

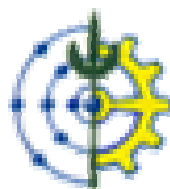
UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS

DISSERTAÇÃO

**Atenuação do processo de lignificação em células de *Eucalyptus*
urophylla S. T. Blake, em suspensão, por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).**

Kelly Carla Almeida de Souza

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS**

**ATENUAÇÃO DO PROCESSO DE LIGNIFICAÇÃO EM CÉLULAS DE
EUCALYPTUS UROPHYLLA S. T. BLAKE, EM SUSPENSÃO, POR 2,4-D
(ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO)**

KELLY CARLA ALMEIDA DE SOUZA

Sob a Orientação do Professor
Heber dos Santos Abreu

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2007

A Deus, simplesmente por tudo

*Aos meus pais Wilson e Janice,
pelo imenso apoio, incentivo e grande dedicação,*

*A minha irmã Suelen,
pelo apoio*

OFEREÇO

*Ao meu amor Marcio,
pelo companheirismo de sempre,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais e a Capes;

Ao Prof. Dr. Heber pela orientação, pela oportunidade de desenvolver esse projeto e por todo apoio;

Aos amigos Hulda, Deise, Regina, Beatriz, Bruno, Mariana e Ana Luiza pela amizade e pelo grande trabalho em equipe que desenvolvemos no laboratório (LBM);

As minhas grandes amigas Natália, Mariza e Vanessa pelo grande incentivo;

Ao técnico de laboratório Daniel Chalita pela ajuda prestada nas análises;

Ao secretário do DPF, Mendes, pelos inúmeros favores prestados;

A Prof. Dra. Maria Raquel Figueiredo do Laboratório de Produtos Naturais-Farmanguinhos -FIOCRUZ por permitir a realização da análise no infravermelho

Aos técnicos Alan (FIOCRUZ) e Carlão (PQ-UFRRJ) pela ajuda na análise no infravermelho;

Ao técnico Eli do Departamento de Química (UFRRJ) pelo apoio;

Ao Prof. Maeda do Departamento de Silvicultura (UFRRJ) pela grande ajuda nas análises estatísticas;

Ao técnico de laboratório José Carlos pela ajuda;

A todos os professores, alunos e funcionários do Instituto de Florestas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

RESUMO

SOUZA, Kelly Carla Almeida de. **Atenuação do processo de lignificação em células de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, em suspensão, por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).** 2007. 51p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

A cultura de células em suspensão é uma técnica muito eficiente para o estudo de metabólitos secundários. Através da utilização do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), regulador de crescimento com habilidade de reprimir o metabolismo dos fenilpropanóides, foi realizado um processo de lignificação de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* a fim de identificar a concentração de 2,4-D mais eficiente para atenuar a produção de lignina *in vitro*. Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia da Madeira (IF-UFRRJ) onde calos de *Eucalyptus urophylla* foram produzidos e transferidos para o meio MS líquido suplementado com cinco diferentes tratamentos de 2,4-D (T1: 1 mg/L; T2: 2 mg/L; T3: 4 mg/L; T4: 5 mg/L; T5: 0 mg/L) sem agentes antioxidantes. Por análises no infravermelho e no ultravioleta comprovou-se que em meio MS líquido as células foram capazes de produzir lignina. O tratamento 2 com 2 mg/L de 2,4-D foi o mais adequado para produzir quantidades menores de lignina, ao contrário do tratamento 5 com 0 mg/L de 2,4-D, no qual a ausência deste fitorregulador não reprimiu a produção de lignina. Esta pesquisa abre portas para o estudo da lignina de *Eucalyptus urophylla* permitindo conhecer melhor o processo de formação desta substância de grande complexidade e de grande importância na área florestal.

Palavras chave: calo, lignina, suspensão celular

ABSTRACT

SOUZA, Kelly Carla Almeida de. **Attenuating of lignification process in *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, in suspension, by 2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid).** 2007. 51p. Dissertation (Master in Environment and Forest Science). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

The suspension cell culture is an efficient technique to the study of secondary metabolites. Through the utilization of 2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic acid), growth regulator with ability to restrain the phenylpropanoid metabolism, was carried a process of lignification of suspension cells of *Eucalyptus urophylla* in order to identify the most efficient 2,4-D concentration to attenuate the lignin production *in vitro*. This work was developed in the Wood Biotechnology Laboratory (IF-UFRRJ) where callus of *Eucalyptus urophylla* were produced and transferred to the medium supplemented liquid MS with five different treatments of 2,4-D (T1: 1 mg/L; T2: 2 mg/L; T3: 4 mg/L; T4: 5 mg/L; T5: 0 mg/L) without antioxidants agents. Infrared and ultraviolet analyses proved that, in medium liquid MS, the cells were capable to produce lignin. The treatment 2 with 2 mg/L of 2,4-D was better to produce little amounts of lignin than treatment 5 with 0 mg/L of 2,4-D, in which the absence of this growth regulator did not restrain the lignin production. This research opens new ways for the study of the *Eucalyptus urophylla* lignin allowing a better knowledge of the formation process of this substance, which has a great complexity and importance in the forest area.

Key words: callus, cell suspension, lignin

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Estruturas moleculares dos precursores majoritários da lignina -----	4
Figura 2- Caminho proposto para a biossíntese da lignina -----	5
Figura 3- Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)-----	8
Figura 4- Perfil estrutural do desenvolvimento de mudas de <i>Eucalyptus urophylla</i> no meio MS -----	16
Figura 5- Cultura de calo: (A) Escolha do explante; (B e C) Corte do explante; (D) Inoculação do explante no meio pra calo; (E) Calo formado de <i>Eucalyptus urophylla</i> -----	17
Figura 6- Preparação da amostra para análise no infravermelho: (A) 2 mg da amostra; (B) Os 5 tratamentos; (C) 200 mg de KBr; (D e E) A amostra sendo macerada com KBr; (F) Os tratamentos prontos para análise no infravermelho -----	21
Figura 7- Ilustração das amostras de lignina padrão de Björkman para a curva de calibração (as cores azuis são ilustrações para melhor identificar que à medida que a concentração diminui a cor fica mais clara) -----	23
Figura 8- Curva de Calibração de lignina padrão (<i>Gallesia gorazema</i>) de Björkman -----	23
Figura 9- Calo do <i>Eucalyptus urophylla</i> - foto tirada no Laboratório de Anatomia da Madeira através de uma lupa binocular modelo STEMI 2000C w10x/21 455042, obtido a partir de explante foliar, após 90 dias de inoculação no meio de cultura. -----	25
Figura 10- Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 1 da suspensão (1 mg/L de 2,4-D). -----	27
Figura 11- Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 2 da suspensão (2 mg/L de 2,4-D) -----	27
Figura 12- Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 4 da suspensão (5 mg/L de 2,4-D) -----	28
Figura 13- Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 5 da suspensão (0 mg/L de 2,4-D) -----	28

Figura 14- Diferença de coloração entre os tratamentos da suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i> após o método de BRUCE & WEST (1989)	-----32
Figura 15- Soluções preparadas com lignina padrão de <i>Gallesia gorazema</i> (Björkman): curva de calibração	-----32
Figura 16- Espectro em ultravioleta de lignina padrão de <i>Gallesia gorazema</i> (Björkman) na concentração de 150 mg/L	-----33
Figura 17- Espectros dos cinco tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D na suspensão celular	----- 34
Figura 18- Espectro das repetições de cada tratamento	----- 35
Figura 19- Gráfico de tratamentos e suas respectivas concentrações de lignina	----- 39

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1- Meio MS modificado para germinação de <i>Eucalyptus urophylla</i> (WATT et al., 1991)	16
Tabela 2- Meio MS utilizado para indução de calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> (WATT et al., 1991)	18
Tabela 3- Meio MS modificado para formação de células em suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i> (WATT et al., 1991)	19
Tabela 4- Diferentes tratamentos variando as concentrações de 2,4-D	19
Tabela 5- Pontos característicos de lignina em cada tratamento	29
Tabela 6- Atribuição dos principais sinais de absorção no infravermelho de lignina	30
Tabela 7- Regiões características de grupamentos metoxilas no infravermelho	31
Tabela 8- Valores de absorbância de cada tratamento a 280 nm	33
Tabela 9- Concentração de lignina em cada tratamento	37
Tabela 10- Quadro da Análise de Variância	38
Tabela 11- Teste de médias (Tukey)	38

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO -----	1
2 REVISÃO DE LITERATURA -----	3
2.1 Lignina -----	3
2.2 Biossíntese das ligninas -----	4
2.3 Fitorreguladores em meio de cultura -----	7
2.4 Calogênese e células em suspensão-----	10
2.5 Lignificação e células em suspensão -----	13
3 MATERIAL E MÉTODOS -----	15
3.1 Assepsia -----	15
3.2 Inoculação das sementes -----	15
3.3 Cultura de calos -----	16
3.4 Células em suspensão -----	18
3.5 Determinação de lignina -----	19
3.5.1 Teste de Wiesner -----	19
3.5.2 Infravermelho -----	20
3.5.3 Ultravioleta-----	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	24
4.1 Calogênese e suspensão celular -----	24
4.2 Análise no infravermelho-----	26
4.3 Análise no ultravioleta-----	31
5 CONCLUSÕES -----	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	41

1 INTRODUÇÃO

A lignina é definida como um grupo de substâncias que apresenta função relevante no Reino Vegetal, conferindo resistência às plantas por atuarem como agente cimentante, de condução, de defesa, como barreira física e química contra fatores bióticos e abióticos. Sua existência foi imprescindível na adaptação das plantas, há milhares de anos atrás, no período que as espécies aquáticas passaram para o ambiente terrestre (STUMPF & CONN, 1981). A lignina desenvolveu formas de suporte para as plantas se erguerem em direção oposta à gravidade. À medida que as plantas foram evoluindo, a composição da lignina foi modificando-se e tornando-se menos complexa sob o ponto de vista estrutural, apresentando uma estrutura mais linear, como é o caso das ligninas de angiospermas (ABREU et al., 1999).

O estudo do processo de atenuação do processo de lignificação em células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* visa o melhor entendimento da biossíntese da lignina, ou seja, a formação desta substância.

O *Eucalyptus urophylla* é uma espécie tropical originária da Indonésia, onde ocorre naturalmente, apresenta porte elevado, forte dominância apical; a casca pode ser parcialmente rugosa a espessa fibrosa, de coloração marrom quando seca e quase negra quando úmida. As folhas das plantas adultas são alongadas, estreitas e pecioladas, sendo introduzida no Brasil por Edmundo Navarro de Andrade (PIGATO & LOPES, 2001). Os frutos podem apresentar dois tipos de formas: campanulada ou hemisférica em altitudes superiores a 1000 m; cônico em altitudes inferiores a 1000 m (MARTIN & COSSALTER, 1976). É uma espécie que apresenta reprodução cruzada.

Atualmente várias aplicações de técnicas de biotecnologia celular de plantas têm sido utilizadas, a começar pela clonagem seguida pela cultura de células, a qual inclui suspensões celulares em meio líquido. A suspensão celular apresenta grande importância para a produção de metabólitos especiais entre outros, como é o caso da lignina, a qual pode ser produzida em meio líquido através da liberação de monolignóis e peroxidase.

A cultura de células em suspensão fornece excelentes informações para o estudo do metabolismo secundário; simples alterações no meio de cultura frequentemente resultam em expressões de uma via metabólica específica. Uma dessas informações é a via dos fenilpropanóides, que participa da formação de várias substâncias como flavonóides e lignina.

O metabolismo dos fenilpropanóides tem sido bem estudado através de cultura de células em suspensão de soja (*Glicine max* L.) por HAHNBROCK et al., (1980). HOSEL et al., (1982) foram capazes de induzir a lignificação nas células desta espécie por modificação na concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura. O mesmo ocorreu em pinus (*Pinus taeda*), na qual foi realizado um estudo da lignificação através da técnica de cultura de células em suspensão variando a concentração do fitorregulador 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (EBERHARDT et al., 1993).

A cultura de células desenvolveu papel semelhante quanto à indução da lignificação em células de pinus (*Pinus radiata*) (MOLLER et al., 2006). Em *Arabidopsis* L. a técnica de suspensão celular foi eficiente para o estudo da biossíntese de um outro produto do metabolismo secundário, o ascorbato, um derivado do ácido ascórbico (DAVEY et al., 1999).

Outras pesquisas sobre culturas de células foram realizadas com espécies de gimnospermas e angiospermas, nas quais a lignificação foi aparentemente induzida por várias maneiras, inclusive com mudanças nos reguladores de crescimento, tipo de meio

de cultura e ativação por fungos (NIMZ et al., 1975; RAMSDEN & NORTHCOTE, 1987; ROBERT et al., 1989; CAMPBELL & ELLIS, 1992).

A biotecnologia tem por finalidade subsidiar vários tipos de trabalhos. A técnica de cultura de tecidos permite avaliar os efeitos fisiológicos dos nutrientes, dos reguladores de crescimento e de outros constituintes químicos pertinentes ao processo de formação dos precursores e da formação da lignina.

Os artigos relacionados à cultura de células em suspensão são realizados mediante a utilização de vários protocolos. Um dos meios mais utilizados para tal é o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), que tem mostrado bons resultados nos trabalhos com culturas de *Eucalyptus* (TORRES & CALDAS, 1990). Por sua vez a utilização do meio LD (LAINÉ & DAVID, 1994) tem mostrado eficiente produção de calos, conjunto de células de crescimento desordenado, na espécie *Eucalyptus urophylla*.

No meio de cultura utilizado é imprescindível que haja um balanço entre os reguladores de crescimento, ou seja, uma combinação eficiente entre auxinas e citocininas. No entanto, esta combinação também depende da espécie, do tipo e da idade do tecido utilizado na cultura. Ao utilizar explantes de plantas adultas, as respostas a um regulador de crescimento são diferentes em relação ao tecido jovem. Os explantes foliares de *Eucalyptus urophylla*, ao serem submetidos a fitorreguladores, respondem de forma considerável através da produção de calos.

A formação de calos tem sido obtida de forma considerável através do uso do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), uma auxina sintética que auxilia no desenvolvimento do calo.

Uma das dificuldades em estudar os processos que acompanham a lignificação em plantas lenhosas é que as células diferem muito entre si no desenvolvimento da parede (como a composição do polímero, espessura, entre outros).

A lignificação é um processo que tem sido muito estudado em calos e em células em suspensão, sendo induzida por balanço hormonal, atividades enzimáticas, utilização de fungos como agentes ativadores desse processo, para os mais variados fins (MOLLER et al., 2006). Um dos aspectos mais relevantes no estudo da lignificação é o entendimento de como esse processo se inicia permitindo obter informações sobre o tipo de lignina formada em cada espécie.

Os objetivos do trabalho foram: (1) desenvolver um protocolo para o estudo do processo de lignificação em células de *Eucalyptus urophylla* em suspensão; (2) identificar e quantificar a lignina através de análises no infravermelho e no ultravioleta; (3) verificar a concentração mais adequada de 2,4-D para evitar ou diminuir a ocorrência do processo de lignificação em cultura de células em suspensão da espécie em questão, fazendo uso das técnicas que a biotecnologia oferece.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lignina

Lignina é uma denominação para macromolécula de origem fenilpropanoídica de unidade constitucional básica (C_6C_3), distribuída amplamente entre os vegetais superiores (LEWIS & SARKANEN, 1998), com propriedades caracterizadas pela ação cimentadora da parede celular, considerada depois da celulose, como o polímero natural renovável que detém cerca de 30% dos carbonos da biosfera (FENFEL & WEGENER, 1984).

A lignificação é um processo que começa na parede primária e na lamela média se estendendo através da parede secundária em direção ao lúmen (DONALDSON, 2001).

O fenômeno da lignificação também é uma resposta ativa das plantas a invasão por patógenos (HAMMERSCHIMDT & KUC, 1982; BUSAM et al., 1997-b; STICHER et al., 1997) e acumulam-se evidências de que se constitui em importante mecanismo de defesa (VANCE et al., 1980; HAMMERSCHIMDT & KUC, 1982; AGRIOS, 1997; BUSAM et al., 1997-a; STICHER et al., 1997).

A lignina é formada pela oxidação desidrogenativa dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 1) (BOUDET et al., 1995; WHETTEN et al., 1998).

A fase final da biossíntese da lignina é denominada desidrogenação enzimática de precursores monolignóis, gerando os radicais fenóxidos (FREUDENBERG, 1959).

A lignina pode ser diferente entre espécies, tecidos, estágios de desenvolvimento e localização celular. Essas variações podem resultar das diferenças das atividades enzimáticas com o substrato específico das Angiospermas e Gimnospermas (LEWIS & YAMAMOTO, 1990).

Assim, a lignina possui composição diferente para Pteridófitas, Gimnospermas, Angiospermas (Monocotiledôneas e Dicotiledôneas). O teor de lignina corresponde a um total em média de 30% para coníferas e 25% para dicotiledôneas de zona temperada (MENDES & ALVES, 1986).

A lignina é detectada em maior quantidade na camada S2 da parede secundária, sobretudo nas fibras, vasos e traqueídeos do xilema, dotando-os de rigidez, suporte mecânico, impermeabilidade, permitindo o transporte de água e solutos. Ela também é encontrada, em menor quantidade, na periderme associada à suberina onde age como uma barreira contra patógenos (STUDART-GUIMARÃES et al, 2003).

