

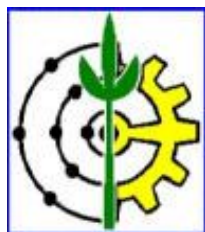
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS

TESE

**Lignificação comparativa de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake por
ferramentas biotecnológicas e polimerização *in vitro***

Maria Beatriz de Oliveira Monteiro

2009



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

LIGNIFICAÇÃO COMPARATIVA DE *Eucalyptus urophylla* S. T.
BLAKE POR FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS E
POLIMERIZAÇÃO *in vitro*

MARIA BEATRIZ DE OLIVEIRA MONTEIRO

Sob a Orientação do Professor Dr.

Heber dos Santos Abreu

e Co-orientação da Pesquisadora Dra.

Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

Seropédica, RJ
Maio de 2009

634.973766 Monteiro, Maria Beatriz de
M7751 Oliveira -

T Lignificação comparativa de
Eucalyptus urophylla S.T. Blake
por ferramentas biotecnológicas e
polimerização in vitro / Maria
Beatriz de Oliveira Monteiro. -
2009.

134f. : il.

Orientador: Heber dos Santos
Abreu.

Tese (doutorado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Cursos de Pós-
Graduação em Ciências Ambientais
e Florestais.

Bibliografia: f. 81-100.

1. Eucalipto - Teses. 2.
Lignina - Teses. 3. Polimerização
- Teses. 4. *Eucalyptus urophylla*
- Teses. I. Abreu, Heber dos
Santos - II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Cursos
de Pós-Graduação em Ciências
Ambientais e Florestais. III.
Título.

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

MARIA BEATRIZ DE OLIVEIRA MONTEIRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais, área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

Tese aprovada em 29/05/2009

**Heber dos Santos Abreu. Prof. Dr. UFRRJ
(Orientador)**

Graciela Inês Bolzon de Muniz Prof^a. Dr^a. UFPR

João Vicente de Figueiredo Latorraca. Prof. Dr. UFRRJ

Rosilei Aparecida Garcia Prof^a. Dr^a. UFRRJ

Rosani do Carmo de Oliveira Arruda Prof^a. Dr^a. UNIRIO

Ao meu pai Amilcar Monteiro, que tenho certeza da sua presença constante na minha vida.

A minha amada avó Ana Venâncio de Oliveira, que tantas saudades deixou em meu coração, com lembranças sempre vivas de carinho e muito amor.

Dedico.

Agradecimentos

A Deus, a Nossa Senhora Aparecida, a São Jorge e todos os santos, por toda proteção e benção recebida hoje e sempre.

A minha mãe, Maria Florinda de Oliveira Monteiro, por todo apoio e incentivo na minha vida, e por ser um exemplo de fé e otimismo no meu caminhar. E por ter construído e ainda construir uma história de vida repleta de realizações. Não posso esquecer que nos vez pessoas do bem.

A minha grande amiga Regina Paula Willemen Pereira por toda ajuda e incentivo nas alegrias e nos dias difíceis, compartilhando os entusiasmos e as agruras de sermos pioneiras em uma área de pesquisa nova dentro do Instituto de Florestas. Valeu as dificuldades! A chegada teve um maior valor.

A D. Lucy por toda amizade, carinho e incentivo.

Ao meu orientador prof. Heber dos Santos Abreu.

A minha Co-orientadora Ana Cristina Pinto Portugal Carvalho, que mesmo estando longe se fez presente através de e-mails e telefonemas, sendo parte essencial no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Madeira e de Química da Madeira.

Aos professores do Instituto de Florestas e de toda UFRRJ que sempre que solicitados para qualquer esclarecimento, dúvida se fizeram presentes.

Ao prof. Jorge Mitiyo Maeda pela ajuda na estatística.

Aos funcionários do Instituto de Florestas por toda atenção e presteza nos momentos necessários.

A Mendes que sempre se mostrou prestativo e atencioso com todas as solicitações pedidas.

A José Carlos pela ajuda no Laboratório de Química da Madeira.

Ao Laboratório de Polímeros da Engenharia Química, prof. Lindoval, ao técnico Ormino e as alunas Bianca e Fernanda, pela sua atenção e ajuda.

Ao Laboratório de Química Orgânica, através do funcionário Maurício pela grandiosa ajuda nas análises das ressonâncias.

A professora Inês Sabioni Resck do Instituto de Química da UNB.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Ambientais e Florestais por todo apoio, acompanhamento e incentivo.

A CAPES pela bolsa concedida.

A FAPERJ pelo apoio na montagem e manutenção do Laboratório de Biotecnologia da Madeira.

Lignificação comparativa de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake por ferramentas biotecnológicas e polimerização *in vitro*. Seropédica: UFRRJ, 2009. 134p. (Tese, Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais).

RESUMO

Apesar dos avanços tecnológicos, a compreensão da formação estrutural da lignina ainda é alvo de inúmeras investigações científicas. Esta pesquisa foi realizada com calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake para a produção de lignina. Os calos foram obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares desenvolvidos em meios de cultura acrescidos de uma combinação da citocinina TDZ e das auxinas ácidos: 3-indolacético (AIA), α -naftalenoacético (ANA) e diclorofenoxiacético (2,4-D), nas formas isoladas e conjugadas. Para a produção de células em suspensão foram utilizados os calos formados no tratamento contendo 20 μ M de AIA + 3 μ M de TDZ, após 30 dias de cultivo *in vitro*. Obtidas as células em suspensão, a produção de lignina foi induzida empregando-se quatro elicitores: ácido jasmônico (AJ), ANA, sacarose e testemunha (sem o emprego de elicitores). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, 4 repetições e um Erlenmeyer contendo 125 ml de cultura de células em suspensão. O teste de Wiesner confirmou a presença de lignina, em todos os tratamentos testados. Em 3 das 4 repetições foram realizados subtratamentos para a produção de DHPs (polímeros por desidrogenação oxidativa) a partir do filtrado da suspensão com H₂O₂, H₂O₂ + peroxidase e peroxidase. A análise desses subtratamentos foi realizada pela detecção da produção de polilignóis através de raios infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN H). O filtrado da suspensão da repetição 4 foi analisado por ultravioleta (UV), IV, RMN ¹³C e RMN H, sendo constatada a presença de lignina extracelular, com o maior teor sendo observado na presença do elicitador sacarose, seguido do ANA e AJ. As células em suspensão apresentaram aumento no teor de lignina na parede celular em todos os tratamentos em relação à testemunha e os maiores valores foram com o meio contendo sacarose. Foram analisadas também as DHPs tendo como colchão o meio de cultura MS acrescido dos mesmos elicitores testados na fase de suspensão celular. Para isto foram utilizados como precursores os álcoois coniferílico ou sinapílico, H₂O₂ e peroxidase, com a lignina analisada em RMN H e RMN ¹³C. Os resultados mostraram que houve síntese de DHPs do álcool coniferílico (DHP1c, DHP2c e DHP4c) e do álcool sinapílico (DHP2s). Porém quando se utilizou como precursor o álcool coniferílico não foram sintetizadas DHPs no tratamento contendo sacarose como elicitador. E, quando foi utilizado como precursor o álcool sinapílico, somente foram formadas DHPs na presença do elicitador ANA. Concluiu-se, então, que a sacarose apresentou-se como um elicitador adequado para a produção de lignina nas células em suspensão, tanto em nível celular quanto extracelular. Entretanto, isto não foi observado em relação à produção de DHP. A auxina ANA teve funcionalidade maior na formação de DHP2c e DHP2s. Estes resultados devem ser considerados como um avanço nos estudos de lignificação com a utilização de células em suspensão de *E. urophylla*. Quando esses questionamentos forem identificados e solucionados será possível o desenvolvimento de novos indivíduos desta espécie que conduzam à produção de produtos florestais de melhor qualidade, com menor impacto ambiental nos processos industriais.

Palavras chave: biotecnologia, calogênese, células em suspensão, lignina extracelular e *Eucalyptus urophylla*.

Comparative lignification of *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake by biotechnological tools and polymerization *in vitro*. Seropédica, UFRRJ, 2009. 134p. (Thesis, Postgraduate in Environmental and Forest Sciences).

