation of exogenous substrats by plant cell cultures, *Phytochemistry*, **29**: 2393-2406.
- Sugano, N.; R. Iwata; A. Nishi (1975) Formation of phenolic acid in carrot cells in suspension cultures, *Phytochemistry*, **14**: 1205-1207.
- Sugisawa, H.; K. Miwa, T. Matsuo; H. Tamura (1988) Volatile compounds produced from the cultured cells of thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Bioflavour '87*, (ed. P. Schreier), Walter de Gruyter Berlin.
- Tabata, M.; Y. Fujita (1985) Production of shikonin by plant cell cultures. In: *Biotechnology in Plant Science, Relevance of Agriculture in the Eighties*, (eds. M. Zaitlin, P. Day e A. Hollander), Academic Press Orlando.
- Takeda, J. (1988) Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension. I- The factors affecting anthocyanin production, *J. Exp. Bot.*, **39**: 1065-1077.
- Teasdale, R. D. (1987) Micronutrients. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, (eds. J. Bonga e D. J. Durzan), Vol. 1, Martinus Nijhoff Publishers.
- Tenhaken, R.; W. Barz (1991) Characterization of pectic enzymes from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*, *Z. Naturforsch.*, **43c**: 51-57.
- Thompson, M. R.; T. A. Thorpe (1987) Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, (eds. J. Bonga e D. J. Durzan), Vol. 1, Martinus Nijhoff Publishers.
- Thorpe, T. A. (1980) Organogenesis *in vitro* structural, physiological and biochemical aspects. In: *International Review of Cytology, Supplement 11A*, (ed. I. K. Vasil), Academic Press.
- Threlfall, D. R.; I. M. Whitehead (1988a) The use of biotic and abiotic elicitors to induce the formation of secondary plant products in cell suspension cultures of solanaceous plants, *Biochem. Soc. Trans.*, **16**: 71-75.

Threlfall, D. R.; I. M. Whitehead (1988b) Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*, *Phytochemistry*, **27**: 2567-2580.

Tomiyama, K.; T. Sakuma; N. Ishizaka; N. Sato; N. Katsui; M. Takasugi; T. Masamune (1968) A new antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens, *Phytopathology*, **58**: 115-116.

Trotin, Y. M. F.; J. D. J. Vasseur; E. Boustani (1992) Influence of the culture conditions on polyphenol production by *Fagopyrum esculentum* tissues cultures, *J. Nat. Prod.*, **55**: 33-38.

Tulecke, W. (1966) Continuous cultures of higher plant cells in liquid media: the advantages and potential use of a phytostat, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **139**: 162-175.

Tyler, R. T.; U. Eilert; C. O. M.; Rijnders; I. A. Roewer; C. K. McNabb; W. G. W. Kurz (1989) Studies on benzophenanthridine alkaloid production in elicited cell cultures of *Papaver somniferum* L. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, (ed. W. G. W. Kurz), Springer Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong

Ullrich, W. R. (1987) Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with nitrate metabolism. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism* (eds. W. R. Ullrich, P. J. Aparicio, P. J. Syrett, F. Castillo) Springer Verlag.

Vanetten, H. D.; D. E. Matthews; D. A. Smith (1982) Metabolism of phytoalexins. In: *Phytoalexins*, (eds. J. A. Bailey e J. W. Mansfield), Blackie Glasgow London.

Varns, J. L.; W. W. Currier; J. Kuc (1971) Specificity of rishitin and phytuberin accumulation by potato, *Phytopathology*, **61**: 968-971.

Veliky, I. A.; D. Rose (1973) Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures, *Can. J. Bot.*, **51**: 1837-1844.

Vogelsang, R.; W. Barz (1990) Elicitation of β -1,3-glucanase and chitinase activities in cell suspension cultures of *Ascochyta rabiei* resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum*), *Z. Naturforsch.*, **45c**: 233-239.

Wallace, W. (1987) Regulation of nitrate utilization in higher plants. In: *Inorganic Nitrogen Metabolism* (eds. W. R. Ullrich, P. J. Aparicio, P. J. Syrett, F. Castillo), Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Watts, M. J.; I. J. Galpin; H. A. Collin (1984) The effect of greening on flavour production in celery tissue cultures, *New Phytol.*, **100**: 45-56.

→ Weatherburn, M. W. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem.*, **39**: 971-974.

Weathers, P. J.; N. A. M. Fadzilhah; R. D. Cheetham (1992) Light inhibits the formation of capsaicin from *Capsicum callus*, *Planta Med.*, **58**: 278-279.