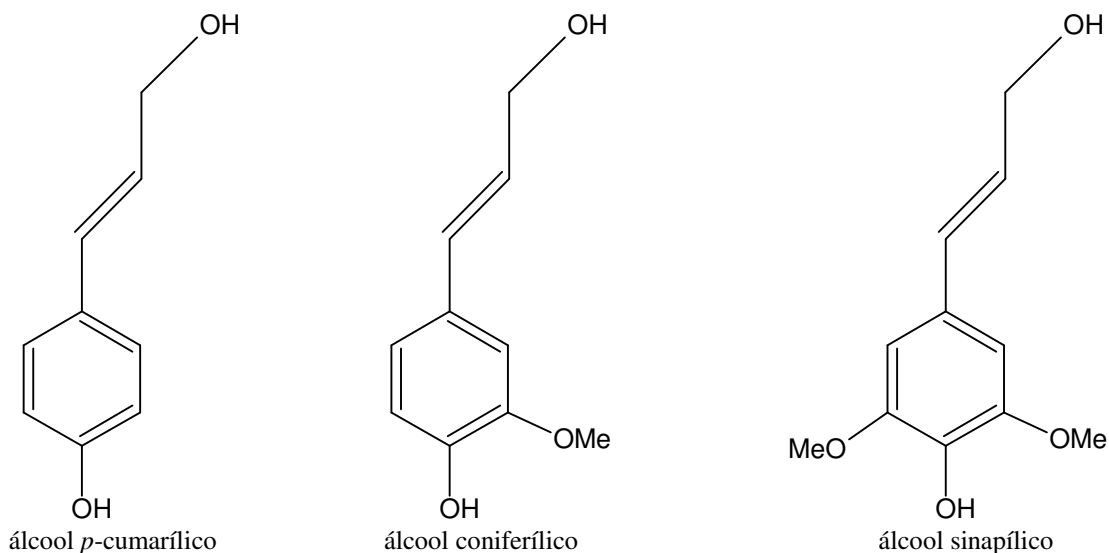


Figura 1. Estruturas moleculares dos precursores majoritários da lignina

2.2 Biossíntese das ligninas

Em 1933, ERDTMAN postulava que a lignina era formada por desidrogenação enzimática dos álcoois *p*-hidróxido cinamílico, coniferílico e sinapílico. Esta hipótese foi, mais tarde, confirmada e elaborada por um dos experimentos de FREUDENBERG (1959) através da polimerização do álcool *p*-hidróxido cinamílico *in vitro* com a enzima lacase ou peroxidase (GRISEBACH, 1977).

A biossíntese da lignina pode ser dividida em duas etapas, a enzimática e a semi-enzimática. No primeiro caso a fenilalanina amônio liase (FAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), e ácido cafeico O-metiltransferase (COMT), assim como enzimas específicas como cinamoil-CoA redutase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD) são enzimas do caminho fenilpropanoíde (RAMOS et al., 2001).

A biossíntese das ligninas (Figura 2) envolve uma adequação coordenada de três fases biossintéticas: a fase pré-corísmica, a fase fenilpropanoídica e a fase da polimerização da lignina. A fase pré-corísmica é a via responsável pela formação dos ácidos chiquímico e corísmico, os quais são importantes em uma variedade de produtos essenciais (HERRMANN, 1995).

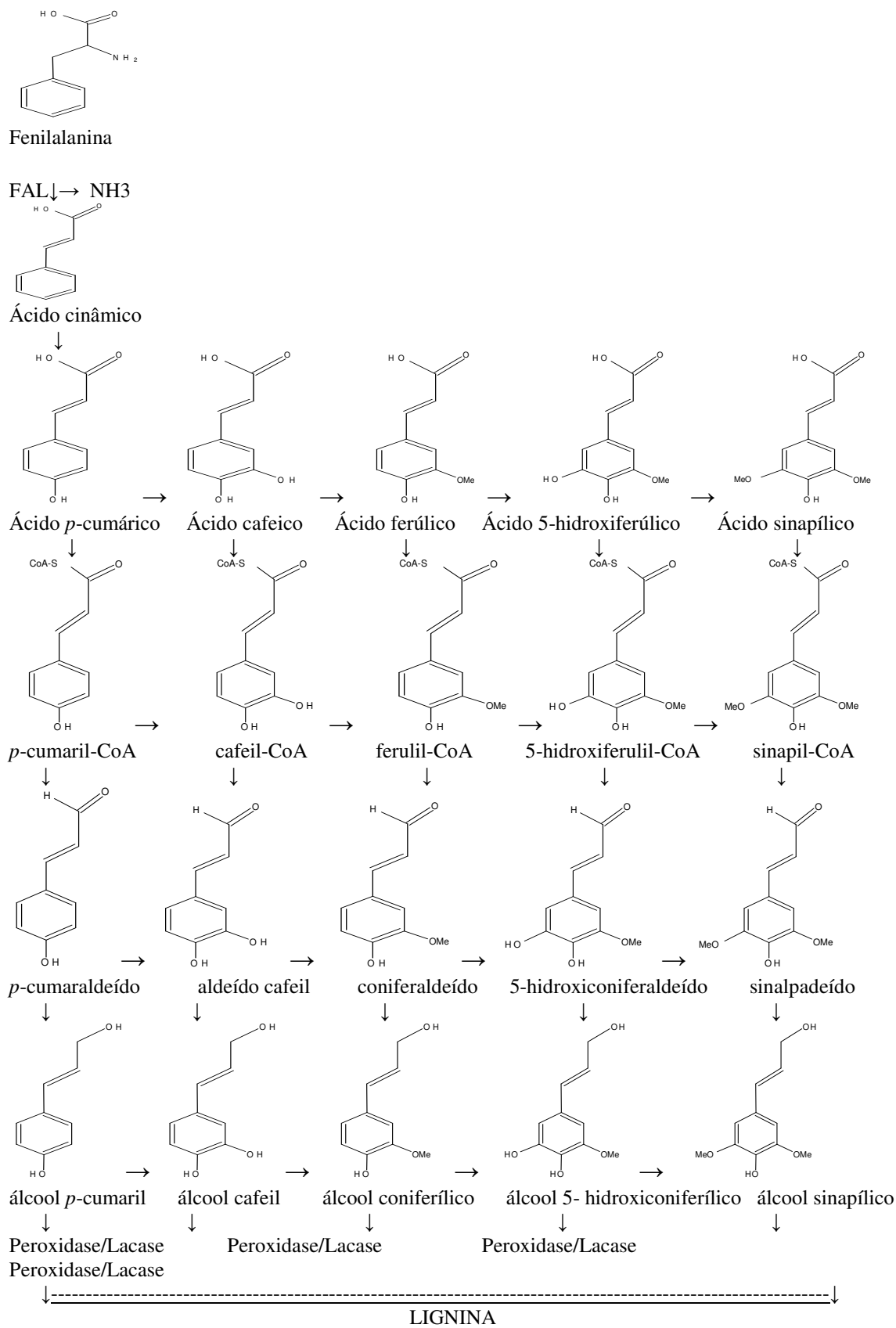


Figura 2. Caminho proposto para a biossíntese dos precursores da lignina (BOERJAN, et al., 2003)

A via geral dos fenilpropanóides começa com a formação a partir da presença de fenilalanina e envolve sucessivas reações de hidroxilação de anéis aromáticos, seguidas de *O*-metilação fenólica e conversão do grupo carboxílico a álcool (BOERJAN, et al., 2003) resultando no ácido cinâmico (BARBER & MITCHELL, 1997). O primeiro passo dessa via inicia-se com uma reação catalisada pela enzima fenilalanina amônio-liase (FAL) pela eliminação do grupo NH₃ da fenilalanina ou do ácido orogênico (RAMOS, et al., 2001; LEWIS & SARKANEN, 1998) para resultar em monolignóis. Nas plantas esta enzima está localizada tanto no citoplasma quanto nas organelas. O metabolismo dos fenilpropanóides é definido como a seqüência de reações envolvendo a conversão da fenilalanina para ativar o ácido cinâmico (HAHLBROCK & GRISEBACH, 1975).

A reação de formação do ácido cinâmico também pode ser catalisada por outra enzima, a tirosina amônio-liase (TAL), ou seja, quando ocorre eliminação do grupo NH₃ do ácido aminado tirosina. Estas enzimas catalisam a *trans*-eliminação da amônia da fenilalanina ou da tirosina para formar o ácido *trans* cinâmico e o *p-trans* cinâmico (WHETTEN et al., 1998).

Essa transaminação, troca da carbonila pelo grupo NH₂, ocorre no ácido orogênico. Há interesse em formar grupos NH₂, os quais fazem parte dos ácidos aminados fenilalanina e tirosina, substâncias iniciais no processo de formação da lignina. Essas enzimas são enzimas regulatórias “chaves” e um dos principais pontos de controle do metabolismo secundário dos vegetais (BELL, 1981).

A FAL é uma enzima tetramérica, com dois sítios ativos por molécula (BOLWELL, 1988). Aparentemente, as isoenzimas isoladas individualmente apresentam cinética de Michaelis-Menten, mas em conjunto apresentariam cooperatividade negativa (WHETTEN & SEDEROFF, 1995).

Sua atividade é influenciada por vários fatores externos e internos, como: hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por patógenos e ferimentos. A invasão de fungos, por exemplo, induz a transcrição do RNAm que codifica para essa enzima, aumentando assim sua síntese “de novo” e, conseqüentemente, estimulando a produção de substância fenólica (JONES, 1984).

A partir do ácido cinâmico são produzidos diversos fenilpropanóides simples, via uma série de reações de hidroxilação, metilação e desidratação, tais como os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico e as cumarinas simples, além dos ácidos salicílico, benzóico e *p*-hidroxibenzóico que, embora tenham perdido uma cadeia lateral de carbono, também se originam do cinamato e *p*-cumarato (DIXON & PAIVA, 1995).

O ácido cumárico sofre uma hidroxilação na posição 3 pela *p*-cumarato-3-hidroxilase e forma o ácido cafeico. Enzimas que podem atuar nesta reação de hidroxilação *in vitro* têm sido purificadas, mas não existem evidências que suportam a via fisiológica destas enzimas na biossíntese de monolignóis *in vivo* (WHETTEN & SEDEROFF, 1995).

Através da enzima O-metiltransferase (OMT) o ácido cafeico sofre uma metilação na hidroxila de posição 3 para produzir o ácido ferúlico.

O ácido ferúlico pode ser ativado pelo 4-cumarato-CoA ligase (4CL) através da conjugação com a coenzima A e os tioésteres CoA, presumidos como intermediários da síntese do álcool coniferílico e do álcool *p*-cumarílico, respectivamente. Um destino alternativo para o ácido ferúlico é a hidroxilação na posição 5 por outra enzima hidroxilase (P450), a ferulato-5-hidroxilase. O ácido 5-hidroxiferúlico pode ser metilado pela enzima O-metiltransferase produzindo, dessa maneira, o ácido sinápico. Em muitos casos o ácido sinápico, no entanto, tem sido mostrado como um substrato pobre para

purificar enzimas *in vitro* (GROSS et al., 1975; KITSUKI et al., 1982; LÜDERITZ et al., 1982; VOO et al., 1995).

Tanto o ácido cumárico, o ferúlico quanto o sinápico são transformados em álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinápfico, respectivamente, os quais sofrem uma polimerização oxidativa resultando na lignina.

Neste processo de polimerização atuam as enzimas lacases ou peroxidases e isoenzimas correspondentes. A participação destas enzimas na formação da lignina foi também estimada por HARKING & OBST (1973).

2.3 Fitorreguladores em meio de cultura

A adição de fitorreguladores no meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Ao mesmo tempo, a adição de fitorreguladores estimula certa resposta como o alongamento ou a multiplicação da parte aérea. Essa resposta depende do estado fisiológico dos explantes, o que está relacionado com a época do ano e com o estado geral da planta-matriz (ALTMAN & GOREN, 1977).

Segundo XU & BEWLEY (1992), as auxinas, em particular o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 3), são extremamente importantes na indução da calogênese e células embriogênicas e na posterior remoção da auxina do meio de cultura. Estas células embriogênicas formam embriões somáticos. Além disso, o 2,4-D possui uma aplicação relevante no estudo da lignificação através de células em suspensão de várias espécies e com os mais variados objetivos (EBERHARDT et al., 1993).

As auxinas são hormônios vegetais produzidos principalmente nas regiões apicais que, transportados para outros locais da planta, participam do seu crescimento e diferenciação. Esses fitorreguladores podem ser necessários para complementar o teor endógeno ou suprir as necessidades de meristemas isolados (SMITH & MURASHIGE, 1970). Estes autores sugerem que as zonas produtoras de auxina não são propriamente os meristemas, e sim os primórdios foliares e as folhas em expansão. Isto poderia explicar a razão pela qual a auxina não é tão necessária quando gemas maiores são utilizadas para cultivo.

Quantidades excessivas de auxina sintética 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tendem a estimular a formação de calo.

As auxinas são utilizadas em concentrações muito baixas para reativar o ciclo da célula e iniciar a formação do embrião. Porém, um outro regulador tem se mostrado muito eficiente, é o caso do TDZ [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia], uma citocinina sintética que induz a acumulação de auxinas e citocininas endógenas no tecido (MURTHY et al., 1995).

As auxinas são muito utilizadas, principalmente em experimentos de micropropagação, pois são incorporadas ao meio de cultura para promover a formação de calos, crescimento de células em suspensão, além de regular a morfogênese, especialmente associada às citocininas.

As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990). As concentrações influenciam na multiplicação *in vitro*, onde normalmente a melhor faixa fica entre 0,5 e 5,0 mg/L para ambos fitorreguladores (MORALES et al., 1999). Segundo LITZ & JARRET (1991),

freqüentemente se induz a formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina, ou com uma alta relação citocinina / auxina em proporções iguais.

Para o estabelecimento de um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*, é necessário um adequado balanço entre auxinas e citocininas (WAGNER JUNIOR *et al.*, 2003). Normalmente, as concentrações de auxinas são inferiores as das citocininas, mantendo o balanço auxina /citocinina menor que 1 (PIERIK, 1990).

Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (KRIKORIAN, 1995).

GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) descreveram a indução da calogênese em meio de cultura com altas concentrações de auxinas, sendo 2,4-D um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (AMMIRATO, 1983).

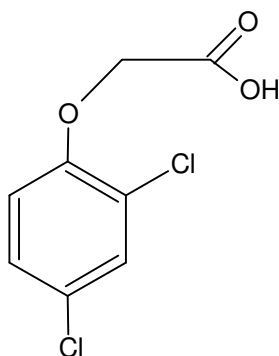


Figura 3. Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Alguns autores citam a influência do TDZ na formação de calos. HUETTEMAN & PREECE (1993) citam o TDZ (tidiazuron) como um excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0 mM. WILHELM (1999) menciona que concentrações mais altas dessa citocinina proporcionam a produção de calos mais volumosos.

Segundo KANEDA *et al.*, (1997) a melhor performance do TDZ pode estar relacionada a maior atividade citocinínica ou a forma de ação diferente de outras citocininas durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular, como também ao fato de o TDZ induzir a acumulação de auxinas e citocininas endógenas no tecido (MURTHY *et al.*, 1995).

Assim como o TDZ apresenta respostas consideráveis para a formação de calos, o 2,4-D se mostrou eficiente ao permitir formação de calos em todos os tratamentos com concentrações variando de 0 a 15 μ M em duas cultivares de morangueiro, exceto naqueles isentos das auxinas 2,4-D (FLORES *et al.*, 1998).

Embora o 2,4-D tenha se mostrado eficiente na produção de calos, MURTHY *et al.*, (1998) cita a melhor performance do TDZ em relação a outros reguladores de crescimento na proliferação de tecido calogênico.

VELHO *et al.*, (1988) e FERREIRA *et al.*, (2001) mostraram que o cupuaçu não tem apresentado dificuldades para gerar calos usando-se o meio MS com a adição de baixas concentrações de 2,4-D, sendo a eficiência na emissão de calos aumentada pela adição de ANA (ácido α -naftalenoacético).

De acordo com VENTURIERI & VENTURIERI (2004), o TDZ não produziu melhoras na indução de calos desejáveis para virem a ser aproveitados para a organogênese ou embriogênese somática do híbrido de *Theobroma grandiflorum* x

Theobroma obovatum diferentemente do que foi observado para o cacau por LI et al., (1998).

No entanto, ALVES et al., (2004) citam que os melhores resultados para calejamento foram constatados nos tratamentos com os reguladores de crescimento TDZ e ANA. A vantagem da utilização dos reguladores de crescimento TDZ e ANA foi citada por LU (1993), cujos estudos indicaram que o TDZ apresenta maior eficiência na presença de ANA. Contudo, esse autor afirma que longas exposições ao TDZ não são recomendadas, pois podem causar hiper-hidricidade, crescimento anormal de gemas e dificuldade no enraizamento.

Segundo LUCZKIEWICZ et al., (2002), modificações no tipo e na concentração da auxina no meio de cultura, provaram que o 2,4-D foi o regulador de crescimento que estimulou o crescimento de calos de *Rudbeckia hirta* L. de forma mais acentuada. Uma outra correlação direta entre crescimento de calos e concentração de auxina foi observada na presença de ANA e IBA (ácido indol-3-butírico).

Conforme AKITA et al., (2000), as células dos calos provenientes dos segmentos de hipocótilos de beterraba (*Beta vulgaris*) tiveram um crescimento rápido e uniforme na presença de 10^{-7} M de 2,4-D, sendo esta auxina eficiente na produção de metabólitos secundários como a betacianina.

De acordo com PALÚ et al., (2004) houve uma interação significativa entre 2,4-D e a cinetina na indução de calos para a cultivar Acaiá Cerrado (uma cultivar de café - *Coffea arabica* L.), enquanto que para massa fresca dos calos, somente houve efeito significativo dos fatores isolados. Segundo estes mesmos autores, o aumento da produção de calos ocorreu até a concentração de 2 mg/L de 2,4-D, ponto a partir do qual este regulador de crescimento passou a inibir a calogênese, provavelmente devido ao efeito fitotóxico promovido por concentrações superiores. A melhor resposta para indução de calos foi promovida pela interação entre 2,4-D (2 mg/L) e cinetina (1,9 mg/L).