ABSTRACT

In spite of the technological progresses, the understanding of the lignin structural formation is still matter of scientific investigations. This research aimed to utilize *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake callus for lignin production. This callus were obtained from stems segments explants grown in culture medium added with a combination of the cytokine TDZ and the auxins acid indole-3-acetic (IAA), acid α -naphthaleneacetic (NAA) and acid 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D). This growth regulators were utilized either alone or mixtured. For cell suspension production it was utilized callus obtained in medium culture added with 20 μ M IAA + 3 μ M TDZ, after 30 days of growth *in vitro*. Once the cells suspension was obtained, the lignin production was induced by four elicitors: jasmonic acid (JA), NAA, sucrose and control (without elicitor). It was used a completely randomized design with four replications. Each plot consisted of an Erlenmeyer with 125 ml of cells suspension culture. The Wiesner test confirmed the lignin presence in all treatments. In 3 of the 4 replicatons it was performed another evaluation to the production of DHPs (polymers by oxidative dehydrogenation) utilizing suspension filtrate added with H₂O₂, H₂O₂ + peroxidase and peroxidase. These new treatments were analyzed through polilignols production utilizing infrared (IR) and nuclear magnetic resonance of the hydrogen (NMR H). The suspension filtrate analysis of the 4th replication through ultraviolet (UV), IR, NMR ¹³C and NMR H evidenced the production of extra cellular lignin. Of this, the largest content was obtained in presence of sucrose as elicitor, followed by ANA and AJ. The cells in suspension increased the cellular wall lignin content in all treatments in relation to the control and the largest values were with the medium containing sucrose. DHPs were also analyzed utilizing as mattress the MS medium added of the same elicitors tested in the cellular suspension phase. For this, it was utilized as precursors the following alcohols: coniferyl or sinapyl, H₂O₂ and peroxidase; amd the analyses were done in RMN H and RMN ¹³C. The results showed DHPs synthesis of both coniferyl alcohol (DHP1c, DHP2c and DHP4c) and sinapyl alcohol (DHP2s). Nevertheless, It was not synthesized DHP in the treatment containing sucrose when the precursor was the coniferyl alcohol. On the other hand, when the sinapyl alcohol was the precursor, DHPs were only synthesized in the presence of ANA as elicitor. It was concluded that sucrose is an appropriate elicitor for the lignin production in cells suspension both at cellular and extra cellular level. However, this result was not observed in relation to DHP production. NAA auxin had a better functionality in the DHP2c and DHP2s formation. These results may be considered a progress in the lignification studies with the use of *E. urophylla* cell suspension. Once all these questions were answered and solved, it will be possible to develop *E.urophylla* suitable plants with better quality forest products and able to cause smaller environmental impact in the industrial processes.

Key words: biotechnology, calogenesis, cells in suspension, extracellular lignin and *Eucalyptus urophylla*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conformação da celulose.	6
Figura 2. Principais açúcares que compõem as hemiceluloses.	7
Figura 3. Inicialização da polimerização da lignina na parede celular envolvendo os precursores: álcool <i>p</i> -cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente.	13
Figura 4. Formação das ligninas cumarila, guaiacila e siringila.	15
Figura 5. Rota biossintética da lignina tradicional e não tradicional, na parede celular de plantas superiores.	17
Figura 6. Esquema de redução do peróxido de hidrogênio.	21
Figura 7. (A) Germinação, (B) Plântula com 30 dias e (C) Segmento caulinar para produção de calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> .	30
Figura 8. Relação dos tratamentos com as respectivas nomenclaturas.	33
Figura 9. Reação de Wiesner.	36
Figura 10. Foto do calo com textura compacta, obtido a partir de explante de segmento caulinar de <i>Eucalyptus urophylla</i> , formado no tratamento EU16 (0,37 µM de AIA).	44
Figura 11. Tipo de textura apresentado pelos calos obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de <i>Eucalyptus urophylla</i> , cultivados em diferentes tratamentos utilizando AIA de forma isolada.	44
Figura 12. Foto do calo de textura semicompacta, obtido a partir de explante de segmento caulinar de <i>Eucalyptus urophylla</i> , formado no tratamento EU11 (2µM de TDZ).	45
Figura 13. Fotos dos calos de textura friável, obtido a partir de explantes de segmentos caulinares de <i>Eucalyptus urophylla</i> , formados no tratamento EU12(2,43 µM de TDZ).	46
Figura 14. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de <i>Eucalyptus urophylla</i> , cultivados em diferentes tratamentos utilizando TDZ de forma isolada.	46
Figura 15. Calos de textura semifriável EU2 (15µM de AIA + 2 de TDZ)	47
Figura 16. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de <i>Eucalyptus urophylla</i> , cultivados em diferentes tratamentos utilizando AIA e TDZ de forma combinada.	48
Figura 17. Calos com textura semicompacta, EU 5 (12µM ANA + 2µM de TDZ)	49
Figura 18. Foto dos calos com textura semifriável, obtido a partir de explantes de segmento caulinar de <i>Eucalyptus urophylla</i> , formado no tratamento EU 6 (16 µM ANA + 2µM TDZ).	49
Figura 19. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de <i>Eucalyptus urophylla</i> , cultivados em diferentes tratamentos utilizando ANA e TDZ de forma combinada.	50
Figura 20. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de <i>Eucalyptus urophylla</i> , cultivados em diferentes tratamentos utilizando 2,4-D e TDZ de forma combinada.	51
Figura 21. Teste Wiesner dos tratamentos URO1, URO2, URO3 e URO4	52
Figura 22. Teor de lignina na parede das células em suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	54

Figura 23. Correlação positiva dos elicitores no nível celular e extracelular	57
Figura 24. DHPc1 em meio reacional por polimerização contínua controlada.	59
Figura 25. Espectro de RMN ¹³ C da DHP2c	61
Figura 26. Espectro da RMN ¹³ C da DHP4c	62
Figura 27. Espectro da RMN ¹³ C da DHP1c	63
Figura 28. Espectro da RMN H do DHP4c	66
Figura 29. Espectro da RMN H do DHP2c	67
Figura 30. Espectro da RMN H do DHP1c	68
Figura 31. Espectro da RMN H do DHP2s	69
Figura 32. a) Células em suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i> ; b) Visão da lignina extracelular no meio em suspensão e c) Névoa formada pela lignina extracelular com Erlenmeyer em movimento	70
Figura 33. Espectro da RMN H do URO1le	71
Figura 34. Espectro da RMN H do URO2le	72
Figura 35. Espectro da RMN H do URO3le	73
Figura 36. Espectro da RMN H do URO4le	74
Figura 37. Infravermelho do tratamento URO1fp do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	76
Figura 38. Infravermelho do tratamento URO1fp do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	106
Figura 39. Infravermelho do tratamento URO1fph do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	106
Figura 40. Infravermelho do tratamento URO1 Peroxidase do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	107
Figura 41. Infravermelho do tratamento URO2fh do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	107
Figura 42. Infravermelho do tratamento URO2fhp do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	108
Figura 43. Infravermelho do tratamento URO2fp do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	108
Figura 44. Infravermelho do tratamento URO3fh filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	109
Figura 45. Infravermelho do tratamento URO3fhp do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	109
Figura 46. Infravermelho do tratamento URO3fp do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	110
Figura 47. Infravermelho do tratamento URO4fh do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	110
Figura 48. Infravermelho do tratamento URO4fhp do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	111
Figura 49. Infravermelho do tratamento URO4fp do filtrado da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	111
Figura 50. Espectro da RMN H da DHP3c	112
Figura 51. Espectro da RMN H da DHP1s	113
Figura 52. Espectro da RMN H da DHP2s	114
Figura 53. Espectro da RMN H da DHP3s	115
Figura 54. Espectro da RMN H da DHP4s	116
Figura 55. Espectro da RMN ¹³ C da DHP1c	117
Figura 56. Espectro da RMN ¹³ C da DHP2c	118

Figura 57. Espectro da RMN ^{13}C da DHP4c	119
Figura 58. Espectro da RMN H do URO1fh	120
Figura 59. Espectro da RMN H do URO1fhp	121
Figura 60. Espectro da RMN H do URO1fp	122
Figura 61. Espectro da RMN H do URO2fh	123
Figura 62. Espectro da RMN H do URO2fhp	124
Figura 63. Espectro da RMN H do URO2p	125
Figura 64. Espectro da RMN H do URO3hp	126
Figura 65. Espectro da RMN H do URO3p	127
Figura 66. Espectro da RMN H do URO4h	128
Figura 67. Espectro da RMN H do URO4hp	129
Figura 68. Espectro da RMN H do DEG4p	130
Figura 69. Espectro da RMN ^{13}C do URO1 da lignina extracelular	131
Figura 70. Espectro da RMN ^{13}C do URO2 da lignina extracelular	132
Figura 71. Espectro da RMN ^{13}C do URO3 da lignina extracelular	133
Figura 72. Espectro da RMN ^{13}C do URO4 da lignina extracelular	134