- Weidemann, C.; R. Tenhaken; U. Hohl; W. Barz (1991) Medicarpin and maackiain 3-O-glucoside-6'-O-malonate conjugates are contributive compounds in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures, *Plant Cell Rep.*, **10**: 371-374.
- Weidenborner, M.; H. Hindorf; H. C. Jha; P. Tsotsonos; H. Egge (1990) Antifungal activity of isoflavonoids in different reduced stages of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, *Phytochemistry*, **29**: 1990.
- Westcott, R. J.; G. G. Henshaw (1976) Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L., *Planta*, **131**: 67-73.
- Widholm, J. M. (1987) Selection of mutants which accumulate desirable secondary compounds. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (eds. F. Constabel e I. Vasil), Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto.
- Williams, C. A.; J. B. Harborne (1989) Isoflavonoids. In: *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1 (eds. P. M. Dey e J. B. Harborne) Academic Press.
- Williams, P. D.; F. Mavituna (1992) Immobilized plant cells. In: *Plant Biotechnology. Comprehensive Biotechnology*, (Second supplement), (eds. M. W. Fowler, G. C. Warren e M. Moo-Young), Pergamon Press Oxford Tokyo.
- Witte, L.; J. Berlin; V. Wray; W. Schubert; W. Kohl; G. Höfle; J. Hammer (1983) Mono- and diterpenes from cell cultures of *Thuja occidentalis*, *Planta Med.*, **49**:216-221.
- Woodward, M. D. (1980) Phaseollin formation and metabolism in *Phaseolus vulgaris*, *Phytochemistry*, **19**: 921-927.
- Yamada, Y.; Y. Fujita (1983) Production of useful compounds in culture. In: *Handbook of Plant Cell Cultures. Techniques for Propagation and Breeding*, (eds. D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato e Y. Yamada), Vol. 1, Macmillan Publishing Co. New York.
- Yamada, Y. (1984) Selection of cell lines for high yields of secondary metabolites. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Laboratory procedures and their applications*, (ed. I. K. Vasil), Vol. I, Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- Yeoman, M. M.; A. J. MacLeod (1977) Tissue (callus) cultures-techniques. In: *Plant Tissue and cell Culture. Botanical Monographs*, Vol. 11 (ed. H. E. Street), Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Melbourne.
- Yeoman, M. M.; H. E. Street (1977) General cytology of cultured cells. In: *Plant Tissue and cell Culture. Botanical Monographs*, Vol. 11 (ed. H. E. Street), Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Melbourne.
- Yeoman, M.; E. Forche (1980) Cell proliferation and growth in callus cultures. In: *Int. Rev. Cytol., Supplem 11A* (ed. I. Vasil) Academic Press.

- Yeoman, M. M. (1988) Techniques, characteristics, properties, and commercial potential of immobilized plant cells. In: *Plant Cell Biotechnology*, (ed. M. S. S. Pais), Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Zacharius, R. M.; E. B. Kalan (1984) Biotransformation of the potato stress metabolite solavetivone, by cell suspension cultures of two solanaceous and three non-solanaceous species, *Plant Cell Rep.*, **3**: 189-192.
- Zacharius, R. M.; E. B. Kalan; W. I. Kimoto (1985) Biotransformation of potato stress metabolites rishitin, lubimin, and 15-dihydrolubimin by potato and soybean cell cultures, *Plant Cell Rep.*, **4**: 1-3.
- Zanetti, A.; F. Beauvais; J. C. Huet; J. C. Pernollet (1992) Movement of elicitors, necrosis-inducing proteins secreted by *Phytophthora* sp., in tobacco, *Planta*, **187**: 163-170.
- Zenk, M. H. (1991) 6. Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cell cultures as a pot of gold, *Phytochemistry*, **30**: 3861-3863.
- Zink, M. W.; I. A. Veliky (1977) Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductases in cultured *Ipomoea* cells, *Can J. Bot.*, **55**: 1557-1568.
- Zook, M. N.; J. A. Kuc (1987) Differences in phytoalexins elicitation by *Phytophthora infestans* and *Helminthosporium carbonum* in potato, *Phytopathology*, **77**: 1217-1220.

F. Apêndice

Para além do equipamento referido nos capítulos "MATERIAL E MÉTODOS" foi, ainda, utilizado:

- Autoclave Hirayama Mana Corp. modelo HL 36 Ae.
- Estufa Elektro Helios.
- Estufa Memert tipo U50.
- Bancada de fluxo laminar Gelaire Laminar air flow Class 100.
- Agitadora orbital Pilot-Shake System Kuhner RC-6-U.
- Potenciómetro Crison Digit 501 pH/mV.
- Liofilizador Alpha I-5 (Christ).
- Microscópio óptico Leitz Wetzlar.
- Microscópio de *epi*- fluorescência Leitz-Wetzlar SM-Lux com filtro BG-12.
- Balança Mettler Type B5, gama 0-200 g, precisão 0,1 mg.
- Balança Sartorius L 420S-*RC, gama 0-420 g, precisão 1 mg.
- Bomba de vácuo Waters Millipore, tipo DOA-V130-BN.
- Centrífuga MSE.
- Sonicador LAbsonicU, da Braun.
- Spectronic Bausch e Lomb 21.
- Cromatógrafo HPLC acoplado a um detector matriz de díodo Waters, tipo LCD 725, com um sistema de bombas modelo 510 da Waters e um controlador automático de gradiente Waters.
- Cromatógrafo HPLC constituído por uma bomba LKB, modelo Bromma; um detector de índice de refração LKB 2142, modelo Bromma; um controlador de fluxo LKB 2152, modelo Bromma, um regulador de temperatura Millipore Waters, modelo TCM e um forno Waters, acoplado a um integrador Hewlett Packard, modelo 3390A.
- Evaporador rotativo RE-51 Yamato, com banho de água BM-51.