As concentrações dos fitorreguladores variam muito de espécie para espécie e em função do que se quer obter. Em alguns casos a concentração de 0,5 mg/L de 2,4-D produz calos, no entanto HUAN et al., (2004), trabalhando com indução de calos e regeneração de plantas através de estruturas de embriões somáticos em *Cymbidium*, perceberam a morte de todos os explantes quando utilizou somente 2,4-D ou combinado com TDZ.

Níveis elevados de 2,4-D aumentaram consideravelmente a friabilidade de calos embriogênicos de *Cymbopogon martinii* (PATNAIK et al., 1997), e segundo BARUAH & BORDOLOI (1989), suplementos orgânicos, como a caseína hidrolisada, não foram necessários para a produção de calos embriogênicos friáveis.

Calos formados em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de cinetina foram capazes de atuar na biossíntese de lignina, após tratamento com os ácidos sinápico e ferúlico (HAMADA et al., 2003). Isso mostra que o 2,4-D é de grande importância na calogênese por ser capaz de produzir calos para os mais diversos objetivos.

FALCO et al., (1996) trabalhando com cana de açúcar, tiveram respostas consideráveis ao inocular segmentos foliares no meio MS suplementado com 1, 2 ou 3 mg/L de 2,4-D, para indução de calos.

2.4 Calogênese e células em suspensão

Um calo consiste de uma massa desorganizada de células e parcialmente diferenciada que varia quanto ao tipo, tamanho, conteúdo e espessura da parede celular. Traqueídeos, células parenquimáticas, tecido cambial e periderme podem ser formados durante a calogênese (NARAYANASWAMY, 1977). Frequentemente um calo é formado a partir de explante de raízes, de folhas ou de caule. Ao utilizar a técnica de cultura de tecido, a formação de calos pode ser induzida em vários tecidos ou órgãos de plantas que não são usualmente responsáveis pelo desenvolvimento de calos (STREET, 1969).

Embora maior ênfase tenha sido dada para tecidos de angiospermas, a formação de calos tem sido observada também em Gimnospermas e Pteridófitas (YEOMAN & MACLEOD, 1977).

Através de injúrias mecânicas, calos podem ser produzidos por tecidos de plantas contaminados por certos microrganismos (BRAUN, 1954).

Em geral, o crescimento de calo envolve uma complexa relação entre o material utilizado como explante, a composição do meio de cultura e a condição propícia para simular o ambiente natural das plantas durante o período de incubação. O estabelecimento dos calos a partir dos explantes pode ser dividido em três fases: indução, divisão celular e diferenciação. Durante a fase de iniciação, o metabolismo é estimulado e as células se preparam para a divisão. O tempo de duração desta fase depende principalmente do estado fisiológico do explante, assim como da condição do meio de cultura. Na sequência, existe uma fase de ativação da divisão celular, na qual o explante é revertido para um estágio meristemático. A terceira fase envolve o aparecimento da diferenciação celular e a expressão da trajetória de metabólitos para a formação de produtos secundários (AITCHISON, 1977). Certos aspectos da acumulação de produtos secundários, como resposta da diferenciação da cultura de calos, têm sido revisados (YEOMAN et al., 1982).

Alguns calos são fortemente lignificados e passam a apresentar uma textura mais rígida, fazendo com que estes sejam divididos com maior facilidade em pequenos fragmentos. Quando são facilmente separados são denominados calos friáveis. Podem apresentar colorações amareladas, brancas, verdes ou pigmentadas com antocianina, essa pigmentação pode ser uniforme em toda a extensão do calo, ou algumas regiões podem permanecer sem pigmento (DODDS & ROBERTS, 1985).

Um dos grandes problemas que envolvem a cultura de calos é a oxidação, principalmente quando se trabalha com espécies lenhosas. Entretanto, várias substâncias podem ser usadas como antioxidante. O PVP (antioxidante PoliVinilPirrolidona), por exemplo, é uma poliamida utilizada em cromatografia de separação de ácidos aromáticos, aldeídos e fenóis pela sua função adsorvente por meio de ligações de ponte de hidrogênio, o que previne a oxidação e a polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas (TEIXEIRA, 2001).

Para prevenir a oxidação em explantes de oliveira, RUGINI (1990) adicionou 200 mg/L de glutatona reduzida. Visando inibir a oxidação fenólica, SÖNDAHL & SHARP (1977) adicionaram 10 a 50 mg/L de cisteína-HCl ao meio de cultura. Um outro antioxidante utilizado com menor frequência é o ditioneitol (ZIV & HALEVY, 1983).

A oxidação é observada pelo escurecimento que pode ocorrer antes mesmo dos calos serem formados, ainda na fase do estabelecimento dos explantes quando os tecidos são lesados, tornando-se um sério problema.

Para reduzir o escurecimento, diversas técnicas são utilizadas durante o preparo do explante e do meio de cultura bem como na fase de incubação das culturas. Segundo PASQUAL et al., (1997), a oxidação é menos severa em meios de cultura com baixas concentrações de sais. Substâncias antioxidantes, como o ácido cítrico e o ácido ascórbico, são também utilizadas para reduzir a oxidação em cultura *in vitro*. Estas agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas (varredor de peróxido de hidrogênio) e também atuam por mecanismos alternativos. Provavelmente, o ácido cítrico atua como um agente quelante, retendo íons de metal, que são necessários para ativar enzimas oxidativas (PASQUAL et al., 1997).

Para prevenir a ação polifenólica em bananeira (*Musa AAB.*), UTINO et al., (2001) adicionaram ácido cítrico, ácido ascórbico e carvão ativado, separadamente, ao meio. Os autores verificaram que o ácido ascórbico foi mais efetivo do que o ácido cítrico e o carvão ativado, na concentração de 25 mg/L. Dentre estes, o ácido ascórbico tem sido o mais utilizado (VUYLSTEKE & DE LANGHE, 1985; GUPTA, 1986; LAMEIRA, 1987; SOUZA & GONÇALVES, 1996). O escurecimento de explantes é mais visível em meio sólido, pois as substâncias fenólicas exudadas para o meio acumulam-se ao redor do explante.

Assim, uma prática eficiente para evitar a oxidação dos tecidos é transferir os explantes, freqüentemente, para um novo meio. O intervalo entre transferências deve ser ajustado de acordo com o grau de oxidação, pois o escurecimento é particularmente mais intenso na fase inicial do estabelecimento e decresce com o tempo (PASQUAL et al., 1997; VUYLSTEKE, 1989), porém pode levar tanto o explante como o calo à morte.

LANDA et al. (2000) inocularam explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) tanto na presença quanto na ausência de luz e observaram que a formação de calos na presença de luz foi melhor que no escuro inicialmente, porém a partir do vigésimo dia de inoculação o desenvolvimento dos calos cultivados no escuro foi melhor até a avaliação final aos 60 dias. Entretanto, com intuito de obter a biotransformação de substâncias fenólicas a partir de células em suspensão de *Catharanthus roseus*, SHIMODA et al., (2002), fizeram a indução de calos na presença de luz.

Para copaíba (*Copaifera sp.*), a formação de calos apresentou respostas em total ausência de luz num período de 45 dias (OLIVEIRA et al., 2001). Já a espécie *Fragaria sp.* (morangueiro) teve seus explantes inoculados no meio de indução de calos em um fotoperíodo de 16 h (FLORES et al., 1998).

Suspensão de células é um procedimento artificial de crescimento de células vegetais, onde as células são isoladas a partir de calos em meio de cultura líquido.

A produção de metabólitos secundários de interesse comercial a partir de culturas bacterianas influenciou na cultura de células em suspensão a partir de regiões das plantas onde esses metabólitos são produzidos (BERLIN, 1988; SAKUTA & KOMAMINE, 1987), embora existem muitos insucessos na produção de produtos secundários (BERLIN, 1988). A principal razão para estes insucessos é a falta de conhecimento sobre os mecanismos reguladores da formação destes metabólitos (SAKUTA & KOMAMINE, 1987).

Quando a estabilidade genética é alcançada é necessário classificar as diferentes linhagens de calos de acordo com as suas respostas para prover uma eficiente produção de metabólito. Portanto, cada calo deve ser analisado separadamente pela sua velocidade de crescimento, assim como as concentrações dos metabólitos intra e extracelulares. Isso permite uma avaliação da produtividade de cada célula, logo

somente as melhores serão levadas para a etapa de célula em suspensão (BOURGAUD, et al., 2001).

Comparado ao crescimento cinético da célula, o qual é usualmente uma curva exponencial, muitos metabólitos secundários são produzidos durante a fase de platô, ou seja, quando o crescimento fica constante. Esta falta de produção durante os estágios anteriores pode ser explicada pela alocação do carbono principalmente distribuído pelo metabolismo primário (construção das estruturas da célula e respiração) quando o crescimento é muito ativo. Por outro lado, quando o crescimento pára, o carbono não é mais requerido em grandes quantidades para o metabolismo primário e as substâncias especiais são mais ativamente sintetizadas. Isto pode ser frequentemente observado em muitas novas atividades enzimáticas, aparecendo durante a fase de platô. Isto tem levado muitos autores a explicar a possível diferenciação bioquímica das células quando a fase de crescimento termina (PAYNE et al., 1991). No entanto, alguns produtos secundários são conhecidos por ter um crescimento associado com células indiferenciadas, como é o caso das betalainas e dos carotenóides.

Células em suspensão constituem um bom material biológico para o estudo das vias biossintéticas. Realmente, comparado com culturas de calos, a suspensão permite a recuperação de grandes quantidades de células a partir de enzimas que podem ser mais facilmente isoladas (DOUGALL, 1981). Muitas estratégias podem ser usadas para aumentar a produção de metabólitos secundários, mas a elicitação é usualmente uma das mais sucedidas. Isto consiste em aplicar estresse físico ou químico na cultura de célula em suspensão que dará início a produção de metabólitos secundários que não são produzidos normalmente. Isto é feito com ativadores bióticos (micélio de fungo patogênico, extratos de proteínas, entre outros) ou abióticos (temperatura, luz UV, metais pesados, pH, etc.) (BOURGAUD, et al., 2001).

Suspensão celular tem sido também adotada como uma ferramenta no estudo da fisiologia de todos os tipos de outros processos celulares, por exemplo, divisão celular, respiração, sinalização hormonal, armazenamento, e transporte (LEGUAY & GUERN, 1975; NISHINARI & YAMAKI, 1976; VOGEL & BRODELIUS, 1984; SNAPE, et al., 1989; NEUMAN & ZENK, 1986; DEUS-WINK & MENDE, 1987; BLOM, et al., 1991; HOEFNAGEL, et al., 1993).

Após serem formados, os calos são transferidos para o meio MS líquido para iniciação de cultura em suspensão (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Durante o processo de formação de calos e células em suspensão, os metabólitos primários e secundários são formados e muitas vezes excretados ao meio de crescimento. Essa técnica permite o desenvolvimento de experimentos *in vitro* para sanar algumas questões relacionadas ao sistema de polimerização das ligninas e a participação das proteínas estruturais neste processo.

Independentemente da espécie a ser utilizada é essencial que as células da suspensão se dividam e se multipliquem ativamente. A divisão celular é um componente do ciclo celular, e possui as seguintes fases: G1, S, G2, M e citocinese (STREET & OPIK, 1970).

Este processo é utilizado para a obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura, além de ser uma técnica eficiente de multiplicação rápida. As suspensões celulares têm uma grande aplicação para os estudos de bioquímica, genética, citologia, fisiologia vegetal e fitopatologia, também sendo um tipo de cultivo empregado na produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial pela utilização de biorreatores (PEREIRA & MELO, 2004).

Há um tempo atrás se considerava que células não diferenciadas como cultura de calos ou de células em suspensão, não eram eficazes para estudo de qualquer tipo de metabólito secundário (KRIKORIAN & STEWARD, 1969). No entanto, ZENK (1991) demonstrou que essa teoria estava errada ao observar que cultura de células de *Morinda citrifolia* produziu 2,5 g de antraquinona por litro de meio de cultura.

A cultura de células em suspensão também tem sido usada não só para produção ou estudo de metabólitos secundários, mas também para estudos de resistência a bactérias em determinadas culturas, como é o caso do algodão (*Gossipium hirsutum* L.) (KOBAYASHI & VIEIRA, 2000).

Para o estudo de embriogênese somática de *Cymbopogon martinii* a partir de células em suspensão, a concentração de 13,6 µM de 2,4-D foi eficiente (PATNAIK et al., 1997). Para induzir resistência a bactérias em algodão, a concentração de 0,5 mg/L de 2,4-D mostrou resultados satisfatórios. No entanto, para regeneração *in vitro* de amendoim (*Arachis villosulicarpa* Hoehne), o meio líquido para suspensão foi suplementado com 1,0 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina) (MANSUR et al., 1993).

A ausência de luz em cultura de células em suspensão de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) visando a regeneração de plantas para estudos histológicos foi também estudada (FALCO et al., 1996).

Células em suspensão oriundas de calos subcultivados mostraram as mesmas características na produção de pigmentos que indicavam metabólitos secundários, como a betalaína, tendo a cultura em suspensão mantido suas propriedades por mais de 5 anos (AKITA et al., 2000). Para a produção de bisfenol A (produto largamente usado para a produção de plásticos, poliéster, entre outros) a partir de células em suspensão de *Eucalyptus perriniana* não foram mencionadas subculturas das células em suspensão (HAMADA et al., 2002). No entanto, para a análise das respostas de hortelã (*Mentha*) em diferentes concentrações de 2,4-D foram feitas subculturas a cada duas semanas (YANG et al., 1999).

Segundo FALCO et al. (1996), trabalhando com cana de açúcar, o período de três meses foi, de uma forma geral, adequado para obter uma completa regeneração desta planta, em suspensão.

TABATA (1977) tem mencionado que metabólitos secundários em culturas de células vegetais foram acumulados durante a fase estacionária em muitos casos.

O uso de 2,4-D para a produção de substâncias fenólicas a partir de células em suspensão também foi citado com eficiência na resposta que esta auxina provoca em hortelã na descrição do processo de crescimento da célula (YANG et al., 1999).

Para a detecção da produção ou não de uma determinada substância produzida pela cultura de células em suspensão muitas análises são realizadas, como ressonância magnética de ¹³C ou de ¹H, que foram usados para caracterizar substâncias derivadas de lignina produzidas em cultura de *pinus* (EBERHARDT et al., 1993).

2.5 Lignificação e células em suspensão

O estudo do processo de lignificação através de cultura de calos e de células em suspensão pode estar relacionado a vários objetivos diferentes, um deles é a caracterização *in situ* da lignina de uma determinada espécie, como em *Pinus taeda* (EBERHARDT et al., 1993).

MOLLER et al., (2006) utilizaram a técnica de suspensão celular para observar os aspectos enzimáticos e topoquímicos da lignificação.

O estudo da lignificação através da cultura de células em suspensão foi usado por KARKÖNEN et al. (2002), para mensurar a atividade de um número de enzimas envolvidas no processo de formação da lignina, pois a cultura de células é um modelo adequado para estudar esse processo, uma vez que as células ficam soltas umas das outras no meio de cultura líquido.

A utilização de alguns reguladores de crescimento tem sido muito associada ao estudo da lignificação, como é o caso do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e do BA (6-benziladenina) no meio de cultura para suspensão celular pelos efeitos destas substâncias na lignificação, os quais permitem que as células se formem em grandes agregados influenciando na formação da lignina (KUBOI & YAMADA, 1978).

A lignificação também pode ser induzida em culturas de células pela combinação do ANA (ácido α -naftalenoacético) com o BA (benzilaminopurina), sendo este sistema utilizado para investigar a relação entre atividades enzimáticas e a lignificação. Em cultura de células de salsa (*Petroselinum hortense*) e de trigo (*Triticum aestivum*), a atividade enzimática coincidiu com a lignificação, sendo possível observar a presença desse tipo de enzima em todas as culturas de células lignificadas (HOSEL et al., 1982).

Muitos estudos têm sido realizados sobre a limitação da digestibilidade e a utilização de forrageiras, devido às características da parede celular e aos efeitos causados pela composição da lignina nos ruminantes. A partir disso, surgiu a idéia de alterar a estrutura da lignina, por manipulações na via biossintética, modificando a digestibilidade da parede celular. Essas alterações podem ser realizadas através de técnicas de suspensões celulares para influenciar no processo de lignificação e com isso alterar as enzimas que estão associadas a formação da parede celular (RALPH et al., 2005).

Algumas substâncias são utilizadas para promover o processo de lignificação no meio de cultura como é caso dos dilignóis, que promoveram a lignificação nos traqueídeos de zinia (*Zinnia*), na qual a biossíntese de monolignol foi bloqueada por um inibidor da fenilalanina amônio liase (FAL) sugerindo que os dilignóis podem atuar diretamente na polimerização da lignina (TOKUNAGA et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Madeira, do Departamento de Produtos Florestais, do Instituto de Florestas, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As sementes de *Eucalyptus urophylla* para produção de explantes foram adquiridas do IPEF (IPEF-ESALQ), Piracicaba-SP.