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas que atuam sobre a formação dos precursores da lignina no citoplasma das células vegetais	20
Tabela 2. Meio de cultura MS para germinação.	31
Tabela 3. Legendas, reguladores de crescimentos e quantidades de meio MS modificado utilizado nos tratamentos de calos de <i>Eucalyptus urophylla</i> .	32
Tabela 4. Nomeação dos tratamentos com elicitores para células no meio de suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	34
Tabela 5. Nomeação utilizada nos tratamentos para a indução de lignina extracelular no meio de suspensão celular.	35
Tabela 6. Nomeação utilizada nos subtratamentos do filtrado da suspensão para produção de DHPs	37
Tabela 7. Tratamentos utilizados para a formação de calo, em explantes de segmento caulinar de <i>Eucalyptus urophylla</i> .	42
Tabela 8. Nomenclatura dos tratamentos com eliciadores para células no meio de suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	53
Tabela 9. Comparações através do Teste Tukey a nível de 5% de significância das médias dos teores de lignina da parede das células em suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	53
Tabela 10. Nomenclatura utilizada nos tratamentos para a indução de ligninas extracelulares encontrados no líquido da suspensão celular	55
Tabela 11. Comparações através do Teste Tukey a nível de 5% de significância das médias dos teores das ligninas extracelulares do meio de suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	56
Tabela 12. Tratamentos realizados síntese de DHPS	58
Tabela 13. Sinais da RMN ¹³ C do controle da DHP do álcool coníferico	60
Tabela 14. Sinais, atribuições e estruturas da RMN H.	65
Tabela 15. Nomenclatura utilizada nos subtratamentos do filtrado da suspensão celular para produção dos DHPs	75
Tabela 16. Teores de lignina da parede celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	103
Tabela 17. Teores de lignina extracelular do meio em suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	103
Tabela 18. Análise de Variância do teor de lignina da parede celular	104
Tabela 19. Análise de Variância do teor de lignina extracelular	104
Tabela 20. Peso dos DHPs dos filtrados	105

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

IV	Infravermelho
RMN	Ressonância magnética nuclear
DHP	polímero por oxidação desidrogenativa
MS	meio nutritivo Murashige & Skoog
TDZ	thidiazuron
AIA	ácido 3 indol-acético
ANA	ácido naftaleno-acético
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AJ	ácido jasmônico
BOD	câmara incubadora
UV	Ultravioleta
ppm	parte por milhão
^{13}C	carbono-13
CDCl_3	clorofórmio
DMSO-d6	dimetilsulfóxido-hexadeuterado
$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Micro mol por metro ao quadrado por segundo (número de fótons em certo incidente de banda de onda por unidade de tempo (s) em unidade de área (m))
$\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Microeinstein por metro ao quadrado por segundo (tem sido usado para representar a quantidade de energia luminosa no número de Avogadro de fótons)
μM	Micromolar
BA	6-benziladenina
PAL	Fenilalanina-amônia-liase
pH	Potencial hidrogeniônico
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
BAP	Benzilaminopurina
RMN	ressonância magnética nuclear
μL	Microlitro
[]	Concentração
$\beta\text{-O-4}$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
$\beta\text{-}\beta$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
$\beta\text{-O-5}$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
$\beta\text{-O-1}$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
$\alpha\text{-O-4}$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
$\beta\text{-5}$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
5-5	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
Ca^{2+}	íons cálcio
Mn (III)	triacetato de manganês
Fe	Ferro

Ca	Cálcio
KBr	brometo de potássio
KI	iodeto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
HCl	Ácido clorídrico
G	lignina do tipo guaiacila
S	lignina do tipo siringila
H	lignina do tipo cumarila
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio ou cal hidratada
β-1	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
N	normal (normalidade)
¹⁸ O	Oxigênio-18
EU1	Tratamento para a formação de calo com AIA + TDZ
EU2	Tratamento para a formação de calo com AIA + TDZ
EU3	Tratamento para a formação de calo com 2,4-D + TDZ
EU4	Tratamento para a formação de calo com 2,4-D + TDZ
EU5	Tratamento para a formação de calo com ANA + TDZ
EU6	Tratamento para a formação de calo com ANA + TDZ
EU7	Tratamento para a formação de calo com AIA + TDZ
EU8	Tratamento para a formação de calo com AIA + TDZ
EU9	Tratamento para a formação de calo com AIA + TDZ
EU10	Tratamento para a formação de calo com AIA + TDZ
EU11	Tratamento para a formação de calo com TDZ
EU12	Tratamento para a formação de calo com TDZ
EU13	Tratamento para a formação de calo com TDZ
EU14	Tratamento para a formação de calo com TDZ
EU15	Tratamento para a formação de calo com TDZ
EU16	Tratamento para a formação de calo com AIA
EU17	Tratamento para a formação de calo com AIA
EU18	Tratamento para a formação de calo com AIA
EU19	Tratamento para a formação de calo com AIA
EU20	Tratamento para a formação de calo com AIA
EU21	Tratamento para a formação de calo com AIA
DHP1h	Subtratamento 1 do filtrado com peróxido de hidrogênio
DHP1p	Subtratamento 1 do filtrado com peroxidase
DHP1hp	Subtratamento 1 do filtrado com peróxido de hidrogênio + peroxidase
DHP2h	Subtratamento 2 do filtrado com peróxido de hidrogênio
DHP2p	Subtratamento 2 do filtrado com peroxidase
DHP2hp	Subtratamento 2 do filtrado com peróxido de hidrogênio + peroxidase
DHP3h	Subtratamento 3 do filtrado com peróxido de hidrogênio
DHP3p	Subtratamento 3do filtrado com peroxidase
DHP3hp	Subtratamento 3 do filtrado com peróxido de hidrogênio + peroxidase
DHP4h	Subtratamento 4 do filtrado com peróxido de hidrogênio
DHP4p	Subtratamento 4 do filtrado com peroxidase
DHP4hp	Subtratamento 4 do filtrado com peróxido de hidrogênio + peroxidase

DHP1c	Tratamento 1 com precursor álcool coniferílico
DHP2c	Tratamento 2 com precursor álcool coniferílico
DHP3c	Tratamento 3 com precursor álcool coniferílico
DHP4c	Tratamento 4 com precursor álcool coniferílico
DHP1s	Tratamento 1 com precursor álcool sinapílico
DHP2s	Tratamento 2 com precursor álcool sinapílico
DHP3s	Tratamento 3 com precursor álcool sinapílico
DHP4s	Tratamento 4 com precursor álcool sinapílico
URO1c	Tratamento 1 células em suspensão
URO2c	Tratamento 2 células em suspensão
URO3c	Tratamento 3 células em suspensão
URO4c	Tratamento 4 células em suspensão
URO1e	Tratamento 1 lignina extracelular
URO2e	Tratamento 2 lignina extracelular
URO3e	Tratamento 3 lignina extracelular
URO4e	Tratamento 4 lignina extracelular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Parede celular	3
2.1.1 Principais constituintes da parede celular	5
2.1.1.1 Celulose	5
2.1.1.2 Hemicelulose	6
2.1.1.3 Lignina	7
2.1.1.4 Proteínas da parede celular	9
2.1.1.5 Proteínas dirigentes	9
2.2 Lignificação	10
2.3 Peroxidase	21
2.4 DHP – polimerização desidrogenativa	22
2.5 Cultura de tecidos	22
2.5.1 Calogênese	24
2.5.2 Cultura de células vegetais	27
2.6 Biotecnologia	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Obtenção dos explantes	30
3.2 Produção de calos	31
3.2.1 Avaliação dos calos	33
3.2.2 Seleção do calo	33
3.3 Preparação do meio de cultura de suspensão para produção de células de <i>Eucalyptus urophylla</i>	33
3.3.1 Tratamentos com eliciadores para indução de lignina nas células em suspensão e lignina extracelular	34
3.4 Separação das células em suspensão do meio líquido	35
3.5 Teste Wiesner	35
3.6 Preparação de três repetições do filtrado da suspensão para produção de DHPs a partir de subtratamentos.	36
3.7 Preparo dos DHPs	
3.8 Acetilação	38
3.9 Obtenção da lignina tioglicolato da parede das células em suspensão	38
3.10 Determinação do teor de lignina por UV do filtrado da suspensão celular	39
3.11 Liofilização do precipitado do filtrado da suspensão celular	
3.12 Análise no Infravermelho	40
3.12.1 Infravermelho dos DHPs dos filtrados	40
3.13 RMN H	40
3.13.1 RMN H dos DHPs dos filtrados e DHPs do meio MS	40
3.14 RMN ¹³ C no estado líquido	40
3.14.1 RMN ¹³ C DHPs do meio MS	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Formação dos Calos	42
4.1.1 AIA (ácido indolacético)	42
4.1.2 TDZ (Tiadzuron)	43
4.1.3 AIA e TDZ (Tiadzuron)	45
4.1.4 ANA (ácido α -naftalenoacético) e TDZ (Tiadzuron)	48

4.1.5 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e TDZ (Tiadzuron)	50
4.2 Teste de Wiesner realizado com amostra do meio de cultura de células de <i>Eucalyptus urophylla</i>	52
4.3 Quantificação da lignina no Ultravioleta	
4.3.1 Quantificação da lignina da parede das células de suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	53
4.3.2 Quantificação dos polilignóis extracelulares do meio de suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	55
4.3.3 A inter-relação do teor de lignina da parede das células em suspensão com os polilignóis extracelulares do meio de suspensão de <i>Eucalyptus urophylla</i>	57
4.4 Análises de Ressonância Magnética Nuclear	58
4.4.1 RMN ¹³ C dos DHPs	58
4.4.2 RMN H dos DHPs	64
4.4.3 RMN H dos DHPs dos subtratamentos dos filtrados da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	70
4.4.4 RMN H da lignina extracelular dos filtrados da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	70
4.4.5 RMN ¹³ C dos DHPs da lignina extracelular dos filtrados da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	70
4.5 Infravermelho dos DHPs dos subtratamentos dos filtrados da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	75
5. CONCLUSÕES	78
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. ANEXOS	102
ANEXO I. Tabelas dos teores de lignina da parede celular e extracelular	103
ANEXO II. Análise de Variância da lignina da parede celular e extracelular	104
ANEXO III. Peso dos produtos formados do meio extracelular com H ₂ O ₂ , peroxidase e H ₂ O ₂ + peroxidase	105
ANEXO IV. Espectros do infravermelho dos filtrados da suspensão celular de <i>Eucalyptus urophylla</i>	106
ANEXO V. Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs	112
ANEXO VI. Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C das DHPs	117
ANEXO VII. Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs dos subtratamentos dos filtrados da suspensão celular	120
ANEXO VIII. Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C	131

1. INTRODUÇÃO

O termo lignina aplica-se às macromoléculas de origem fenilpropanoídica (C_6C_3) biossintetizadas na parede celular e na lamela média da maioria das plantas superiores. Estas biomoléculas apresentam funções fisiológicas e estruturais que contribuem para facilitar o fluxo de água e aumentar a estabilidade e rigidez do sistema multi-molecular da parede celular, apresentando baixa solubilidade em água o que dificulta sua mobilidade entre camadas da parede das células. A lignina tem ação cimentadora, contribuindo para a estrutura da parede celular, além de funcionar como agente protetor a fatores bióticos e abióticos.

Apesar dos avanços tecnológicos, o entendimento da formação da lignina ainda é alvo de inúmeras investigações científicas. FREUDENBERG (1959) e FREUDENBERG & NEISH (1968), por exemplo, há mais de quatro décadas, afirmavam que a polimerização da lignina na parede celular ocorria através de acoplamentos ao acaso entre radicais fenólicos como nas polimerizações desidrogenativas (DHPs) sintetizadas em laboratório pelo método contínuo ou descontínuo. Entretanto, recentes estudos revelam a existência de um possível controle na polimerização da lignina (DAVIN & LEWIS, 2000; HUMPHREYS & CHAPPLE, 2002). Este fato pode estar associado à participação de proteínas dirigentes na formação das lignanas. Outras hipóteses versam também sobre a participação da celulose ou até mesmo da própria lignina como colchão matriz, controlando sua própria deposição e organização nas camadas celulares (LEWIS & SARKANEN, 1998). Todas estas hipóteses são também questionáveis em se tratando que a parede celular é constituída por um sistema multi-molecular de extrema complexidade organizacional e estrutural.

Os lignóis (C_6C_3), fenilpropanóides tais como: os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico são precursores majoritários finais da lignina, porém em plantas mutantes como o *Pinus taeda* L. outros fenóis, principalmente o álcool diidroconiferílico (monômero normalmente não associado ao caminho biossintético da lignina, maior componente da lignina no mutante do *Pinus taeda* L. ocorrendo por volta de 30%, sendo que no *Pinus taeda* normal ocorre aproximadamente 3%) e o 2-metoxibenzaldeído que também teve aumento, já foram detectados por RALPH et al. (1997). Estes tipos de ligninas são denominados de anormais ou não tradicionais.

Há de se supor duas etapas durante a formação da lignina. A princípio a biossíntese da lignina inicia-se através da condensação envolvendo as substâncias 4-fosfato de eritrose e o ácido fosfoenolpirúvico que é derivado da glicose através da glicólise. Ambos são iniciadores de uma via biossintética que através de reação de condensação e de várias transformações, forma o ácido chiquímico. Na segunda etapa ocorrem hidroxilações, metilações e reduções com a atuação de enzimas catalisando as reações para formação dos precursores iniciais, intermediários e finais do caminho biossintético (ABREU, 1994).

O polímero de lignina é um componente da madeira cuja síntese ocorre na parede celular através de um sistema oxi-dependente (HIGUCHI, 1990). Radicais fenólicos, os quais são formados via reação envolvendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidase, desencadeiam a polimerização e conseqüentemente a formação da lignina na parede celular, sendo o NADH (dinucleotídeo nicotinamida adenina) um doador de elétrons suprindo o sistema peroxidativo. Um mecanismo estratégico envolvendo oxigênio ativo pelas plantas tem como conseqüência a formação de uma barreira mecânica contra os organismos predadores (HIGUCHI, 1997).

O uso de ferramentas biotecnológicas, para dirimir dúvidas sobre a participação das proteínas dirigentes na formação da lignina tem sido amplamente discutido nesse

início de século. Os conceitos modernos biotecnológicos na formação da lignina esbarram ainda em diversos obstáculos de natureza teórica e experimental. Recentemente, as teorias de polimerização confundem-se na participação de proteínas na formação da lignina. Todos esses questionamentos identificados e solucionados poderão contribuir com a biotecnologia no desenvolvimento de novos indivíduos que conduzam a produtos florestais de melhor qualidade e menor impacto ambiental nos processos industriais envolvendo a utilização do *Eucalyptus urophylla*.

Esta tese deve ser considerada como um avanço nos estudos de lignificação com a utilização de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. Tendo como objetivo geral propor novos protocolos para indução de calos e para o cultivo de células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, visando estudos posteriores para maiores perspectivas da utilização desta espécie com maior rendimento e melhor qualidade da madeira e menor impacto ambiental com base em novas metodologias na formação de lignina da parede das células em suspensão, lignina extracelular e DHPs (polímero por oxidação desidrogenativa).

E como objetivos específicos:

- Desenvolver protocolos para indução de calogênese em explantes de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake;
- Verificar a presença de lignina na parede celular;
- Quantificar a lignina presente na parede das células cultivadas *in vitro* em suspensão celular por ultravioleta (UV);
- Quantificar a presença de lignina extracelular no meio em suspensão por UV;
- Analisar os produtos da polimerização nas DHPs dos filtrados da cultura de células em suspensão através de análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Analisar a lignina extracelular excretada pelas células em suspensão via RMN; e
- Identificar células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* através de métodos inovadores na formação da lignina visando estratégias biotecnológicas do controle biossintético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Parede Celular

Quimicamente, a madeira é melhor definida como sendo um biopolímero tridimensional, formado por celulose, hemicelulose e lignina, e em menor quantidade por extrativos e materiais inorgânicos. A substância química mais abundante numa árvore viva é a água, mas na madeira em base seca, a parede das células é formada por polímeros de açúcares (carboidratos, 65 a 75%), combinados com lignina (18 a 35%) (ROWELL et al., 2005).

As células vegetais são revestidas por paredes celulares celulósicas (HIGUCHI, 1997). A parede celular é uma entidade molecular complexa composta por polissacarídeos, lignina, suberina, lipídeos, proteínas, cálcio, boro e água e algumas substâncias que variam entre espécies de plantas, tipos de células, e até mesmo entre células vizinhas. (CASSAB, 1998).

A parede das células vegetais é altamente diferenciada, enquanto que a das células dos microorganismos é menos diferenciada, sendo constituída por componentes químicos diferentes. A estrutura da parede celular é similar àquela das fibras de carbono reforçada com resina ou concreto (HIGUCHI, 1997).

A parede celular é dividida em parede primária e secundária em função dos processos de desenvolvimento (HIGUCHI, 1997). A superfície mais externa da célula vegetal é composta, em seu estágio inicial, pela parede celular primária. Esta parede é composta de microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectinas e proteínas, sendo a primeira camada depositada durante o desenvolvimento celular. Esse sistema permite a expansão (crescimento) da célula jovem. Já a parede secundária, apesar de ter a celulose como componente essencial, é também constituída por várias substâncias não celulósicas. A parede primária é depositada durante o crescimento e a expansão da célula, enquanto que a parede secundária é depositada apenas após o término do crescimento da célula. Nestas paredes, a lamela de microfibrilas de celulose é arranjada umas sobre as outras, sendo o grau de revestimento dependente do tipo de célula (McCANN & ROBERTS, 1991).