3.1 Assepsia

Esta etapa consistiu na desinfestação das sementes, sendo de muita importância por permitir a obtenção de um tecido descontaminado sem levá-lo à morte quando isolado, pois várias substâncias com ação germicida são utilizadas. Algumas gotas de detergente foram comumente adicionadas às soluções a base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos, como é o caso do Tween 20, o qual é mais utilizado em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v). Neste caso, as sementes de *Eucalyptus urophylla* foram submetidas às seguintes condições de assepsia na capela de fluxo laminar: desinfestação em hipoclorito de sódio 1% na presença de 0,2 mL/L de Tween 20 por 20 minutos em um becher, em repouso. Em seguida as sementes foram lavadas de 3 a 5 vezes em água bidesionizada e autoclavada e desinfestadas na presença de peróxido de hidrogênio por 30 minutos em repouso (é necessário que a solução cubra as sementes). Após a desinfestação final com o peróxido de hidrogênio, as sementes foram inoculadas ao meio de cultura para germinação.

3.2 Inoculação das sementes

Após a etapa de desinfestação, as sementes foram inoculadas no meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (Tabela 1) para germinação e posterior desenvolvimento das plântulas (Figura 4), sendo colocadas 20 a 25 sementes por recipiente. O recipiente utilizado foi o vidro de maionese com tampa e capacidade de 220 ml de capacidade, para cada recipiente foi utilizado 50 ml do meio de cultura. As sementes foram submetidas a um fotoperíodo de 16/8 horas (16h no claro e 8h no escuro) a uma temperatura de 25°C. As mudas geradas foram utilizadas como fonte de explantes.

Para a germinação de *E. urophylla* foi utilizado um protocolo estabelecido por WATT et al., (1991), que obteve resultados satisfatórios a partir da utilização deste meio modificado para germinação.

Tabela 1. Meio MS modificado para germinação de *Eucalyptus urophylla* (WATT et al., 1991).

Macronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/L	Vitaminas	mg/L	Hormônios	mg/L
(NH ₄)NO ₃	1650	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Mio-inositol	100	Cinetina	0,05
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	Ácido nicotínico	5	AIA	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6,2	Piridoxina.HCl	5	BAP	0,11
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	KI	0,83	Tiamina.HCl	10	Ácido naftalenoacético	4
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Glicina	2		
Ferro		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	Pantotenato de cálcio	0,1	Sacarose	30.000
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	33,6	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	Biotina	0,1	Agar	8 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8					pH 5,7	
						Benlate (fungicida)	100



Figura 4. Perfil estrutural do desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus urophylla* obtidas a partir da germinação de sementes em meio MS modificado aos 30 dias.

3.3 Cultura de calos

Os explantes foliares foram retirados das plântulas que apresentaram maior vigor (Figura 5). Após 30 dias no meio MS, esses explantes foram inoculados no meio MS modificado para formação de calos de *Eucalyptus urophylla* na ausência de luz por 90 dias (Tabela 2) a uma temperatura de 25°C. Foram colocados 5 explantes por vidro de maionese contendo 50 ml do meio. Por vidro eram colocados explantes do mesmo vidro da germinação, ou seja, de um vidro de maionese com as mudas germinadas eram retirados 5 explantes, não misturou-se explantes de vidros de germinações diferentes.

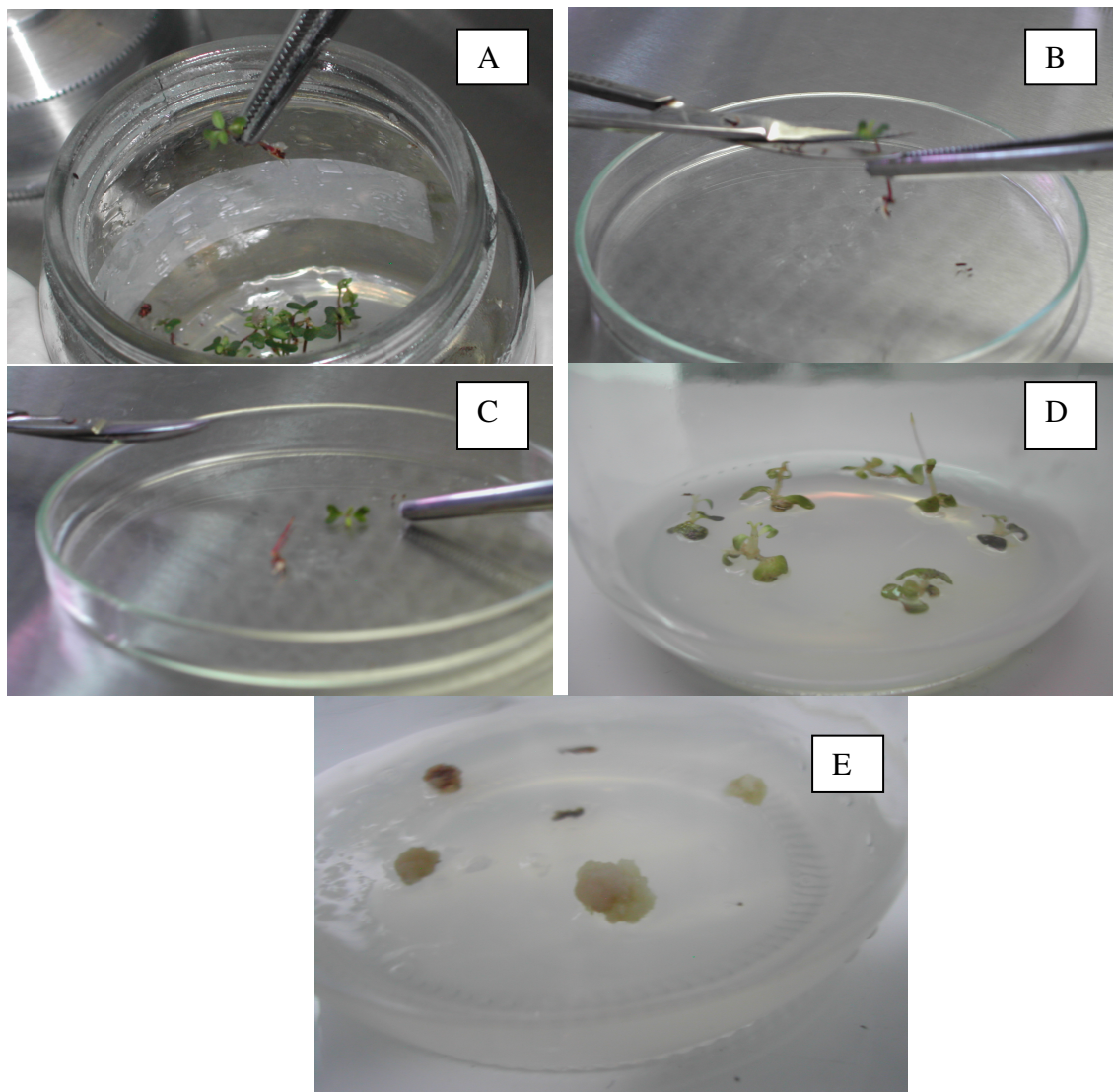


Figura 5. Cultura de calo: (A) Escolha do explante; (B e C) Corte do explante; (D) Inoculação do explante no meio para calo; (E) Calo formado de *Eucalyptus urophylla*

Tabela 2. Meio MS utilizado para indução de calos de *Eucalyptus urophylla* (WATT et al., 1991).

Macronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/L	Hormônios	mg/L
(NH ₄)NO ₃	1650	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Cinetina	0,1
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	AIA	10
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6,2	BAP	-
MgSO ₄ .6H ₂ O	370	KI	0,83	Ácido naftoacético	-
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	2,4- D	1
NH ₄ H ₂ PO	-	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025		
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	Sacarose	30.000
Ferro		Vitaminas		pH 5,7	
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	33,6	Mio-inositol	100	Fitagel	4 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	Ácido nicotínico	0,5	Benlate (fungicida)	100
		Piridoxina.HCl	0,5	PVP	800
		Tiamina.HCl	0,1		
		Glicina	2,00		

Para evitar problemas com contaminação fúngica foi adicionado, ao meio de cultura para indução de calos e para germinação, 100 mg/L do fungicida Benlate no meio de cultura antes deste ser autoclavado.

Por se tratar de uma espécie lenhosa foi necessário levar em consideração a possibilidade de ocorrer oxidação devido à liberação de substâncias fenólicas no momento do corte dos explantes. Para sanar este problema utilizou-se 800 mg/L de PVP (polivinilpirrolidona) (ação antioxidante) no meio para indução de calos, seguindo o protocolo (Tabela 2). O PVP fornece resultados satisfatórios no combate a oxidação.

Após 90 dias no mesmo meio de cultura, no qual os calos se desenvolveram, estes foram transferidos para o meio MS de cultura de células em suspensão.

3.4 Células em suspensão

No momento em que os calos se apresentaram com tamanhos adequados (em torno de 1,0 cm de diâmetro) e livres de contaminação e de oxidação, o que ocorreu após 90 dias, estes foram transferidos para o meio MS modificado para cultura de células em suspensão na ausência de agentes antioxidantes (Tabela 3).

Foi realizado um experimento em meio MS para células em suspensão com diferentes concentrações da auxina sintética 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Tabela 4). Para cada tratamento foram feitas 3 repetições e cada vidro de maionese continha 50 mL de meio líquido, no qual foram colocados 5 calos obtidos do mesmo vidro.

Tabela 3. Meio MS modificado para formação de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* (WATT et al., 1991)

Macronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/L	Vitaminas	mg/L
(NH ₄)NO ₃	1650	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Mio-inositol	100
KNO ₃	1900	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	Ácido nicotínico	0,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	H ₃ BO ₃	6,2	Piridoxina.HCl	0,8
MgSO ₄ .6H ₂ O	370	KI	0,83	Tiamina.HCl	0,1
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Glicina	2
Ferro		CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	Hormônios	
Na ₂ EDTA	33,6	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	Cinetina	10
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8			AIA	1
				2,4- D	5
				Sacarose	30.000
				pH 5,7	
				Benlate	100

Tabela 4. Tratamentos variando as concentrações de 2,4-D

Tratamento	Concentração de 2,4-D
T1	1 mg/L
T2	2 mg/L
T3	4 mg/L
T4	5 mg/L
T5	0 mg/L

Os calos foram submetidos a agitação em torno de 125 rpm na ausência total de luz por 90 dias, sendo que, por questão de adaptação ao meio, no primeiro dia no meio líquido os calos ficaram em repouso, sendo colocados em agitação somente a partir do segundo dia. No final deste tempo as células se encontraram individualizadas e o líquido da suspensão se apresentou com uma certa viscosidade.

3.5 Determinação de lignina

3.5.1 Teste de Wiesner

O teste de Wiesner (LIN & DENCE, 1992) foi realizado através da marcação de cinco spots na cromatofolha indicando o seu respectivo tratamento, e com o capilar foi colocado em cada spot uma pequena alíquota do líquido da suspensão celular. Quando cada spot se apresentou seco, colocou-se com o capilar uma alíquota do reagente de

Wiesner sobre cada spot. Em seguida esperou-se um tempo aproximado de 30 minutos para verificar a mudança de cor em cada tratamento. É preciso ressaltar que o reagente de Wiesner indica a presença de fenóis nas amostras quando estas, após o contato com o reagente, se tornam de coloração rosada-violeta, revelando a possível presença de fenóis no meio. Esse teste é uma resposta qualitativa da detecção de fenóis. Neste teste somente foi testada uma alíquota representando cada tratamento, não foram feitas repetições.

3.5.2 Infravermelho

A análise no infravermelho consiste na análise qualitativa da lignina, obtida através dos espectros resultantes do infravermelho, realizada no Instituto de Química da UFRRJ e no Laboratório de Produtos Naturais –Farmanguinhos - FIOCRUZ.

Foram retirados 2 mg de cada amostra das células em suspensão, as quais foram secas ao ar através do procedimento de BRUCE & WEST (1989) após a etapa de maceração na presença de etanol, vista na análise no ultravioleta. A esta quantidade de células adicionou-se 200 mg de brometo de potássio (KBr). Esta mistura foi macerada para que a amostra ficasse bem homogênea permitindo uma melhor leitura do aparelho (Figura 6). O espectro foi obtido por técnica de reflectância difusa com transformada de Fourier Ft – IR Nexus 670 FT – IR, e o programa utilizado foi o OMNIC. A análise no infravermelho também foi obtida pelo aparelho Perkin-Elmer.

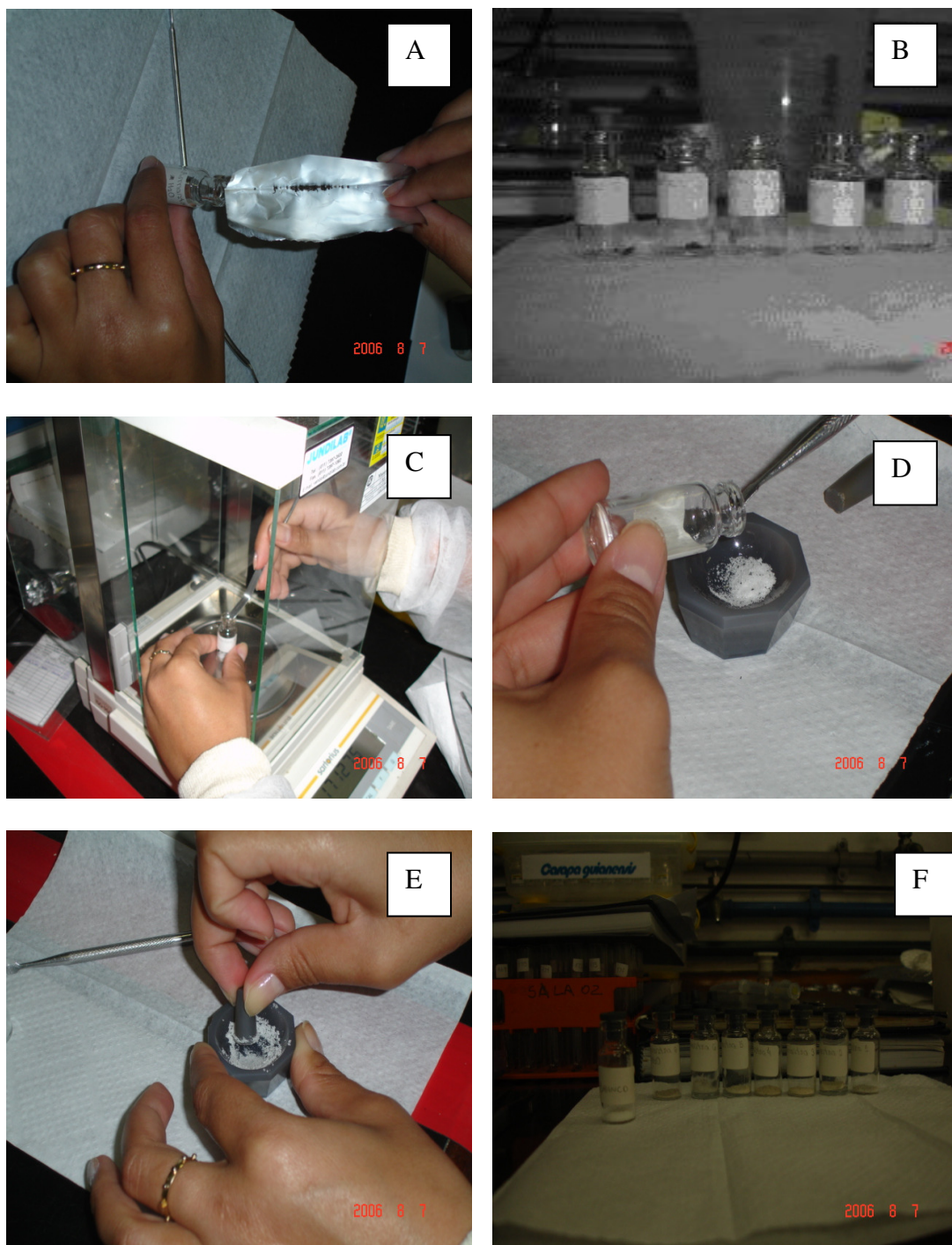


Figura 6. Preparação da amostra para análise no infravermelho: (A) 2 mg da amostra; (B) Os 5 tratamentos; (C) 200 mg de KBr; (D e E) A amostra sendo macerada com KBr; (F) Os tratamentos prontos para análise no infravermelho.

3.5.3 Ultravioleta

A análise no ultravioleta (UV) consiste na análise quantitativa da lignina em células em suspensão. Uma curva de calibração (Figuras 7 e 8) foi elaborada com amostra padrão (lignina de Björkman de *Gallesia gorazema* – método de Björkman) (LIN & DENCE, 1992).

O aparelho utilizado para fazer a análise no ultravioleta foi o UV mini 1240 – UV-Vis spectrophotometer – Shimadzu.

A obtenção da lignina foi possível através das células retiradas do meio em suspensão, as quais foram transferidas para placas de Petri e a etapa da quantificação da lignina foi realizada pelo método de BRUCE & WEST (1989):

1º- Separação de 0,8 g de material fresco (células que foram transferidas para a placa de Petri);

2º- Extração em 20 mL de etanol 80% em almofariz;

3º- Centrifugação a 20.000 rpm por 20 minutos (em temperatura ambiente = 25°C);

4º- Transferência desse material para uma placa de Petri com etanol, filtração (através de um funil), lavagem (com o próprio etanol, foi colocado etanol no material que precipitava e possibilitou a retirada do etanol) e secagem ao ar (o resíduo insolúvel em álcool foi usado para determinação das ligninas);

5º- Uso de 50 mg do resíduo seco, sendo colocado em tubo de vidro onde se adiciona 4 mL de HCl 2N e 0,4 mL de ácido tioglicólico;

6º- Selamento e aquecimento do tubo em uma estufa a 100°C por 4 h;

7º- Em seguida o material foi resfriado e centrifugado a 30.000 rpm por 20 minutos a 4°C;

8º- O sobrenadante foi descartado e o material depositado no fundo foi lavado uma vez com 4 mL de água bidesionizada;

9º- Este material foi ressuspenso em 4 mL de NaOH 0,5N e agitado lentamente a 25°C por 18 h em um agitador em velocidade baixa (no mesmo agitador que serviu para agitar o meio de cultura) para extrair o tioglicolato de lignina;

10º- A amostra foi novamente centrifugada a 30.000 rpm por 20 minutos a 4°C;

11º- O sobrenadante foi transferido para um tubo teste onde 0,8 mL de HCl foi adicionado e ficou em repouso por 4 h a 4°C (em repouso dentro da centrífuga, onde foi possível manter essa temperatura);

12º- Centrifugação a 30.000 rpm por 20 minutos;

13º- O material sólido foi dissolvido em 8 mL de NaOH 0,5N;

14º- A absorbância do material no ultravioleta foi mensurada a 280 nm.