A parede secundária é geralmente formada após a célula ter completado seu alongamento e não sofrer em nenhum grau considerável de extensão (CUTTER, 1986). Quando formada, é depositada do lado interno da parede existente (parede primária), junto ao lúmen celular. As microfibrilas são depositadas por aposição, ou seja, por arranjo ordenado (KRAUS, 2003).

A parede secundária consiste de três camadas: S1 (mais externa); S2 e S3 (mais interna). Cada uma dessas camadas possui uma diferente orientação das microfibrilas de celulose (ESAÚ, 1976; FENGEL & WEGENER, 1984). Na camada S1, as fibrilas de celulose se apresentam em orientação helicoidal suave. As lamelas desta camada são muito finas, sendo o arranjo helicoidal (espiral) das fibrilas visível como um arranjo cruzado. É mais lignificada, assemelhando-se neste sentido mais à parede primária, sendo também mais resistente ao ataque de fungos que a camada S2. Na parede celular, a camada S2 é a mais espessa, formando a porção principal da célula; nela, as fibrilas estão dispostas num ângulo praticamente reto em relação ao eixo da célula. Já na camada S3, as fibrilas de celulose estão arranjadas em uma inclinação suave, porém, não em uma forma estritamente paralela. Possui uma concentração maior de substâncias não estruturais, o que confere à superfície do lume uma aparência mais ou menos lisa (FENGEL & WEGENER, 1984).

Quando uma parede celular secundária se estabelece, reconhecem-se as seguintes camadas na parte externa da célula: lamela média ou substância intercelular e a parede primária. A lamela média é formada basicamente por compostos pécticos, sendo a princípio uma camada livre de celulose (HIGUCHI, 1997).

A parede primária, com a celulose como principal componente, é constituída também por outras substâncias não celulósicas, tais como, a hemicelulose (polioses), compostos pécticos e proteínas (HIGUCHI, 1997).

A composição e a quantidade de substâncias na matriz da parede celular variam em espécies diferentes de plantas. Por exemplo, a parede celular de fibras de algodão é composta somente de celulose. Em plantas inferiores, como as algas, algumas espécies como a valônia, têm parede celular com grande quantidade de celulose, enquanto que em outras espécies de algas, esta estrutura contém pouca ou nenhuma celulose (YE, 2002).

A parede celular de plantas superiores contém uma matriz hemicelulose-proteína, incrustada por lignina, na qual as microfibrilas de celulose estão embebidas. As substâncias da matriz das paredes celulares primárias consistem geralmente de proteína (10%), pectina (35%), e hemiceluloses.

Aproximadamente 90% da parede celular é composta por carboidratos e o restante por proteínas (BIDLACK et al., 1992). A celulose forma a estrutura da parede enquanto que as hemiceluloses realizam a ligação entre os componentes celulósicos e os não celulósicos. As pectinas também fazem ligações na parede e promovem um suporte estrutural à mesma. As proteínas podem funcionar como enzimas ou atuar estruturalmente, como as extensinas. Muitas outras substâncias, orgânicas e inorgânicas, ocorrem nas paredes celulares em quantidades variáveis, dependendo do tipo de célula (GARTNER, 1995).

A composição dessas paredes varia quanto à composição e à estrutura durante seu desenvolvimento e quando expostos a vários estresses bióticos e abióticos. Além disso, a dinâmica da espécie e as funções da parede celular nas plantas em termos de crescimento e desenvolvimento, percepção e sinalização ambiental, defesa vegetal, comunicação intercelular e troca seletiva interface são refletidas nestas variações (HIGUCHI, 1997).

Quando a célula cresce, as ligações existentes entre os polissacarídeos da parede são quebrados e rearranjados para permitir o alongamento e a expansão celular e, simultaneamente, novos polissacarídeos são sintetizados e inseridos nos locais de quebra (ALBERSHEIM et al., 1996).

A expansão da parede celular depende do afrouxamento, da síntese e da deposição de seus constituintes. Esse processo parece estar ligado à ação de hormônios vegetais, que ativam as enzimas endotransglicosilase e betaglucano sintetase, responsáveis pelo aumento da extensibilidade da parede celular. Dessa forma, a pressão de turgescência exercida nas paredes resulta no deslizamento das microfibrilas de celulose e na deposição de novos constituintes. Essas enzimas parecem atuar também no restabelecimento das ligações entre os componentes da parede celular (DARLEY et al., 2001).

Mudanças nas propriedades da parede celular podem ocorrer em resposta à variação do meio celular ou às interações entre células, por alterações hídricas ou gasosas no meio ou por aumento ou decréscimo de tensão da parede celular. Para manter integridade estrutural, as células desenvolvem pressão de turgescência, utilizando a resistência da parede para controlar o volume do meio celular. Normalmente a pressão de turgescência celular nunca alcança a pressão necessária para rompimento da célula. Durante a diferenciação da parede primária, as paredes tornam-se

extremamente flexíveis, possibilitando grande aumento do tamanho e modificações da forma das células (GARTNER, 1995).

O início da lignificação ocorre na lamela média, prosseguindo em direção à parede primária e atingindo, finalmente, a parede secundária. Dentre as substâncias que podem estar presentes na parede secundária, estão também a cutina, a suberina e o tanino. Atualmente, há muito conhecimento sobre a estrutura e a regulação metabólica dos vários componentes da parede celular, entretanto sobre suas funções e interações moleculares de forma precisa são relativamente poucas as informações disponíveis.

É importante salientar que as classes de proteínas estruturais da parede foram descritas e que são provavelmente de grande importância para as propriedades mecânico-químico da matriz extracelular. Esses grupos compreendem: as glicoproteínas ricas em hidroxiprolina - HRGPs, como as extensinas e as proteínas arabinogalactanas, as proteínas ricas em prolina - PRPs e as proteínas ricas em glicina - GRPs (KELLER, 1993; SHOWALTER, 1993; CASSAB, 1998; CASSAB & VARNER, 1988).

Outro aspecto que deve ser considerado são as “proteínas dirigentes” presentes na parede celular e que podem ter grande influência sobre o processo de polimerização das ligninas. O modelo proposto de lignificação com a participação de proteínas dirigentes é recente e, sugere que neste processo a formação de pontes individuais entre os radicais de monolignóis, produzindo dímeros, ocorra sob uma rígida regulação de proteínas específicas (HATFIELD & VERMERRIS, 2001).

2.1.1 Principais Constituintes da Parede Celular

2.1.1.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante da natureza, sendo considerada a molécula orgânica em maior concentração na face da Terra (ROWELL et al., 2005).

O principal composto da parede celular é a celulose, um polissacarídeo de fórmula empírica ($C_6H_{10}O_5$), cujas moléculas são cadeias lineares de glicose de alto peso molecular, constituído exclusivamente de β -D-glucose e que se ligam entre si através dos carbonos 1-4, possuindo uma estrutura organizada e parcialmente cristalina (FENGEL & WEGENER, 1984).

A celulose se apresenta em forma de estruturas filamentosas chamadas de microfibrilas (com 4 a 20 nm de diâmetro), que se reúnem em feixes maiores constituindo a armação fundamental da parede celular. As microfibrilas constroem fibrilas e estas, por sua vez, as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose apresenta alta resistência à tração e insolubilidade à maioria dos solventes (COSGROVE, 2005) (Figura 1), apresentando todos os grupos polares em posição equatorial, permitindo o estabelecimento de muitas pontes de hidrogênio entre duas moléculas paralelas de celulose, o que lhe confere bastante resistência mecânica.

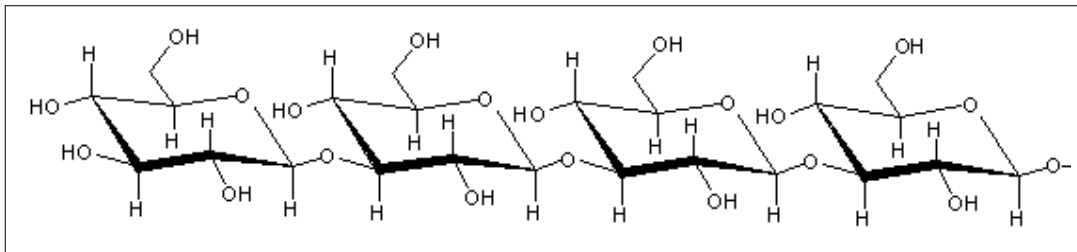


Figura 1. Conformação da celulose (SILVA, 2006).

A síntese da celulose é realizada por enzimas situadas na plasmalema, formando estruturas em forma de rosetas ou de rosetas e glóbulos (BROWN et al., 1996). Nas microfibrilas há partes em que as moléculas de celulose mostram um arranjo ordenado; conferindo à celulose a propriedade cristalina. Devido a suas propriedades químicas e físicas, bem como à sua estrutura supramolecular, a celulose constitui o principal componente da parede celular dos vegetais (SOMERVILLE, 2006).

2.1.1.2 Hemicelulose

Tendo em vista, a evolução das Gimnospermas e Angiospermas, a hemicelulose possui composição distinta. Além disso, os tecidos especializados desses dois grupos vegetais têm proporções variáveis de celulose, lignina, pectinas, proteínas e extrativos.

A hemicelulose é uma macromolécula complexa de estrutura bastante diversificada. Esse componente representa em torno de 25 a 30% da massa seca da madeira, sendo formado por ligações glicosídicas entre diferentes monossacarídeos tais como β -D-xilose, β -D-manose, β -D-galactose, β -D-glicose, α -L-arabinose e os ácidos 4-O-metil- α -D-glicurônico, β -D-galacturônico e α -D-glicurônico (PEREZ et al., 2002) (Figura 2).

O termo hemicelulose (polioses) se refere a um grupo de homo e heteropolímeros de baixo peso molecular. A hemicelulose é geralmente encontrada em associação com a celulose em paredes secundárias de plantas, mas também estão presentes nas paredes primárias (JEFFRIES, 1994).

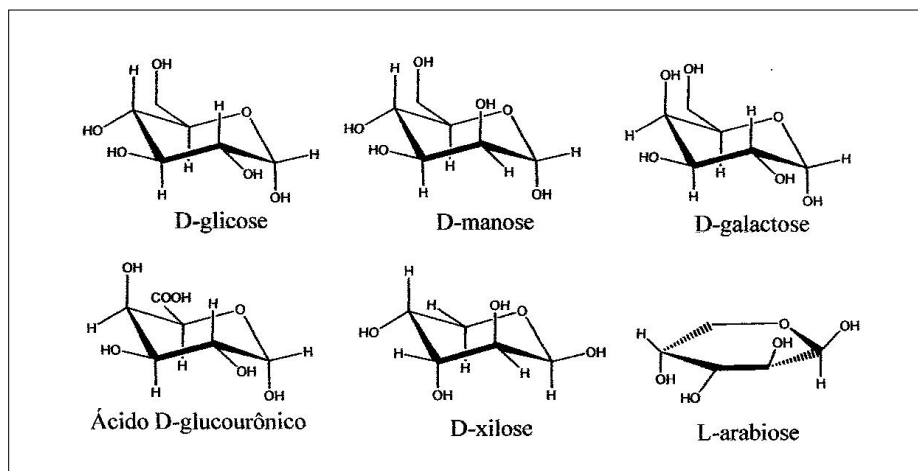


Figura 2. Principais açúcares que compõem as hemiceluloses (JÚNIOR, 2007).

2.1.1.3 Lignina

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo encadeado de reações, começando pelo gás carbônico (CO_2) e a água (H_2O), e, posteriormente, originando o ácido chiquímico, prosseguindo via aminoácido L-fenilalanina (SARKANEN & LUDWIG, 1971).

A lignina é depositada durante o processo de maturação das paredes celulares, quando alguns carboidratos se ligam a ela. Os constituintes da lignina e da hemicelulose podem diferir de uma planta para a outra e de um tecido para outro, sendo as ligações entre estes polímeros também diferentes (BOUDET, 2003).

A lignina é uma das substâncias que fornece rigidez à parede, dando maior suporte ao vegetal conferindo à célula maior resistência ao ataque de fungos e compõe toda a rede de vasos condutores do vegetal (MONTEIRO, 2002).

A lignina é uma macromolécula biorresistente, de baixa solubilidade, incapaz de difusão na parede celular, o que permitiu sua preservação ao longo de milhares de anos sob a face da Terra em condições rigorosas de alteração ambiental. Sob condições de anoxia, sua degradação torna-se extremamente difícil, tendo em vista a necessidade de um alto teor de oxigênio para que o processo de degradação ocorra (DAVIN & LEWIS, 2000).

Esta macromolécula possui várias ramificações que se entrecruzam umas com as outras, conferindo-lhe particular resistência a diversos agente químicos, físicos e biológicos.

A taxa extra de lignificação pode ser uma resposta ativa de plantas à invasão por patógenos, evidenciando um importante mecanismo de defesa (AGRIOS, 1997; BUSAM et al., 1997a, BUSAM et al., 1997b, HAMMERSCHMIDT & KUC, 1982, STICHER et al., 1997; VANCE et al., 1980).

A lignina, componente principal da parede celular das plantas, é um polímero complexo de natureza aromática com alto peso molecular, considerada o maior drenó de carbono da biosfera, respondendo por aproximadamente 30% do carbono orgânico da biomassa da planta, sendo o segundo polímero mais importante na Terra ultrapassado

apenas pela celulose. Intrinsecamente, a lignina apresenta diversas especificidades que a fazem única na natureza. A lignina tem como base estrutural unidades de fenilpropano, estando provavelmente ligada aos polissacarídeos da madeira. É encontrada em muitas plantas do reino vegetal, não devendo, portanto, ser considerada como uma substância química única (FENGEL & WEGENER, 1984).

A maioria do carbono absorvido na via fenilpropanóide é canalizada para a síntese da lignina, um polímero complexo, tridimensional que é o principal componente estrutural da parede celular das plantas. Como o maior polímero da parede celular, lignina também tem impacto direto nas características da madeira (ANTEROLA & LEWIS, 2002).

Além do suporte mecânico proporcionado pela lignina, impedindo o tombamento da planta, ela pode reduzir a qualidade e a digestibilidade de algumas culturas forrageiras, como por exemplo, a alfafa. As várias funções da lignina e dos produtos relacionados à resistência a estresses bióticos e abióticos fazem da via dos fenilpropanóides vital para a sobrevivência das plantas (HUMPHREY & CHAPPLE, 2002).

O processo de lignificação engloba a biossíntese de monolignóis, o seu transporte para a parede celular e a polimerização até a molécula final. A lignina é um polímero que ocorre na parede celular secundária das plantas vasculares. Ela é derivada de unidades fenilpropanóides denominadas C₆-C₃ ou simplesmente, unidades C₉, repetidas de forma irregular, originadas a partir da polimerização desidrogenativa do álcool cumarílico coniferílico e sinapílico (MONTEIRO, 2005). A complexidade estrutural das ligninas, relação siringila/guaiacila, depende das ligações formadas entre as unidades constitucionais, monolignóis, durante o processo de polimerização (MICIC et al., 2002).

A composição do polímero de lignina e a quantidade depositada na parede celular secundária são influenciadas pelo ambiente, pelo estágio de desenvolvimento da planta, pela espécie vegetal, bem como pelo tipo celular (PEREIRA, 2007; RODRIGUES et al., 1999; RODRIGUES et al., 2001).

Para compreender a formação dos monolignóis que irão dar origem às ligninas, é preciso entender o papel de certas enzimas. A fenilalanina amônialiase uma enzima que está presente no citoplasma direciona os carbonos dos aminoácidos aromáticos para a síntese de metabólitos do fenilpropanóide. Esta enzima converte fenilalanina (PAL) a ácido cinâmico, e tirosina (TAL) a ácido *p*-cumárico (BUCHANAN et al., 2000). Desta forma, as ligninas representam uma classe de produtos naturais poliméricos complexos presentes em grandes quantidades na parede celular das plantas terrestres. Porém, esta definição é simplista. Outros componentes fenólicos também podem estar intimamente incorporados às ligninas (RALPH et al., 2001).

Anatomicamente, o processo de lignificação é iniciado nas regiões mais externas da parede celular, indo em direção à membrana plasmática, e posteriormente a célula morre. A evolução deste notável sistema bioquímico não só assegura que a lignificação ocorra por toda planta, mas também que o citoplasma controle tanto a montagem das ligninas como a composição dos monômeros na parede (BURLAT et al., 2001).

Alguns fatores alteram a lignificação a nível citoplasmático, como, por exemplo, as respostas de defesa das células vegetais aos patógenos que incluem a ativação de genes relacionados a defesa, a acumulação de fitoalexinas, respostas de hipersensibilidade e a deposição de lignina e de outros compostos fenólicos na parede celular (YUAN et al., 2002).

Durante a síntese de lignina, muitos catalisadores inorgânicos, e até mesmo a luz, podem iniciar a polimerização de monolignóis, porém, em plantas, as enzimas

peroxidases e/ou suas isoformas atuam na parede celular para desencadear este processo (HIGUCHI, 1997).

Apesar de todos os estudos realizados até hoje sobre a lignina, muitos pontos relativos à sua estrutura, permanecem sem resposta, tais como o transporte dos monômeros para os locais de iniciação da deposição das ligninas e as interações entre a lignina em formação e as proteínas e as enzimas da parede.