As concentrações de lignina para a curva de calibração foram feitas da seguinte maneira:

1º- 8 mg de NaOH em 400 mL de H₂O = NaOH 0,5N;

2º- Solução estoque de 150 mg/L: 15 mg de lignina de Björkman diluídos em 100 mL de NaOH 0,5N;

3º- Solução de 100 mg/L: em 10 mL dessa solução estoque de lignina de 150 mg/L foram adicionados 5 mL da solução de NaOH 0,5N;

4º- Solução de 50 mg/L: em 10 mL da solução estoque de lignina de 150 mg/L foram adicionados 20 mL da solução de NaOH 0,5N;

5º- Solução de 25 mg/L: em 10 mL da solução estoque de lignina de 150 mg/L foram adicionados 50 mL da solução de NaOH 0,5N;

6º - Separou-se 10 mL de cada uma dessas diluições, ao todo foram 4 vidros com suas respectivas concentrações de lignina padrão (Björkman);

7º- O branco foi feito com 10 mL de NaOH 0,5N.

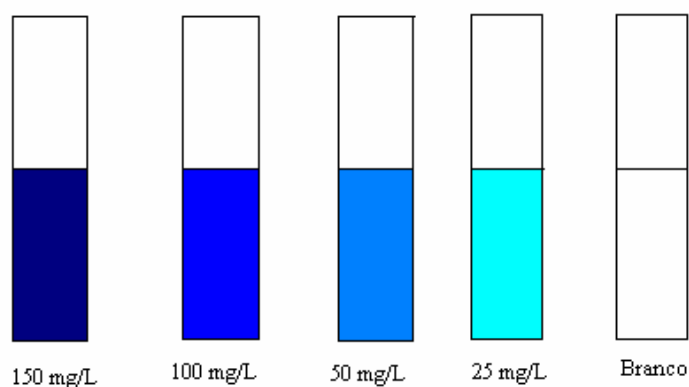


Figura 7. Ilustração das amostras de lignina padrão de Björkman para a curva de calibração (as cores azuis são ilustrações para melhor identificar que à medida que a concentração diminui a cor fica mais clara)

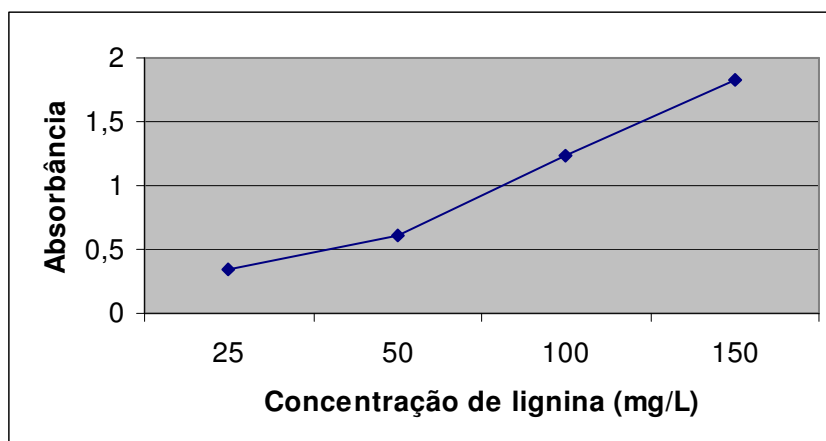


Figura 8. Curva de calibração da lignina padrão (*Gallisia gorazema*) de Björkman

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Calogênese e suspensão celular

A germinação das sementes no meio MS modificado (MURASHIGE & SKOOG, 1962) visando a utilização dos explantes para formação de calos foi muito eficiente, cerca de 95% das sementes germinaram. Além disso, este meio de cultura propiciou um bom desenvolvimento das plântulas, ou seja, as folhas se apresentaram com uma maior superfície permitindo a obtenção de explantes maiores e com isso a sobrevivência destes na etapa posterior de indução a calogênese.

Após a germinação das sementes e inoculação dos explantes no meio MS modificado para indução de calos de *Eucalyptus urophylla*, os calos foram formados (Figura 9). Alguns apresentaram certa friabilidade, outros, não. Cerca de 50% dos calos eram friáveis, os calos que não eram friáveis apresentaram uma superfície mais rígida, as células não se soltavam facilmente umas das outras, sendo esta uma característica típica de calo de espécie lenhosa. O tempo de 90 dias foi adequado para a obtenção de calos com capacidade de serem utilizados na fase de células em suspensão, tanto no que diz respeito ao tamanho (cerca de 1,0 cm de diâmetro) quanto o baixo nível de oxidação.

Neste trabalho o índice de contaminação foi muito baixo, sendo irrelevante na fase de calogênese, sendo o benlate, o fungicida responsável por esse resultado.

Embora os calos de espécies lenhosas, como os de *Eucalyptus urophylla*, apresentem grande nível de oxidação, o uso do PVP reduziu de forma considerável o índice de oxidação, cerca de 30% dos calos oxidaram.

Essa resposta positiva com relação a um índice pequeno de oxidação ocorreu porque os calos foram submetidos a um regime de total ausência de luz e o meio de cultura para indução de calos era constituído de PVP (polivinilpirrolidona), um antioxidante que mostrou-se muito eficiente. A ausência de luz para indução de calos apresentou boas respostas também para *Copaifera sp.* (OLIVEIRA et al., 2001).

A escolha do PVP para controlar a oxidação de calos de *Eucalyptus urophylla* teve como referência o fato dessa substância prevenir a oxidação e a polimerização (TEIXEIRA, 2001).

Os calos não foram subculturados, pois apresentaram inicialmente crescimento muito lento. No entanto, ao deixar os calos no meio de cultura por um período maior (90 dias) em condição de total ausência luz, houve um crescimento considerado permitindo a passagem para a cultura de células em suspensão.



Figura 9. Calo do *Eucalyptus urophylla* tirada no LBM através de uma lupa binocular modelo STEMI 2000C w10x/21 455042, obtido a partir de explante foliar, após 90 dias de inoculação no meio de cultura.

O balanço hormonal entre auxina e citocinina do meio de cultura MS para indução de calos, 2,4-D (1 mg/L) e cinetina (0,1 mg/L), respectivamente, forneceu bons resultados para a formação de calos de *Eucalyptus urophylla*, mostrando a eficiência do 2,4-D para esta atividade, tal como citado por MURASHIGE & SKOOG (1962). Além disso, é preciso ressaltar que no meio para indução da calogênese também havia uma outra auxina que estava certamente contribuindo para esse balanço hormonal, o AIA (10 mg/L)

O *Eucalyptus urophylla* foi a espécie escolhida pela sua capacidade de crescimento *in vitro*, suas plântulas apresentaram um bom desenvolvimento de forma rápida, não precisando esperar muito para retirar os explantes das gemas foliares, o período de 30 dias após a inoculação das sementes no meio de cultura foi suficiente para a obtenção de explantes.

Um dos problemas mais frequentes na retirada dos explantes é o fato destes não sobreviverem quando são muito pequenos, isso porque devem ser retirados no início do desenvolvimento da planta enquanto o tecido meristemático está bem ativo. No caso do *Eucalyptus urophylla* este problema foi resolvido pelo rápido crescimento permitindo que os explantes fossem retirados bem jovens, porém com um tamanho (cerca de 0,5 cm) que permitiu sua sobrevivência.

Quando os calos encontraram-se com um tamanho adequado (cerca de 1 cm), livre de contaminação e sem oxidação muito intensa, foram transferidos para o meio de cultura MS líquido para a etapa de suspensão celular. Ao se tratar do estudo de alguns metabólitos secundários, esta técnica tem se mostrado muito eficiente, pois possibilita a liberação de substâncias no meio líquido.

O meio de cultura MS líquido contendo 10 mg/L de cinetina meio foi suplementado com 2,4-D em 5 diferentes concentrações e o fungicida Benlate. A escolha dessa auxina sintética se deu pela sua aparente habilidade de diminuir alguns aspectos do metabolismo dos fenilpropanóides em outras culturas estudadas (ZENK et al., 1975; OZEKI et al., 1990).

A eficiência do 2,4-D no estudo da lignificação pode estar relacionada ao fato, tal como observado por EBERHARDT et al., (1993), que meios de culturas suplementados com 2,4-D favoreceram inicialmente somente a formação de parede primária, que não é lignificada. Neste trabalho, a utilização do 2,4-D no meio líquido mostrou que essa auxina pôde produzir quantidades baixas ou elevadas dependendo da

sua concentração, sendo este fato comprovado pelas análises realizadas no infravermelho e no ultravioleta.

A suspensão celular foi de grande valia para o estudo do processo de lignificação em células de *Eucalyptus urophylla* suspensas na presença da auxina sintética 2,4-D. O meio líquido permitiu uma maior influência deste regulador de crescimento nos calos fazendo com que houvesse o processo de lignificação que foi comprovado por análise no infravermelho para detectar os grupos funcionais característicos da lignina, e análise no ultravioleta, onde a concentração da lignina foi determinada em cada tratamento.

Para dar início às análises de detecção de fenóis no meio de cultura, realizou-se o teste de Wiesner, o qual mostrou mudança de coloração para rosa-violeta indicando a presença de fenóis nas amostras referentes aos diferentes tratamentos com 2,4-D. Com isso, levou-se a pesquisa em diante para comprovar se havia ou não lignina nas amostras através dos espectros no infravermelho.

4.2 Análise no infravermelho

O objetivo da análise no infravermelho foi certificar a presença de lignina nas células em suspensão.

Quando se trata do espectro de um polímero, especialmente de produtos naturais, pode-se concluir que dois ou mais produtos são idênticos porque seus espectros são muito similares. No entanto, existem diferenças significantes no espectro da lignina em função do tipo de método utilizado para o isolamento da mesma, as duas maiores categorias podem ser reconhecidas como espectro de lignina do grupo guaiacila e do grupo guaiacila-siringila (HERGERT, 1960).

Devido à natureza amorfa da lignina, a complexidade das unidades monoméricas individuais, e a ordem irregular nas quais essas unidades são ligadas, não é possível aplicar uma teoria de grupo para interpretação do espectro de lignina, entretanto, os sinais próximos a 1230 (unidade guaiacila) e a 1360 (unidade siringila) revelaram que as ligninas formadas possuem uma composição G:S.

Para cada tratamento foi obtido um espectro, no qual foram ressaltados os picos que indicavam a presença de lignina (Figuras 10, 11, 12 e 13). Esses espectros foram obtidos através de células em suspensão pré-extraídas com etanol. O tratamento 3 (4 mg/L de 2,4-D) não teve seu espectro obtido no infravermelho por ter havido perdas de células, as quais foram utilizadas para a análise no ultravioleta para quantificação da lignina. Essa perda do tratamento 3 ocorreu por contaminação fúngica.

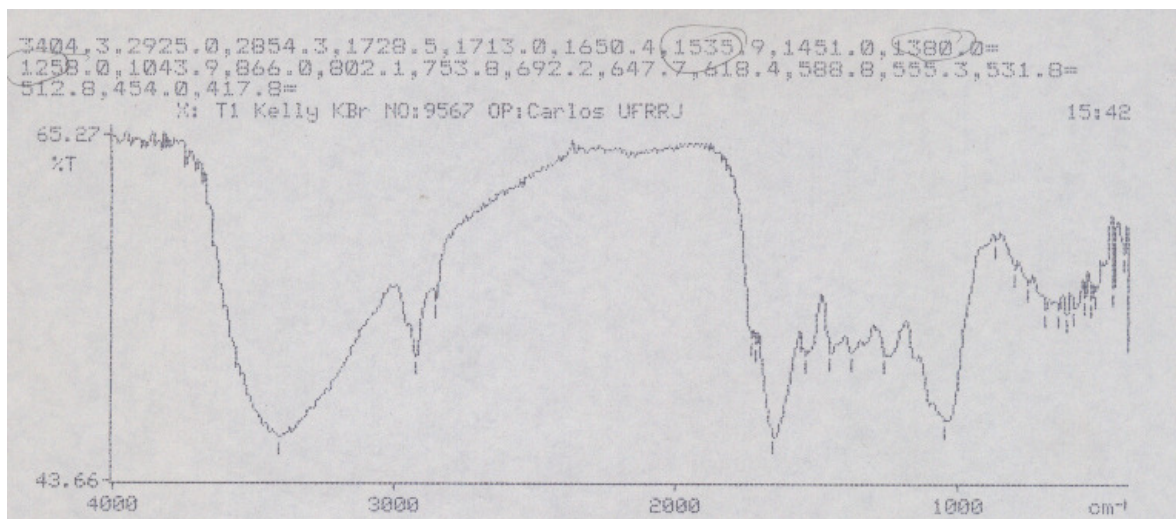


Figura 10. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 1 da suspensão (1 mg/L de 2,4-D).

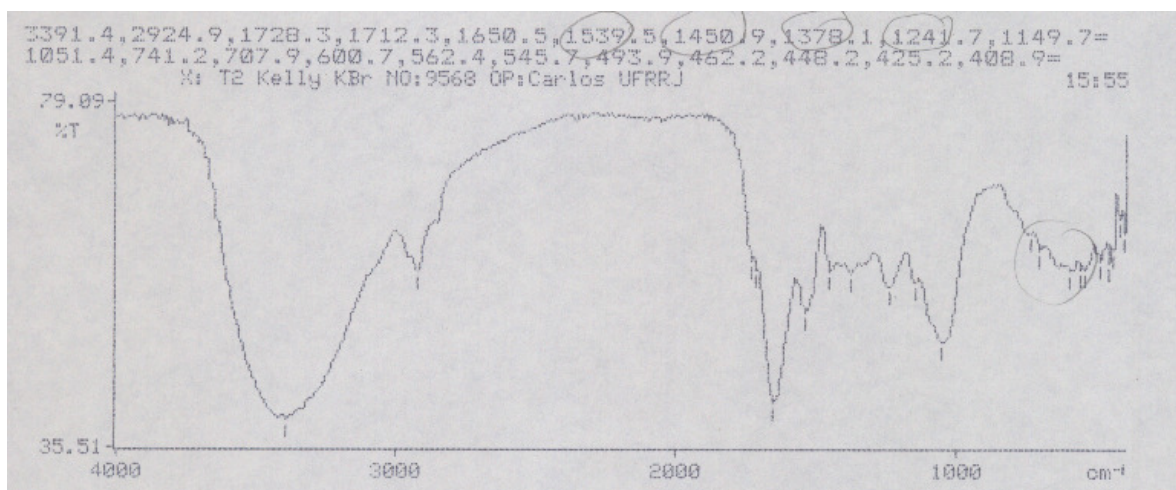


Figura 11. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 2 da suspensão (2 mg/L de 2,4-D).

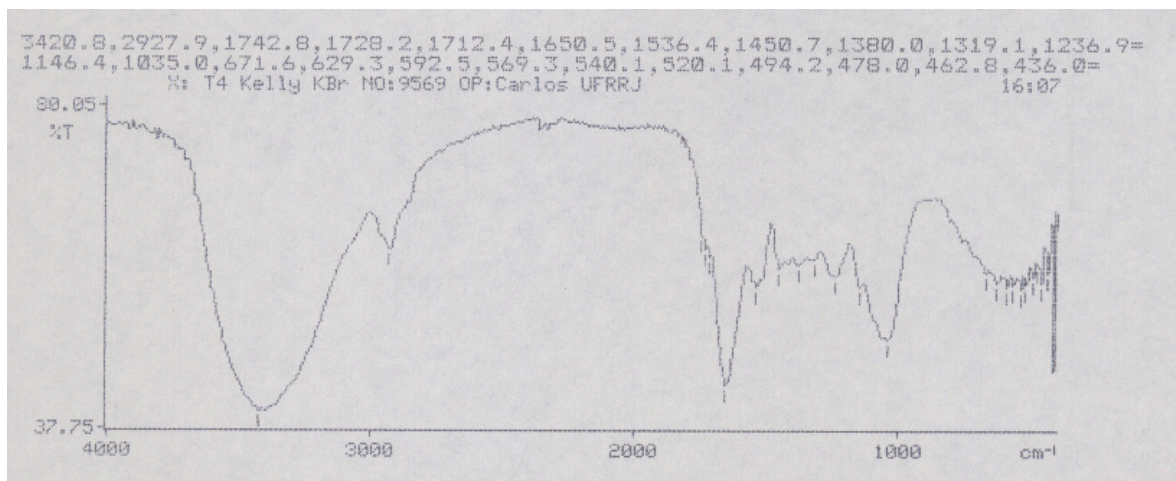


Figura 12. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 4 da suspensão (5 mg/L de 2,4-D).