2.1.1.4 Proteínas da parede celular

Vários experimentos levaram à estimativa de que existam centenas de proteínas na parede celular, as quais possuem um papel estrutural e também parecem atuar de outras formas (SHOWALTER, 2001; CASSAB & VARNER, 1988). E, apresentam-se em diferentes quantidades nas paredes celulares de distintos tipos celulares. Desta forma, cada uma dessas proteínas pode estar relacionada a funções específicas, ao tipo de célula em que está mais presente em maior concentração. Muitas das definições e analogias realizadas para entender a estrutura da parede celular não foram bem sucedidas, pois não consideravam seu aspecto dinâmico, as habilidades de alterar sua composição e as propriedades no crescimento celular.

A parede celular dos vegetais é composta por classes de proteínas: as extensinas, as proteínas ricas em glicina (GRPs), as proteínas ricas em prolina (PRPs), as lecitinas solanáceas e as proteínas arabinogalactanas (AGPs). Estas proteínas podem estar evolutivamente relacionadas entre si, devido cada uma delas, com a exceção das GRPs, conter hidroxiprolina, e ter seqüência de nucleotídeos semelhante às da extensinas (GOMIDE & COLODETE, 2007). Estas não são as únicas proteínas conhecidas da parede celular. Existem outras, tais como as tioninas ricas em cisteína, as proteínas reguladas por água de 28 e 70 KD, as proteínas ricas em histidina-triptofano e muitas enzimas, tais como peroxidases, fosfatases, invertases, α -aminosidases, β -1,4-glucanases, poligalacturonases, pectina metilesterases, malato desidrogenase, arabinosidases, α -galactosidases, β -galactosidases, β -glucuronosidases, β -xilosidases, proteases e ácido ascórbico oxidase (VARNER & LIN, 1989). Entretanto, as cinco classes mencionadas representam geralmente as mais abundantes, e até a atualidade, são as das proteínas da parede celular mais estudadas.

2.1.1.5 Proteínas dirigentes

A recente descoberta das proteínas dirigentes (DAVIN & LEWIS, 1995; DAVIN et al., 1997; GANG et al., 1999) forneceu uma nova perspectiva de como seria o controle do acoplamento dos radicais de monolignóis, nas plantas, para a geração das ligninas. Com o estabelecimento das vias bioquímicas para a formação dos precursores de monolignóis (LEWIS et al., 1998), esta nova proposição para a formação das ligninas explicaria muito dos últimos enigmas associados com a bioquímica de tais compostos. Os primeiros estudos na busca da proteína envolvida no controle acima descrito, tiveram como questão inicial a biossíntese dos produtos de acoplamento dos fenilpropanóides mais simples.

Um ponto importante que merece ser mencionado antes destes estudos iniciais é que na época, já se sabia da existência de pelo menos cinco distintas oxidases de plantas que possuíam alto potencial redox e uma alta especificidade quanto aos seus substratos (LEWIS et al., 1998; DAVIN & LEWIS, 2000), o que as torna capazes de oxidar os

monolignóis e transformá-los em sua respectiva forma de radical livre. Porém, *in vitro* e na presença de monolignóis, cada uma dessas enzimas oxidativas produziram produtos racêmicos. Mencionava-se, também, que as oxidases estivessem envolvidas em outros processos específicos de acoplamento, como os que ocorrem em tecidos suberizados. Neste caso, os blocos de construção aromáticos parecem ser principalmente derivados do *p*-cumaril/feroluil e/ou ésteres do hidroxicinamato (NEGREL et al., 1996; BERNARDS & LEWIS, 1998).

A hipótese da participação de proteínas na condução dos acoplamentos entre radicais fenólicos tem sido contestada por vários autores (HATFIELD & VERMERRIS, 2001). Os acoplamentos entre radicais fenólicos, superiores a dimerização com a participação de proteínas dirigentes não são aceitos, face às propriedades que sustentam a ausência de atividade ótica da lignina, o mecanismo de polimerização na formação do bloco polimérico, entre outros fatores. As proteínas dirigentes, auxiliando as enzimas, promovem o acoplamento estéreo específico em lignanas (LEWIS & SARKANEN, 1998). A presença de glicoproteínas (extensinas) na parede celular nas regiões de lignificação abre nova frente de discussão sobre o papel das proteínas e a lignificação. Uma possível participação destas proteínas tem sido influenciada pela existência de um centro de nucleação constituído por diisotirosina que se caracteriza por uma ponte intermolecular. Isto leva a crer que existe possivelmente um controle sobre os acoplamentos entre radicais fenólicos. Outras hipóteses versam sobre a participação da celulose ou até mesmo da própria lignina como colchão matriz, controlando por igual à própria deposição em camadas na parede celular (LEWIS & SARKANEN, 1998). O entendimento sobre a participação das proteínas dirigentes na formação da lignina necessita de mais base experimental.

Também, em tal período, ignorava-se que os monolignóis possuíam diferentes destinos metabólicos, e até mesmo que eles eram claramente designados para a produção de diversas classes de substâncias como as ligninas. Desta forma, os estudos iniciais estavam relacionados à biossíntese dos mais simples produtos de acoplamento dos fenilpropanóides.

A descoberta das proteínas dirigentes estabeleceu a existência de proteínas específicas para a ligação de monolignóis (radicais) (BURLAT et al., 2001). Tal descoberta foi um passo inicial para a compreensão de todo o processo da biossíntese da lignina na parede celular dos vegetais.

2.2 Lignificação

A lignina tem sofrido modificações estruturais ao longo de milhões de anos de evolução. A expressão de enzimas e proteínas pode possibilitar mecanismos capazes de interferir na sua estrutura molecular.

A lignificação é um processo bioquímico que em primeiro estágio é altamente mediado por enzimas intrínsecas à formação dos precursores no compartimento citoplasmático. O segundo estágio de formação da lignina ocorre na parede celular e caracteriza-se pela reação de oxidação desidrogenativa dos monolignóis disponíveis. Enzimas oxi-redutoras tais como peroxidases e isoenzimas correspondentes atuam na parede celular formando um complexo coordenado com peróxido de hidrogênio. Lacase entre outras oxidases também promove oxidação desidrogenativa dos lignóis na parede celular (LEWIS & SARKANEN, 1998; WHETTEN et al., 1998).

Lignina é um polímero de unidades fenilpropanóides com uma variedade de ligações e acoplamentos, resultando em uma estrutura complexa (SASAKI et al., 2008).

Sua estrutura fenólica tridimensional é resultado da polimerização de radicais livres dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico na parede celular. A lignina polimerizada forma ligações covalentes com carboidratos e proteínas (SARKANEN & LUDWIG, 1971; WHITMORE, 1978). Na parede celular vegetal, as ligninas são depositadas depois dos polissacarídeos (TERASHIMA et al., 1993).

Monômeros da lignina (álcool cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico) são sintetizados no citoplasma (no complexo golgiense ou retículo endoplasmático), sendo liberados na parede celular, na forma de monolignóis ou glucosídeos de monolignóis (DONALDSON, 2001).

A lignificação é um processo que sempre esteve intrinsecamente ligado à evolução dos tecidos vasculares, ocorrendo predominantemente em células de quase todos os órgãos das plantas, mais abundantemente em caules e raízes (RAES et al., 2003). É um dos processos que caracteriza a diferenciação vascular nas plantas (YE, 2002; DONALDSON, 2001). Na maturidade, os elementos traqueais perdem seus núcleos, e o conteúdo citoplasmático desaparece, deixando no interior da célula uma espécie de tubo oco (lume). As enzimas proteolíticas atuam nas organelas, sendo que parte delas fica aderida à parede interna, formando a camada verrugosa (BUCHANAN et al., 2000).

A síntese da lignina é um dos processos que mais demanda energia em plantas, requerendo grande quantidade de esqueletos de carbono. A avaliação dos precursores da lignina depende da presença e da atividade das enzimas do metabolismo que é a via do fenilpropanóide e o caminho específico dos monolignóis da biossíntese da lignificação celular (WADENBACK et al., 2008). A via do ácido chiquímico é responsável pela formação de várias substâncias aromáticas, principalmente, a lignina e para tal consome em média entre 30-40% da energia utilizada pelos vegetais (GOTTLIEB, 1989; GOTTLIEB et al., 1995).

Durante a lignificação, várias enzimas estão localizadas na parede celular, no estágio livre ou ligadas, incluindo vários tipos de peroxidases e oxidases (inclusive a lacase), apresentando papel na polimerização dos monolignóis, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (RANOCHA et al., 2002). A atividade das oxidases pode estar associada com as fases iniciais da lignificação e as peroxidases com as fases posteriores, de forma que os efeitos fitotóxicos do peróxido de hidrogênio são evitados até a apoptose comece (HIGUCHI, 1997).