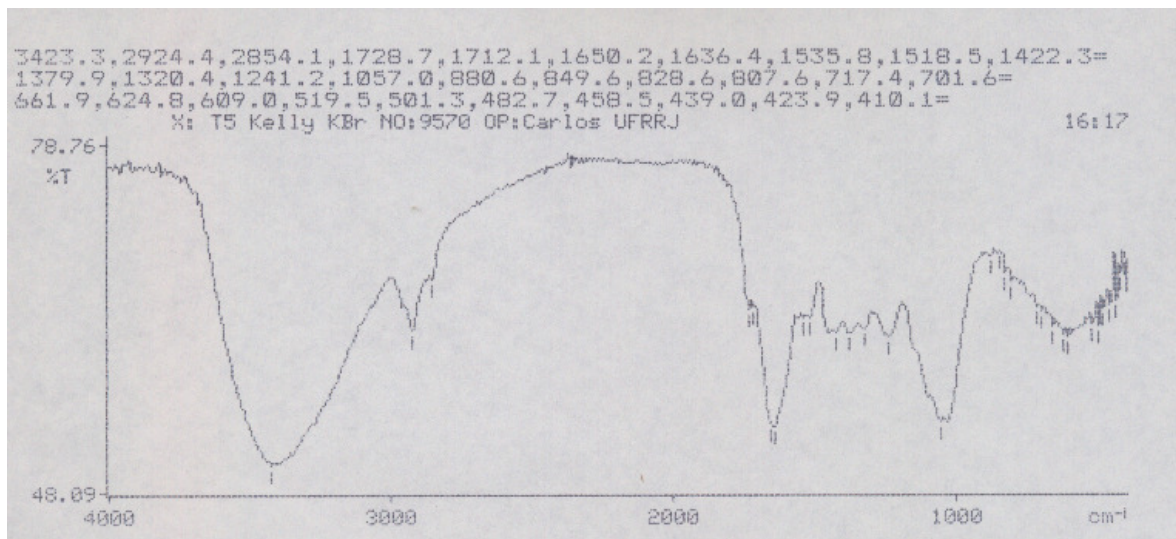


Figura 13. Espectro no infravermelho de calos oriundos do tratamento 5 da suspensão (0 mg/L de 2,4-D).

Foi possível notar que não houve muita diferença entre os espectros da lignina e segundo a tabela de sinais de absorção no infravermelho (HERGERT, 1960), alguns sinais são característicos da lignina, indicando de forma qualitativa, através dos espectros, que o processo de lignificação ocorreu nas células, ou seja, indica apenas a presença de lignina e não a sua intensidade em cada tratamento. Os sinais mais característicos em cada tratamento estão descritos na tabela a seguir (Tabela 5).

Tabela 5. Sinais característicos de lignina em cada tratamento.

Tratamento	Sinais característicos de lignina no infravermelho	Concentração de 2,4-D
T1	1500, 1451, 1380, 1258	1,0 mg/L
T2	1500, 1450, 1378, 1241	2,0 mg/L
T3	*	
T4	1500, 1450, 1380, 1236	5,0 mg/L
T5	1500, 1518, 1422, 1320, 1241	-

* Quantidade de amostra insuficiente para a realização desta análise em função da posterior análise no ultravioleta de quantificação. O espectro não foi registrado no infravermelho devido as perdas mencionadas no texto anterior.

O sinal de 1500 cm^{-1} , presente em todos os tratamentos, confirmou a presença de lignina em todas as amostras.

O espectro no infravermelho da lignina de Björkman de *Gallesia gorazema*, como padrão, revelou a presença de vários sinais entre $3500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$, dentre os quais especial atenção foi dada àqueles localizados entre $1800\text{ e }700\text{ cm}^{-1}$ (ABREU & OERTEL, 1999). Nesta região, a presença dos sinais em $1328\text{ e }1268\text{ cm}^{-1}$, e suas respectivas intensidades, justificam a existência de alta concentração de unidades guaiacilas (ABREU, 1997).

A região de maior interesse no espectro no infravermelho é também aquela mais comum para substâncias orgânicas em geral, compreendidas entre $4.000\text{ e }700\text{ cm}^{-1}$. A caracterização dos sinais de absorção no infravermelho se fez principalmente de modo empírico, por comparação com dados da tabela 6, que mostra os principais sinais de absorção no infravermelho de lignina. Os espectros também revelaram sinais de celulose e hemicelulose.

Tabela 6. Atribuição dos principais sinais de absorção no infravermelho de ligninas (LIN & DENCE, 1992).

Guaiacila	Guaiacila-Siringila	Grupamento de origem
3425-3400	3450-3400	Deformação axial do OH.
2920-2820	2940-2835	Deformação axial de C-H aromático metílico e metilênico.
1715	1715-1710	Deformação axial de C=O de cetonas não conjugadas e grupos carboxílicos.
1675-1660	1660	Deformação axial de C=O de cetonas conjugadas com anel aromático.
1605	1595	Vibrações do anel aromático.
1515	1505	Vibrações do anel aromático.
1430	1425	Vibrações do anel aromático.
1470-1460	1470-1460	Deformação angular assimétrica C-H de grupos metila metileno.
1370	1370-1365	Deformação simétrica C-H.
1270	1275	Respiração do anel guaiacila com deformação C-O (fenólico e metoxila).
1230	1235-1230	Deformação C-O fenólico.
1140	1143	Deformação angular C-H aromático no plano, do tipo guaiacila.
	1130	Deformação angular C-H aromático no plano, do tipo siringila.
1125	1120	Deformação axial de C-O de álcoois secundários e éteres alifáticos.
1035	1035	Deformação angular C-H aromático no plano, do tipo guaiacila e deformação axial assimétrica de C-O de álcoois primários.
970	970	Deformação angular simétrica fora do plano =C-H.
	915	Deformação angular simétrica fora do plano C-H aromático.
815	835	Deformação angular simétrica fora do plano C-H aromático.
750-770	750-770	Deformação angular simétrica fora do plano C-H aromático.

Ao analisar a tabela 7 com os sinais característicos e comparar com os sinais encontrados nos espectros das amostras de células de *Eucalyptus urophylla* após os tratamentos com 2,4-D na suspensão celular, foi possível identificar que existem sinais característicos nos tratamentos indicando que houve o processo de lignificação nas células de *E. urophylla*.

Tabela 7. Regiões características de grupamentos metoxílicos no infravermelho.

Sinais característicos-teórica cm^{-1}	Sinais característicos-experimental cm^{-1}	Atribuição
2920-280	2700-300	Deformação de C-H metílico
1470-1460	1450-1470	Deformação angular assimétrico de grupos metílicos
1330-1325	1330-1335	Anel siringila com deformação de C-O
1275-1270	1275-1280	Anel guaiacila com deformação de C-O

A análise no infravermelho confirmou a ocorrência do processo de lignificação nas células de *Eucalyptus urophylla* em suspensão, porém não foi suficiente para a verificação do melhor tratamento com 2,4-D. Para obter a informação sobre a concentração de lignina mais adequada foi feita uma análise no ultravioleta, a qual permitiu obter uma resposta melhor quanto a eficiência do 2,4-D por indicar a concentração dessa auxina que produziu a maior e a menor quantidade de lignina.

4.3 Análise no ultravioleta

O ultravioleta foi de grande importância para a análise de determinação da concentração de lignina em células de *Eucalyptus urophylla* em suspensão, pois permitiu não só a confirmação da presença de lignina nas células como a determinação da concentração da mesma para cada tratamento, permitindo observar qual a concentração de 2,4-D foi mais adequada para evitar o processo de lignificação levando em consideração que todos os tratamentos possuíam a quantidade de cinetina do meio MS de 10 mg/L.

As amostras após terem passado pela quantificação de lignina pelo método de BRUCE & WEST (1989) apresentaram diferenças entre si que puderam ser observadas visualmente, pois a coloração de cada amostra foi diferente, sendo umas mais acentuadas que as outras dando uma idéia de diferença nas concentrações (Figura 14). Esse método também foi utilizado para extração de lignina de *Capsicum annuum* L. (NUÑEZ-FALENIUS & OCHOA-ALEJO, 2005).

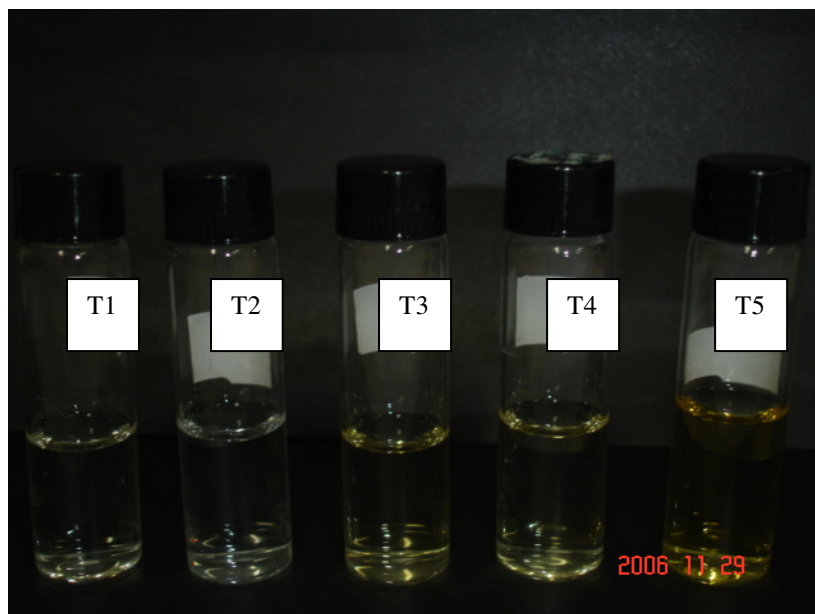


Figura 14. Diferença de coloração entre os tratamentos da suspensão de *Eucalyptus urophylla* após o método de BRUCE & WEST (1989)

Ao observar as amostras foi possível verificar que realmente houve uma relação entre a coloração da amostra e a concentração de fenóis, notou-se que a cor das amostras foi ficando mais escura à medida que a concentração aumenta. Para a determinação da concentração da lignina nas células em suspensão, usou-se a lignina de Björkman de *Gallesia gorazema* como referência nas concentrações de 150, 100, 50 e 25 mg/L (Figura 15) e a partir dela uma curva de calibração foi elaborada.

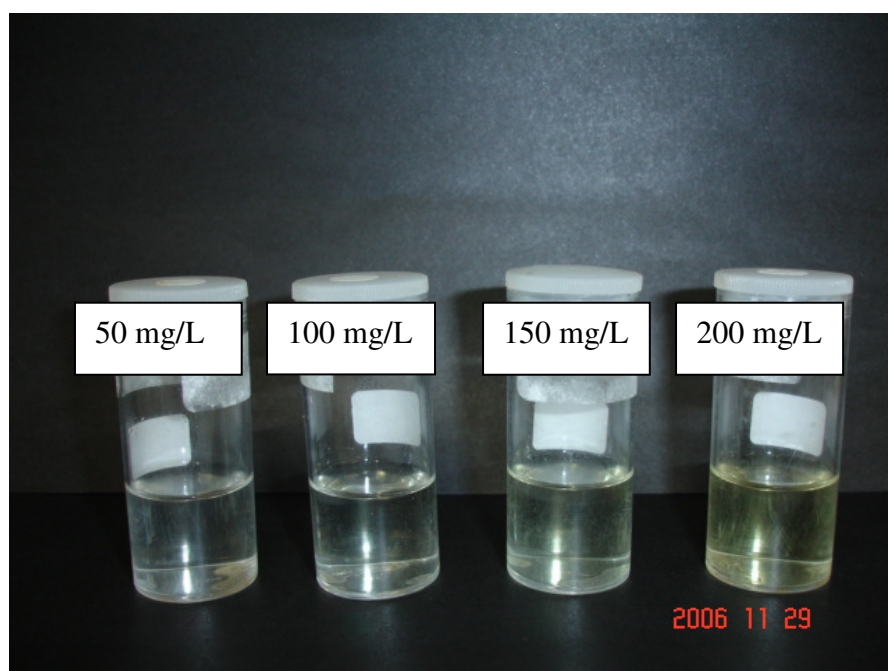


Figura 15. Soluções preparadas com lignina padrão de *Gallesia gorazema* (Bjorkman): curva de calibração

A determinação da concentração da lignina foi obtida na absorbância de 280 nm tal como realizado por GOULD (1982) (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de absorbância de cada tratamento de células de *E. urophylla* a 280 nm

Tratamento	Concentração de 2,4-D	Repetição	Absorbância a 280 nm
1	1 mg/L	1	0,5989
1	1 mg/L	2	*
1	1 mg/L	3	0,3832
2	2 mg/L	1	0,1191
2	2 mg/L	2	*
2	2 mg/L	3	*
3	4 mg/L	1	1,8716
3	4 mg/L	2	*
3	4 mg/L	3	0,8135
4	5 mg/L	1	0,3652
4	5 mg/L	2	1,2252
4	5 mg/L	3	*
5	0 mg/L	1	2,3284
5	0 mg/L	2	2,6079
5	0 mg/L	3	2,2292

* Tratamento contaminado por fungo e excluído da análise

O espectro da lignina padrão de Björkman mostrou sinais em 236 nm (Figura 16). Segundo LANDIM & RUGGIERO (1999), os espectros de UV (ultravioleta) de ligninas abrangem máximos por volta de 280 a 230 nm que é composto de sinais de absorção de unidades fenilpropílicas, que constituem o polímero de lignina.

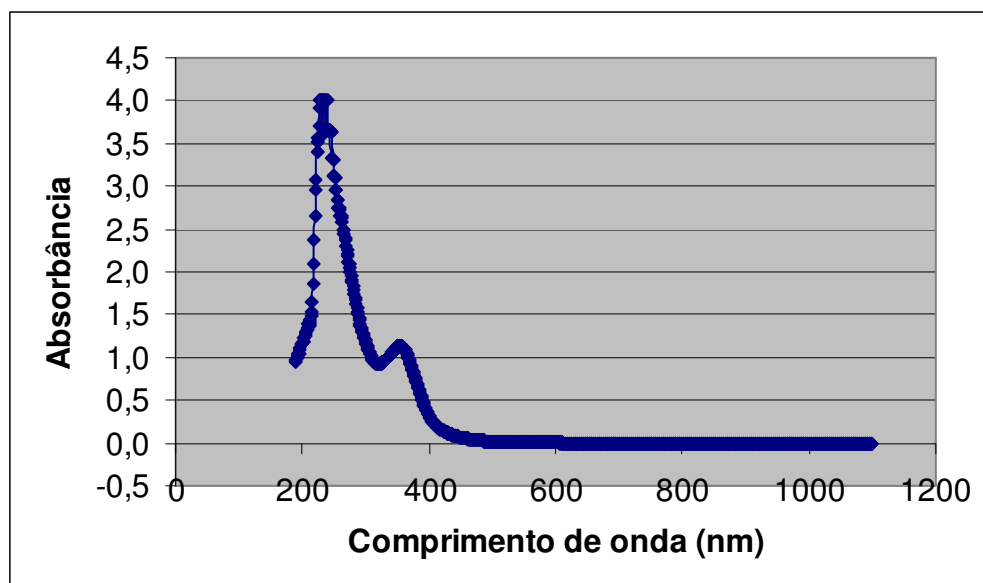


Figura 16. Espectro em ultravioleta de lignina padrão de *Galesia gorazema* (Bjorkman) na concentração de 150 mg/L

Os espectros de cada tratamento foram obtidos e comparados com o espectro da lignina padrão (Figura 17).

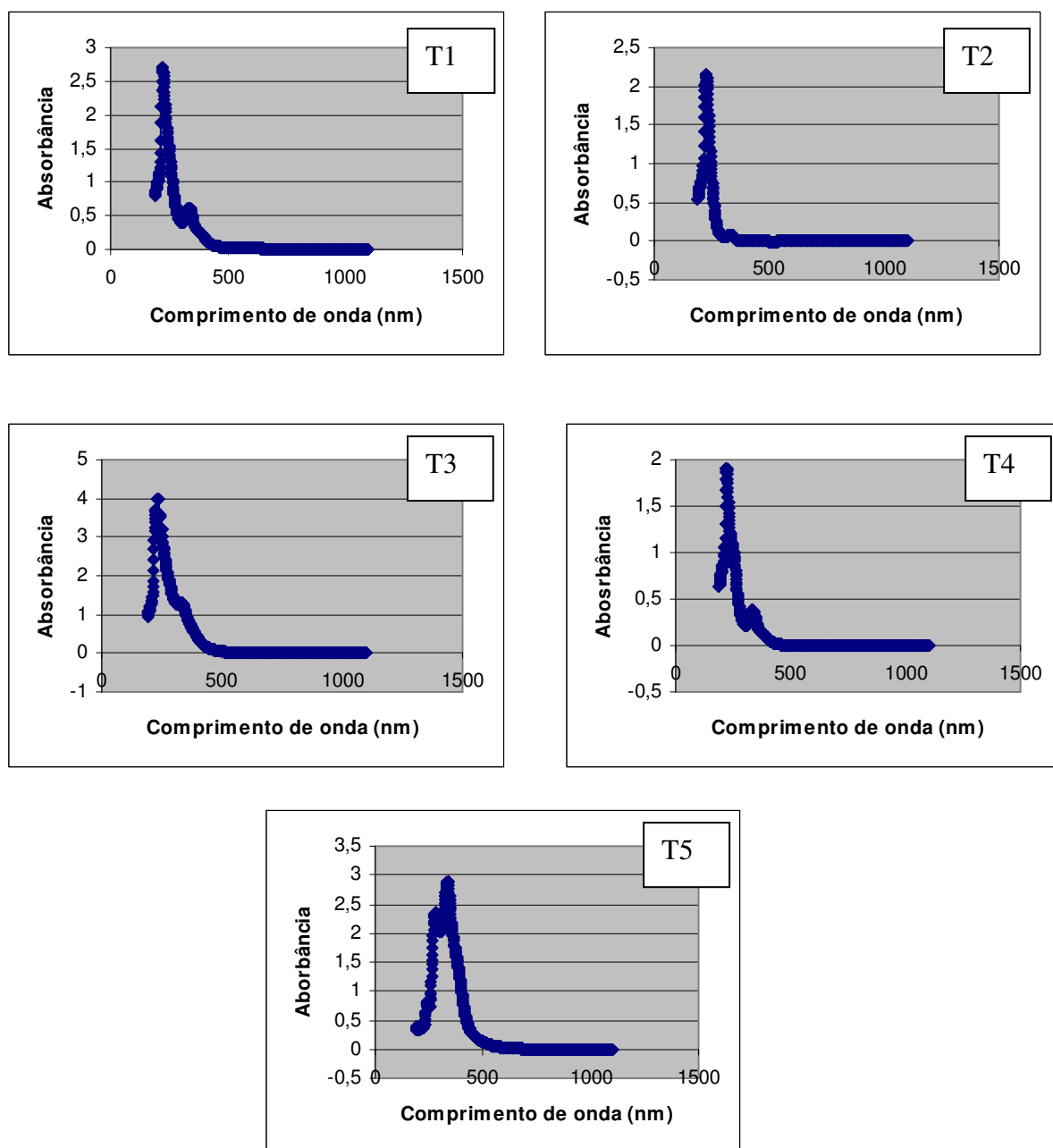


Figura 17. Espectros dos cinco tratamentos com diferentes concentrações de 2,4-D na suspensão celular

É interessante ressaltar os espectros das repetições de cada tratamento (Figura 18), isso porque em alguns casos, como nos tratamentos 4 e 5, houve uma diferença considerável na concentração de lignina entre o tratamento e sua repetição. Embora os espectros sejam muito semelhantes, a diferença está na absorbância de cada amostra, no entanto o sinal característico de lignina esteve presente em todos eles.

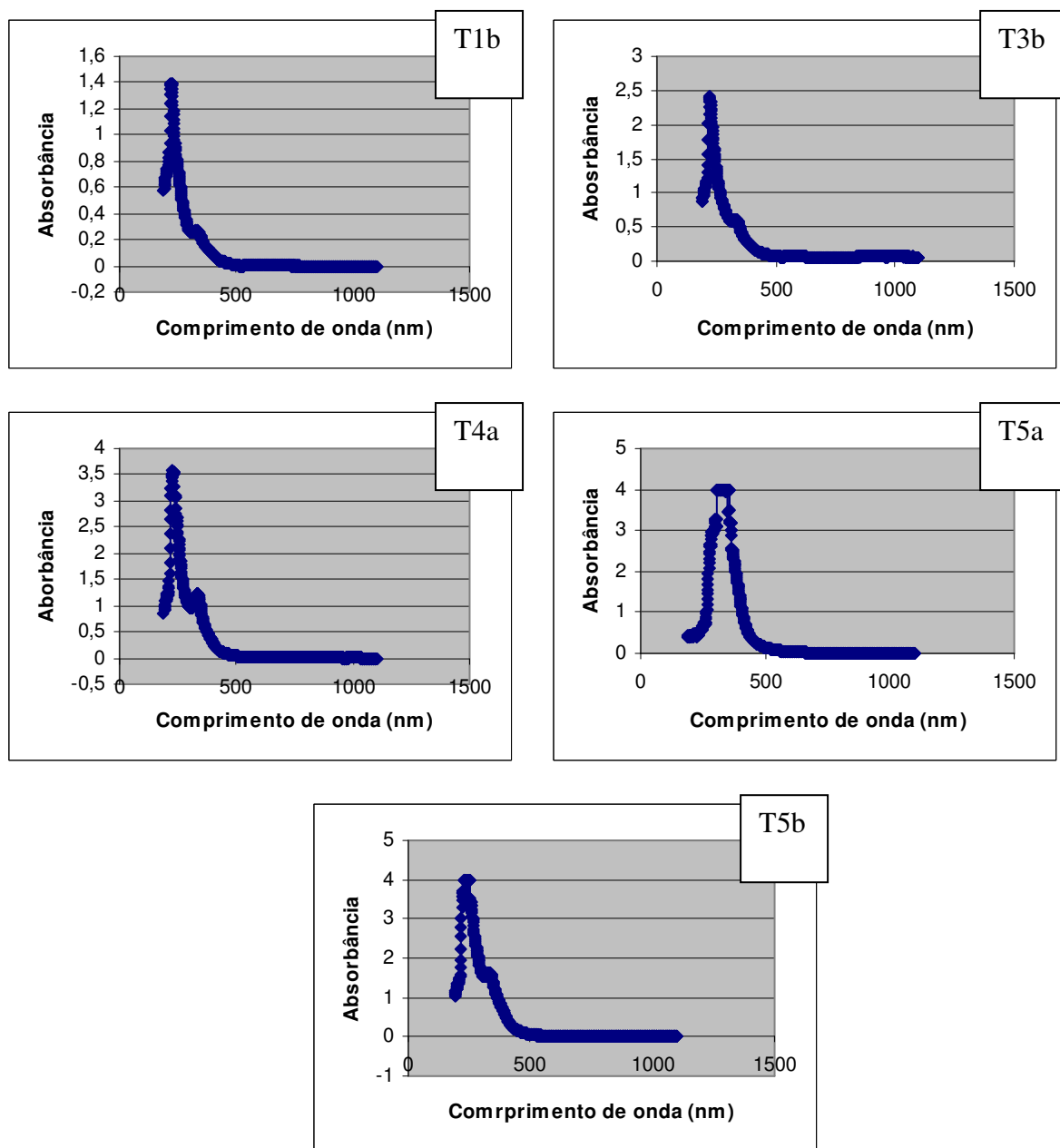


Figura 18. Espectro das amostras de repetições de cada tratamento de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*

Essa diferença dentro dos tratamentos, nas suas repetições, talvez esteja relacionada ao fato das células utilizadas para análise no ultravioleta não serem totalmente iguais, pois os calos não foram clonados. Cada calo foi obtido de um explante a partir de uma semente diferente, além disso, existe o fato de que a reprodução do *E. urophylla* ocorre através da fecundação cruzada, ou seja, pela presença de dois genótipos diferentes, influenciando na resposta de produção de lignina em um mesmo tratamento.

A intensidade de absorção no ultravioleta de lignina de angiosperma na região de 280 nm depende da proporção de unidades de siringil propano (S) para guaiacil propano (G), mas essa proporção não é eficaz para quantificar lignina. A mensuração exata da proporção de S/G usando a análise em ultravioleta é difícil porque os valores máximos de comprimento de onda das unidades de S e de G são similares (270 e 280 nm, respectivamente). No entanto, alguns autores têm observado mudanças na proporção S/G a partir do espectro de absorção no UV (FERGUS & GORING, 1970; YOSHIDA et al., 2002).

Embora a suspensão celular tenha sido realizada com diferentes tratamentos, o comportamento dos espectros foi praticamente o mesmo nas cinco diferentes concentrações de 2,4-D.

A curva de calibração teve um coeficiente de determinação (R^2) bem próximo de 1, isso indicou que o erro foi bem próximo de zero. A curva de calibração apresentou uma equação que permitiu calcular a quantidade de lignina em cada tratamento em mg/L, onde y é a absorbância a 280 nm (Tabela 9).

$Y = 0,0119 X + 0,0355$	
↓	↓
ABS	[Lignina]

Tabela 9. Concentração de lignina nas amostras de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* em cada tratamento

Tratamento	Concentração de 2,4-D	Concentração de lignina (mg/L)
T1	1 mg/L	47,3445
T1A	1 mg/L	38,2815
T1B	1 mg/L	29,2184
T2	2 mg/L	7,0252
T2A	2 mg/L	7,0252
T2B	2 mg/L	7,0252
T3	4 mg/L	154,2941
T3A	4 mg/L	109,8361
T3B	4 mg/L	65,3781
T4	5 mg/L	27,7058
T4A	5 mg/L	99,9747
T4B	5 mg/L	63,8403
T5	0 mg/L	192,6806
T5A	0 mg/L	220,0504
T5B	0 mg/L	184,3445

A análise de variância (Tabela 10) dos efeitos dos diversos tratamentos na concentração de lignina apresentou significância ao nível de 1% de probabilidade. Por conseguinte, pelo teste de Tukey (Tabela 11) o tratamento 5 com 0 mg/L de 2,4-D teve a maior concentração de lignina sendo discrepante em relação aos demais tratamentos. O contrário ocorreu com o tratamento 2, com 2 mg/L de 2,4-D, apresentando a menor concentração de lignina (Figura 19), que não difere estatisticamente das concentrações 1,0 e 5,0 mg/L.

Essa diferença na ocorrência do processo de lignificação mostrou ser mais acentuada em alguns tratamentos como no T5 de forma discrepante e seguida do T4 e T3, e a menor concentração no T2 pode ser devido ao fato da síntese e acúmulo de uma substância específica na cultura de células depender de uma série de fatores como o estado de diferenciação das células, a composição do meio de cultura e as condições ambientais, entre outros, (NUÑEZ-FALENIUS & OCHOA-ALEJO, 2005) e não somente ser influenciada pelo tipo de fitorregulador utilizado no meio.

Tabela 10. Quadro resumo da análise de variância em função dos valores obtidos pela quantificação da lignina no ultravioleta através da curva de calibração

FV	GL	QM	Fc	Significância
Tratamento	4	16739.41	22.540	0.00005
Resíduo	10	742.6538		

FV: Fator de Variação
 GL: Grau de Liberdade
 QM: Quadrado médio
 Fc: Calculado

Tabela 11. Teste de médias (Tukey) realizado com as concentrações de lignina para cada tratamento

Tratamento	Médias	Concentração de 2,4-D
5	199,0252 a	0,0 mg/L
3	109,8361 b	4,0 mg/L
4	63,8403 bc	5,0 mg/L
1	38,2815 bc	1,0 mg/L
2	7,0252 c	2,0 mg/L

Nota: Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância.

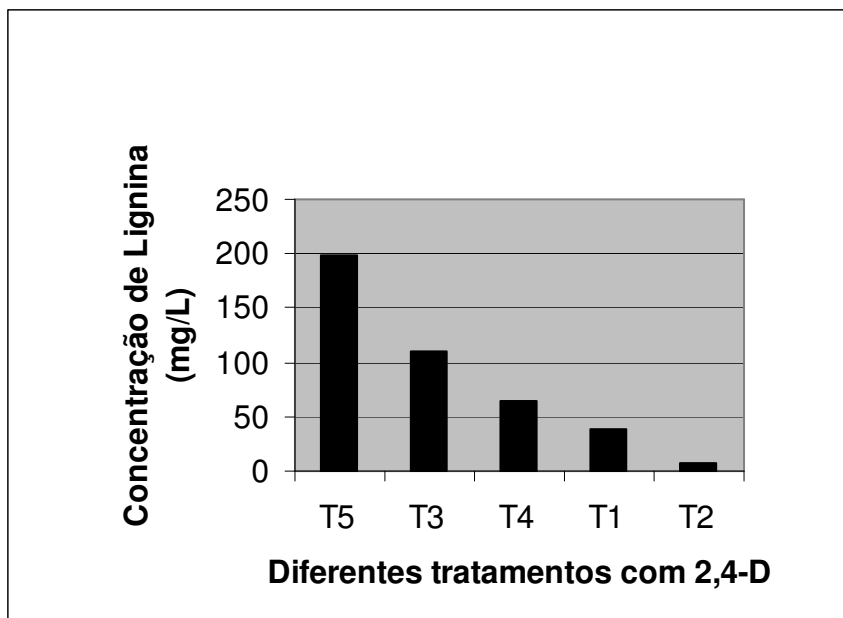


Figura 19. Concentrações de lignina em função dos diferentes tratamentos de 2,4-D

Esse resultado foi possível devido a análise no ultravioleta, haja visto que a relação entre concentração e absorvância é diretamente proporcional, segundo a Lei de LAMBERT & BEER (USP, 2007).

As concentrações de lignina não foram proporcionais a concentração da auxina 2,4-D, pois a maior quantidade de lignina foi obtida na ausência deste fitorregulador, o contrário ocorreu no tratamento 2, uma concentração mediana entre todos os tratamentos testados, em que a concentração de lignina foi mínima. Considerando que os tratamentos 3, 4 e 1 foram iguais estatisticamente, achou-se melhor comparar apenas o tratamento 5 com o tratamento 2 comprovando o fato de que a auxina sintética 2,4-D impediu a formação de fenilpropanóides, de lignina. Esse fato também foi observado por EBERHARDT et al., (1993) ao trabalhar com *Pinus taeda*.

5 CONCLUSÕES

O protocolo para o estudo da lignificação em cultura de células de *Eucalyptus urophylla* em suspensão consiste do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) líquido modificado para suspensão suplementado com auxina sintética 2,4-D sem antioxidantes.

A análise no infravermelho permitiu estimar a presença de unidades siringila e guaiacila na lignina das células de *Eucalyptus urophylla*.

A concentração mais adequada de 2,4-D para atenuar o processo de lignificação em cultura de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* é de 2,0 mg/L, a qual produziu 7,0 mg/L de lignina na solução obtida para realização na análise do ultravioleta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, H.S. Estimativa por infravermelho da concentração da unidade estrutural b-O-4 em Angiospermas. **Química Nova**, São Paulo, 1997.
- ABREU, H.S.; OERTEL, A.C. Estudo químico da lignina de *Paullinia rubiginosa*. **Cerne**, v.5, n.1, p.52-60, 1999.
- ABREU, H.S.; VEIGA, B.G.A.; MARJEROWICZ, N.; CARVALHO, A.C.P.; PINTO, V.C. Efeito do oxigênio sobre a formação da lignina de *Ipomoea batatas* em ambiente controlado. **Floresta e Ambiente**, v.6, n.1, p.59-64, 1999.
- ABREU, H.S.; CARVALHO, A.M.; MONTEIRO, M.B.O.; PEREIRA, R.P.W.; SILVA, H.R.; SOUZA, K.C.A.; AMPARADO, K.F.; CHALITA, D.B. Métodos de análise em química da madeira. **Série Técnica Floresta e Ambiente**, p. 1-20, 2006.
- AGRIOS, G. N., **Plant Pathology**, Academic Press, University of Florida, 635 p., 1997.
- AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; and YEOMAN, M.M **Growth patterns in tissue (callus) cultures. In Plant tissue and cell culture**. 2 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications ed.H. E. Street, p.267-306, 1977.
- AKITA, T.; HINA, Y.; NISHI, T. Production of Betacyanins by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.64, n.9, p. 1807-1812, 2000.
- ALTMAN, A; GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of Citrus bud culture. **Acta Horticulturae**, n.78, p.51-60, 1977.
- ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39 n.5, p.421-430, 2004.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. & YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture-techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan Publishing, p. 82-123, 1983.
- BARBER, M.S.; MITCHELL, H.J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. **Internacional Review of Cytology**, v. 172, p. 243-293, 1997.
- BARUAH, A.; BORDOLOI, D.N. High frequency plant regeneration of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. by somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell Rep.**, 8, p.483-485, 1989.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v.32, p.21-81, 1981.

BERLIN, J. **Formation of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells and its Impact on Pharmacy**. In: BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 4. Springer-Verlag, Berlin. 1988.

BLOM, T.J.M.; VAN VLIET, T.B.; SCHRIJPEMA, J.; VAL, J.; VAN IREN, F.; VERPOORTE, R.; LIBBENGA, K.R. Uptake and accumulation of the alkaloids quinine and cinchonamine in cultured cells of *Cinchona robusta* and *Catharantus roseus*. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p.436-442. 1991.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review Plant Biology**, v.54, p. 519-546, 2003.

BOLWELL, G.P. Synthesis of cell wall components: aspects of control. **Phytochemistry**, v.27, p. 1235-1253, 1988.

BOUDET, A.M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. **New Phytologist**, v.129, p. 203-236, 1995.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n.5, p. 839-851, 2001.

BRAUN, A.C. The physiology of plant tumors. **Annual Review Plant Physiology**, v.5, p.133-162, 1954.

BRUCE, R.J. & WEST, C.A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of *Castor bean*. **Plant Physiology**, v. 91, p.889-897, 1989.

BUSAM, G.; JUNGHANN, K.T.; KNEUSEL, R.E.; KASSEMAYER, H.H., MATERN, U. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology**, v.115, p.1039-1048, 1997a.

BUSAM, G.; KASSEMAYER, H.H.; MATERN, U. Differential expression of chitinases of *Vitis vinifera* L responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge **Plant Physiology**, v.115, p.1029-1038, 1997b.

CALDAS, L.S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTB/EMBRAPA - CNPH, 433p., 1990.

CAMPBELL, M. M. & ELLIS, B. F. Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures, **Planta**, n.186, p. 409-417, 1992.

CAMPBELL, M. M. & ELLIS, B. F. Fungal elicitor-mediated responses in pine cultures II. Characterization of cell wall-bound phenolics. **Phytochemistry**, v. 31, p. 737-742, 1992.

DAVEY, M.W.; GILOT, C.; PERSIAU, G.; OSTERGAARD, J.; HAN, Y.; BAUW, G.C.; VAN MONTAGU, M.C. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. **Plant Physiology**, v. 121, p. 535-543, 1999.

DEUS-NEUMANN, B., ZENK, M.H. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion trap mechanism. **Planta**, v. 167, 44-53, 1986.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085-1097, 1995.

DODDS, J.H. ; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 2ed. Cambridge: Cambridge University Press, 232p., 1985.

DONALDSON, L.A. Lignification and lignin topochemistry – an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p.859-873, 2001.

DOUGALL, D.K. **Tissue culture and the study of secondary (natural) products**. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. Editors, *The Biochemistry of Plants, A Comprehensive Treatise. Secondary Plant Products 7*, Academic Press, p. 21–34, 1981.

EBERHARDT, T.L.; BERNARDS, M.A.; HE, L.; DAVIN, L.B.; WOOTEN, J.B.; LEWIS, N.G. Lignification in cell suspension cultures of *Pinus taeda* – in situ characterization of a gymnosperm lignin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 21088-21096, 1993.

ERDTMAN, H. Dehydrierungen in der Coniferylreihe. II Dehydrodi-isoeugenol. **Annalen**, v.503, p. 283-294, 1933.

FALCO, M.C.; MENDES, B.M.J.; NETO, A.T. Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.1, p.1-6, 1996.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York :Waster & Grugter, 613p., 1984.

FERGUS, B.J.; GORING, D.A.I. The location of guaiacyl and syringyl lignin in birch xylem tissue. **Holzforschung**, v. 24, p. 113-117, 1970.

FERREIRA, M. G. R; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23,n.3, p. 473-476, 2001.

FLORES, R.; GOMES, P.R.; FARIA, J.T.C.; CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; PETERS, J.A. Calogênese *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de AGROCIÊNCIA**, v.4, n. 1, p.9-14, 1998.

FREUDENBERG, K. Biosynthesis and constitution of lignin. **Nature**, v.183, p.1152-1155, 1959.

GOULD, J.M. Characterization of lignin *in situ* by photoacoustic spectroscopy. **Plant Physiology**, v.70, n.5, p.1521-1525, 1982.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Cap. 2. p.99-169, 1990.

GRISEBACH, H. Biochemistry of lignification. **Naturwissenschaften**, 64, p. 619-625, 1977.

GROSS, G.G.; MANSELL, R.L.; ZENK, M.H. Hydroxycinnamate: Coenzyme A ligase from lignifying tissue of higher plants. **Biochemistry Physiology Pfan**, v.168, p.42-51, 1975.

GUPTA, P.P. Erradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.6, p-33-39, 1986.

HAHLBROCK, K.; GRISEBACH, H. In: HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The Flavonoids**. Chapman & Hall, London, p. 866-915, 1975.

HAHLBROCK, K. J.; SCHRODER, J.; VIEREGGE. Enzyme regulation in parsley and soybean cell cultures. **Advance Biochemistry Engineer**, v. 18, p. 39-60, 1980.

HAMADA, K.; TOMI, R.; ASADA, Y.; FURUYIA, T. Phytoremediation of bisphenol A by cultured suspension cells of *Eucalyptus perriniana* – regioselective hydroxylation and glycosilation. **Tetrahedron letters**, v. 43, p. 4087-4089, 2002.

HAMADA, K.; TSUTSUMI, Y.; YAMAUCHI, K.; · FUKUSHIMA, K.; NISHIDA, T. Treatment of poplar callus with ferulic and sinapic acids I: incorporation and enhancement of lignin biosynthesis. **Wood Science**, v.49, p.333-338. 2003.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiology Plant Pathology**, v.20, p.61-71, 1982.

HARKING, J.M., OBST, J.R. Lignification in trees. Indication of exclusive peroxidases participation. **Science**, v.180, p.296-298, 1973.

HERGERT, H.L. Infrared spectra of lignin and related compounds. II- Conifer lignin and model compounds. **Organic Chemistry**, v.25, n.3, p. 405-413, 1960.

HERRMANN, K.M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **Plant Cell**, v.7, p. 907-919, 1995.

HOEFNAGEL, M.H.N. VAN IREN, F., LIBBENGA, K.R. In: suspension cultures of *Catharanthus roseus* the cyanide-resistant pathway is engaged in respiration by excess sugar in combination with phosphate or nitrogen starvation. **Physiology Plantarum** (in press). 1993.

HOSEL, W.; FIEDELER-PREISS, A.; BORGMANN, E. Relationship of coniferin - glucosidase to lignification in various plant cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 1, p. 137-148, 1982.

HUAN, L.V.T.; TAKAMURA, T.; TANAKA, M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. **Plant Science**, v. 166, p. 1443-1449, 2004.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulations of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v.23, p. 1349-1359, 1984.

KARKONEN, A.; KOUTANIEMI, S.; MUSTONEN, M.; SYRJÄNEN, K.; BRUNOW, G.; KILPELÄINEN, I.; TEERI, T.; SIMOLA, K. Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 114, n.3, p. 343-353, 2002.

KANEDA, Y.; TABEL, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p.8-12, 1997.

KOBAYASHI, A.K.; VIEIRA, L.G.E. Establishment of an *in vitro* system for studies on the induced resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 719-725, 2000.

KRIKORIAN, A.D.; STEWARD, F.C. **Biochemical differentiation: the biosynthetic potentialities of growing and quiescent tissue.** In: F.C. STEWARD, Editor, *Plant Physiology, A Treatise*, Academic, Press, p. 227-326, 1969.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: *Plant Hormones*, 2^a Ed., Davies P. J. (Ed.), **Kluwer Academic Publishers**, p. 774 – 796, 1995.

KUBOI, T.; YAMADA, Y. Changing cell aggregations and lignification in tobacco suspension cultures. **Plant and Cell Physiology**, v.19, n.3, p.437-443, 1978.

KUTSUKI, H.; SHIMADA, M.; HIGUSHI, T. Distribution and roles of *p*-hydroxycinnamate: CoA ligase in lignin biosynthesis. **Phytochemistry**, v.21, p.67-71, 1982.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 473-476, 1994.

LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vitro* da bananeira *Musa* sp. através da cultura de ápices caulinares.** 1987. 39f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura, Lavras, 1987.

LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; FILHO, J.S.S.B. Indução in vitro de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência agrotécnica**, v.24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.

LANDIM, A.S.; RUGGIERO, R. **Caracterização e estudo da fotodegradação de poliguaiacóis sintetizados por catálise oxidativa, como modelos macromoleculares de lignina**. Iniciação Científica - Graduando em Bacharelado e Licenciatura em Química - Universidade Federal de Uberlândia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 1999.

LEGUAY, J.; GUERN, J. Quantative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension cultured *Acer pseudoplatanus* cells. **Plant Physiology**, v.56, p.356-359. 1975.

LEWIS, N. G. & SARKANEN, S. **Lignin and lignan biosynthesis**, American Chemical Society, 436p., 1998.

LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 455-496, 1990.

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazurom. **In Vitro Cell Development Biological Plant**, v.34, n.4, p.293-299. 1998.

LIN, S. Y. & DENCE, C.W. **Methods in lignin chemistry**, Berlin: Springer-Verlag, 578 p. 1992.

LITZ, R.E.; JARRET, R.L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogênese somática y organogênese. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones.**, Cali: CIAT, p.143-172, 1991.

LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.29, p.92-96, 1993.

LUCZKIEWICZ, M.; ZARATE, R.; DEMBINSKA-MIGAS, W.; MIGAS, P.; VERPOORTE, R. Production of pulchelin E. in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. **Plant Science**, v. 163, p. 91-100, 2002.

LÜDERITZ, T.; SCHATZ, G.; GRISEBACH, H.; Enzymics synthesis of lignin precursors-purification and properties of 4-coumarate: CoA ligase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). **European Journal Biochemistry**, v.123, p. 583-86, 1982.

MANSUR, E.; LACORTE, C.; RABELLO, A.C.G.; CORDEIRO, A.R. In vitro regeneration of *Arachis villosulicarpa* Hoehne from cotyledon segments, leaves and cell suspension. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, n.10, p., 1143-1146, 1993.

MARTIN, B.; COSSALTER, C. Les *Eucalyptus* des Iles de la Sonde. **Bois et forêts des tropiques**, n.164, p.3–25, 1976.

MENDES, A.S.; ALVES, M.V.S. **Manual de Preservação de Madeiras**. IPT. Vol. I e II, São Paulo, 708p., 1986.

MOLLER, R.; KOCH, G.; NANAYAKKARA, B.; SCHMITT, U. Lignification in cell cultures of *Pinus radiata*: activities of enzymes and lignin topochemistry. **Tree Physiology**, v.26, n.2, p. 201-210, 2006.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, n.3, 174-177, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuroninduced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachishypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.268-276, 1995.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis: In Vitro Cellular and Development Biology – **Plant**, v.34, p.267-275, 1998.

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Spring-Verlag, Cap.10. p. 179-206. 1977.

NIMZ, H.; EBEL, J.; GRISEBACH, H. On the structure of lignin from soybean cell suspension cultures. **Z. Naturforsch.**, v.30 c, p. 442-444, 1975.

NISHINARI, N.;YAMAKI, T. Relationship between cell division and endogenous auxin in synchronously-cultured tobacco cells. **Bot. Mag. Tokyo**, v.89, p.73-81. 1976.

NUÑEZ-FALENIUS, H.G.; OCHOA-ALEJO, N. Effect of phenylalanine and phenylpropanoids on the accumulation of capsaicinoids and lignin in cell cultures of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **In Vitro Cell Development Biological-Plant**, v.41, p.801–805, 2005.

OLIVEIRA, G.M.R.; VIEIRA, I.M.S.; BARBOSA, W.C.; SERRA, A;G.P.; SOUZA, D.M.G.; MORAES, M. Indução de calogênese em segmentos radiculares de copaíba (*Copaifera* sp).
http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/07/pdf/Sin%20registro6/Gustavo%20M.%20Resque%20de%20Oliveira.pdf em 04/11/2006.

OZEKI, Y.; KOMAMINE, A.; TANAK, Y. Induction and repression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase enzyme proteins and mRNAs in carrot cell suspension cultures regulated by 2,4-D. **Physiology Plant**, v. 78, p. 400-408, 1990.

PALÚ, E.G.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência agrotécnica**, v. 28, n. 4, p. 736-742, 2004.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 159p., 1997.

PATNAIK, J.; SAHOO, S.; DEBATA, B.K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of FALmarosa grass (*Cymbopogon martinii*). **Plant Cell Reports**, v.16, p.430–434, 1997.

PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULER, M. L. **Immobilized plant cells**. In: PAYNE, G. F.; BRINGI, V.; PRINCE, C.; SHULER, M. L. Editors, *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, Hanser, p. 179–223, 1991.

PEREIRA, C. D.; MELO, B. **Cultura de tecidos vegetais**. UFU / ICIAG, Uberlândia, 2004.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Ed. Mundi-Prensa. Madri. 295 p. 1990.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, n. 60, p. 135-148, 2001.

RALPH, J.; HATFIELD, R.; MARTIN, N. [Identify Cell Wall Factors Limiting Digestibility and forage utilization in sustainable dairy farming](http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=405134&fy=2005). [U.S. Dairy Forage Research Center](http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=405134&fy=2005). 2005.
http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=405134&fy=2005
11/01/2007 11: 33 a.m.

RAMOS, R.L.B.; TOVAR, F.J.; JUNQUEIRA, R.M.; LINO, F.B.; SACHETTO-MARTINS, G. Sugarcane expressed sequences tags (ESTs) encoding enzymes involved in lignin biosynthesis pathways. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, n.1-4, p. 235-241, 2001.

RAMSDEN, L.; NORTHCOTE, D.H. Tracheid formation in cultures of pine (*Pinus sylvestris*) **Journal Cell Science**, v. 88, p. 467-474, 1987.

ROBERT, D.; MOLLARD, A.; BARNOUD, F. 13C NMR qualitative and quantitative study of lignin structure synthesized in *Rosa glauca* calluses. **Plant Physiology Biochemistry**, v.27, p. 297-304, 1989.

RUGINI, E. *In vitro* culture of the olive: an overview of the present scientific status. **Acta Horticulturae**, v. 286, p.93-96, 1990.

SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. **Cell Growth and Accumulation of Secondary Metabolites**. In: K.I. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. vol 4. Academic Press, San Diego. 1987.

SHIMODA, K.; YAMANE, S.; HIRAKAWA, H.; OHTA, S.; HIRATA, T. Biotransformation of phenolic compounds by the cultured cells of *Catharanthus roseus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p. 275–281, 2002.

SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of isolated shoot apical meristem of angiosperm. **American Journal Botany**, v.57, p.562-568, 1970.

SNAPE, J.B.; THOMAS, N.H.; CALLOW, J.A. How suspension cultures of *Catharanthus roseus* respond to oxygen limitation: small-scale tests with applications to large-scale cultures. **Biotechnology Bioengineering**, v.34, p.1058-1062. 1989.

SÖNDAHL, M. R. & SHARP, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Z. Pflanzenphysiol.**, v.81, p.395-408, 1977.

SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A. Otimização de meio de cultura para bananeira (*Musa cavendish* L.). **Scientia Agrícola**, v.53, n.1, p.51-59, 1996.

STICHER, L.; MAUCHI MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopatology**, v.35, p. 235-270, 1997.

STREET, H.E. **Growth in organized and inorganized systems. Knowledge gained by culture of organs and tissue explants**. In *Plant Physiology. A treatise*, v. VB, ed. F.C. Steward. New York: Academic, p.3-224, 1969.

STREET, H.E.; OPIK, H. **Cell growth and differentiation**. In: STREET, H.E.; OPIK, H. *The physiology of flowering plants: their growth and development*. London: E.Arnould, p.150-160, 1970.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v.13, n.1, p.167-178, 2003.

STUMPF, P.K.; CONN, E.E.E. **The biochemistry of plants – Secondary Plant Products**, Academic Press, New York, 798p., 1981.

TABATA, M. **Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures**. In: *Plant tissue culture and its bio-technological application*. Springer-Verlag, Berlim, p. 3-16, 1977.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joa%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20João%20Batista%20Teixeira.pdf em 13-11-2006 às 15h.

TOKUNAGA, N.; SAKAKIBARA, N.; UMEZAWA, T.; ITO, Y.; FUKUDA, H.; SATO, Y. Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary

element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n.1, p.224-232, 2005.

TORRES, A.C. & CALDAS, L. **Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas**. 433p., 1990.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa aab*) *in vitro*. iv. Concentrações de sais, ácido ascórbico e frequência de subcultivos. Comunicação científica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n.2, 2001.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.

VEASEY, E.A.; VIEIRA, M.L.; BANDEL, G. Tissue culture in *Gramineae*, with emphasis on forage grasses. **Ciência e Cultura**, v.43, p.36-43, 1991.

VELHO, C. C.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. **Cupuassu, a new beverage crop for Brazil**. In: Advances in New Crops. Proceeding of the First National Symposium, New Crops: Research, Development, Economics. Janick, J. Simon, J.E. eds. Indianapolis, Indiana, 23-26. 1988.

VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* X *T. obovatum* (STERCULIACEAE). **Acta Amazonica**, v. 34, n.4, p. 507-511, 2004.

VOGEL, H.J., BRODELIUS, P. An *in vivo* ^{31}P NMR comparison of freely suspended and immobilized *Catharantus roseus* plant cells. **Journal of Biotechnology**, v.1, p.159-170. 1984.

VOO, K.S.; WHETTEN, R.W.; O'MALLEY, D.M.; SEDEROFF, R.R. 4-coumarate; CoA ligase in xylem of loblolly pine. **Plant Physiology**, v. 108, p.85-97, 1995.

VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. Feasibility of *in vitro* propagation of banana and plantains. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.62, n.4, p.323-328, 1985.

VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation, conservation, and exchange of *Musa* germplasm**. Rome : IBPGR, 56p. (IBPGR. Practical manual for handling crop germplasm *in vitro*, 2), 1989.

WAGNER JUNIOR, A.; COUTO, M.; QUEZADA, A.C. Multiplicação “*in vitro*” do porta-enxerto de ameixeira ‘JULIOR’. **Revista brasileira Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 121-124, 2003.

WATT, M.P.; BLAKEWAY, F.; CRESSWELL, C.F. HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Journal**, n.157, p.59-65, 1991.

WHETTEN, R.W.; MACKAY, J.J.; SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.585-609, 1998.

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p. 1001-1013, 1995.

WILHELM, E. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.57, p.57-60, 1999.

WINK, M., MENDE, P. Uptake of lupanine by alkaloid-storing epidermal cells of *Lupinus polyphyllus*. **Planta Med.**, v.53, p.465-469. 1987.

XU, N.; BEWLEY, J.D. Contracting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfalfa (*Medicago sativa* L.) as revealed by scanning electron microscopy. **Plant Cell Reports**, v.11, p.279-284, 1992.

YANG, J.; MYAO, S.; UCHIYAMA, T. Responses of *Mentha* suspension cultured cells to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid accumulation of sterified phenolic acids in their cell walls. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.63, n.9, p. 1522-1527, 1999.

YEOMAN, M.M.; MACLEOD, A.J. Tissue (callus) cultures- techniques. **In plant tissue and cell culture**. 2 ed. H.E. Street. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.31-59. 1977.

YEOMAN, M.M.; LINDSEY, K.; MIEDZYBRODZKA, M.B.; McLAUCHLAN, W.R. Accumulation of secondary products as a factor of differentiation in plant cell and tissue cultures. **In Differentiation in vitro**. Ed. M.M. Yeoman and D.E.S. Truman. Cambridge: Cambridge University Press, p.65-82. 1982.

YOSHIDA, M.; OHTA, H.; YAMAMOTO, H.; OKUYAMA, T. Tensile growth stress and lignin distribution in the cell walls of yellow poplar, *Liriodendron tulipifera* Linn. **Trees**, v. 16, p. 457-464, 2002.

ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; SCHULTE, U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. **Planta Med. Suppl.**, p. 79-101, 1975.

ZENK, M.H. Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cultures as a pot of gold. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3861-3863, 1991.

ZIV, M. & HALEVY, A.H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. **HortScience**, vol. 18, p.434-436, 1983.

<http://plato.if.usp.br/1-2004/fap0181d/Lei%20de%20Beer.htm> 21/02/2007 13h 50min
(LEI de LAMBERT & BEER)