De um modo geral, a complexidade estrutural das ligninas depende das ligações formadas entre as suas unidades constitucionais (C_6C_3) durante o processo de polimerização (MICIC et al., 2002). Quando incorporados ao polímero da lignina os álcoois: cumarílico, coniferílico e sinapílico são denominados unidades cumarila (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente.

SARKANEM & LUDWIG (1971) enfatizam que a lignina além de ter contribuído para adaptação das plantas à vida terrestre durante o processo evolutivo, tornou a parede celular impermeável, e possibilitou o transporte de água e de soluções pelo sistema vascular. Segundo BOERJAN et al. (2003) a capacidade de sintetizar a lignina foi uma grande adaptação evolutiva para as plantas, possibilitando a conquista do ambiente terrestre.

O estudo da evolução molecular da lignina parte da premissa que esta substância apresenta características peculiares, como composição enzimaticamente dependente e por ser um biopolímero oxi-dependente e estável.

Durante a década passada, houve um extraordinário esforço na clonagem dos genes envolvidos na rota biossintética dos monolignóis, procurando assim compreender a cinética enzimática das proteínas correspondentes, bem como de seus papéis no

controle da quantidade e da composição de lignina depositada na parede celular (ANTEROLA et al., 2002; HUMPHREYS & CHAPPLE, 2002; BOERJAN et al., 2003). Como consequência, o caminho biossintético dos monolignóis tem sido muito estudado, embora a rota exata desses precursores seja ainda matéria de controvérsia (RAES et al., 2003; WHETTEN et al., 1998).

A síntese da lignina resulta de uma série parcialmente longa de reações conhecidas que representam um dos caminhos biossintéticos mais caro em plantas em termos de demanda de energia. O produto final deste caminho é altamente heterogêneo na natureza, dependendo da localização interna e de parâmetros externos, mas sempre exibindo alta proporção C/H e C/O em relação aos outros polímeros presentes na parede celular, resultando em alto valor calorífico (BOERJAN et al., 2003).

DAVIN & LEWIS (1992) mencionam que durante o crescimento e desenvolvimento de plantas vasculares, metabólitos específicos, com os fenilpropanoídicos, são acumulados nos tecidos e que muitos deles estariam envolvidos com a estrutura da parede celular, conferindo às plantas resistência à compressão e impermeabilidade, e exercendo papel relevante no transporte de nutrientes e na retenção de fluidos.

As variações quantitativas e qualitativas da lignina nas plantas podem ter sido, influenciadas por uma série de fatores. De uma forma geral, as plantas lenhosas possuem alto teor de lignina, podendo alcançar valores superiores a 35% em relação a sua massa seca (FENGEL & WEGENER, 1984). Os fatores edáficos e atmosféricos, acompanhados de uma situação extrema de estresse ambiental, podem ter sido responsáveis pelas marcantes modificações fenotípicas e genotípicas das plantas superiores (GOTTLIEB, 1989; GOTTLIEB et al., 1995). A ação do oxigênio em níveis elevados há milhões de anos, porém em concentrações toleráveis, conduziu à modificação química e morfológica da lignina nas plantas superiores conforme afirmam BOSÍSIO (1996) e MARIA et al. (2001).

A biossíntese dos precursores nas plantas deve-se às etapas de oxidação horizontal (mediadas totalmente por enzimas) que ocorrem dentro do compartimento citoplasmático e de oxidação vertical (parcialmente mediada por enzimas) que ocorrem na parede celular. As peroxidases e/ou isoenzimas correspondentes são as responsáveis pela fase determinante da polimerização da lignina na parede celular (oxidação vertical). Através de um processo oxidativo formam-se radicais fenólicos, que em seguida, sofrem reações de acoplamentos oxidativos, cujo processo dirigente ainda não está claramente definido (SARKANEN & LUDWIG, 1971; LEWIS & SARKANEN, 1998, ABREU et al., 1999).

A lignina é biossintetizada por reações de acoplamentos de radicais livres das moléculas precursoras. As enzimas chamadas peroxidases iniciam o processo, quebrando uma ligação covalente entre o oxigênio da unidade fenólica e o seu hidrogênio. A ligação é rompida homoliticamente de tal modo que um elétron fica com o oxigênio e o outro vai com o hidrogênio (SJOSTRON, 1992), gerando radicais livres. O radical livre inicial é estabilizado pelo deslocamento do elétron ao longo da molécula, em um processo conhecido como estabilização por ressonância (ARGYROPOUPOS & MENACHEM, 1997). Deste modo, é formada uma série de radicais livres estabilizado por ressonância, em equilíbrio constante um com o outro.

Os precursores radicais dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico apresentam sítios reativos que podem constituir em ligações, preferenciais, envolvendo os átomos de carbono da cadeia lateral (C-7, C-8 e C-9), os átomos (C-1, C-3 e C-5) e oxigênio do anel aromático (Figura 3). A formação molecular das ligninas primitivas, por exemplo, baseia-se no mais alto valor de NTLI (Número Teórico de Ligações

Intermonoméricas). Neste contexto as ligninas cumarílicas são formadas segundo cinco centros reativos, apresentando-se com estruturas moleculares extremamente complexas, formando extensa rede de ligações cruzadas na parede celular. Enquanto os demais álcoois dão origem às moléculas de lignina mais simples em termos de rede de ligações inter e intramoleculares. Assim o número máximo de combinações ou ligações intermonoméricas sob base teórica na proporção (1:1) entre os radicais precursores, diminui a partir dos precursores álcool cumarílico para o álcool sinapílico. Isto revela que a variação composicional tem papel importante na estrutura molecular da lignina (ABREU et al., 1999).

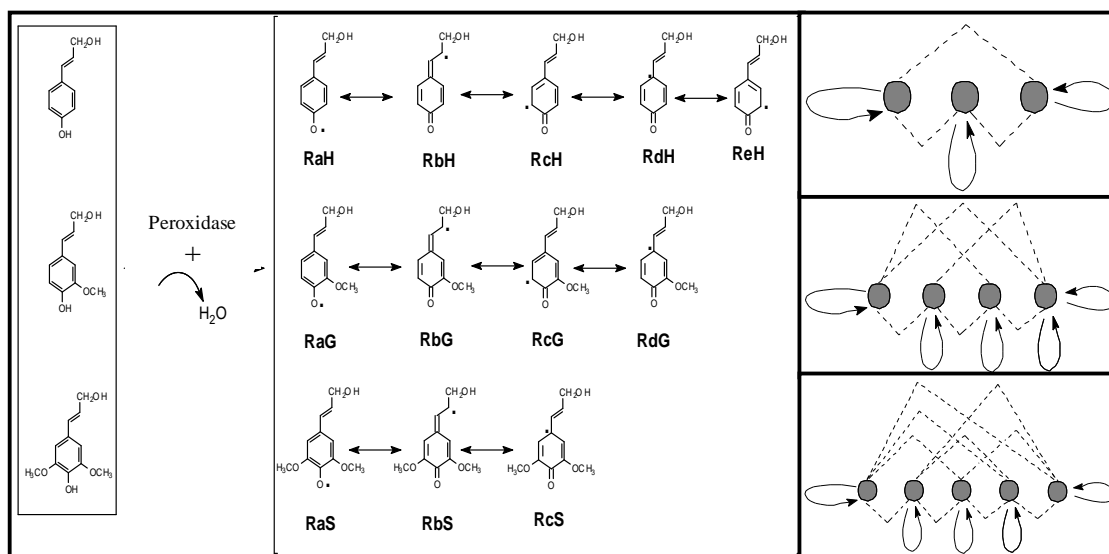


Figura 3. Inicialização da polimerização da lignina na parede celular envolvendo os precursores: álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente (MONTEIRO, 2005).

A organização estrutural da lignina contribui extensivamente para as propriedades físicas e mecânicas da madeira, entre outras características já mencionadas anteriormente. A rede de ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio conferem possivelmente maior ou menor flexibilidade estrutural aos vegetais (ABREU et al., 2003; ABREU et al., 2009) (Figura 4). Isso pode estar relacionado aos grupos botânicos cuja complexidade molecular diminui segundo a escala evolutiva de pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. Em angiospermas a lignina é formada principalmente por unidades guaiacila e siringila, com traços de unidades cumarila (BOERJAN et al., 2003).

ABREU et al. (1999) e (2009) destacam que a presença de ligações β -O-4 possibilita maior flexibilidade do polímero, conferindo a diferentes estruturas supramoleculares da lignina na parede celular, além de relacionar a estrutura molecular da lignina com as propriedades da madeira. Este tipo de ligação predomina nas ligninas de angiospermas, chegando a alcançar até 75 % das ligações existentes.

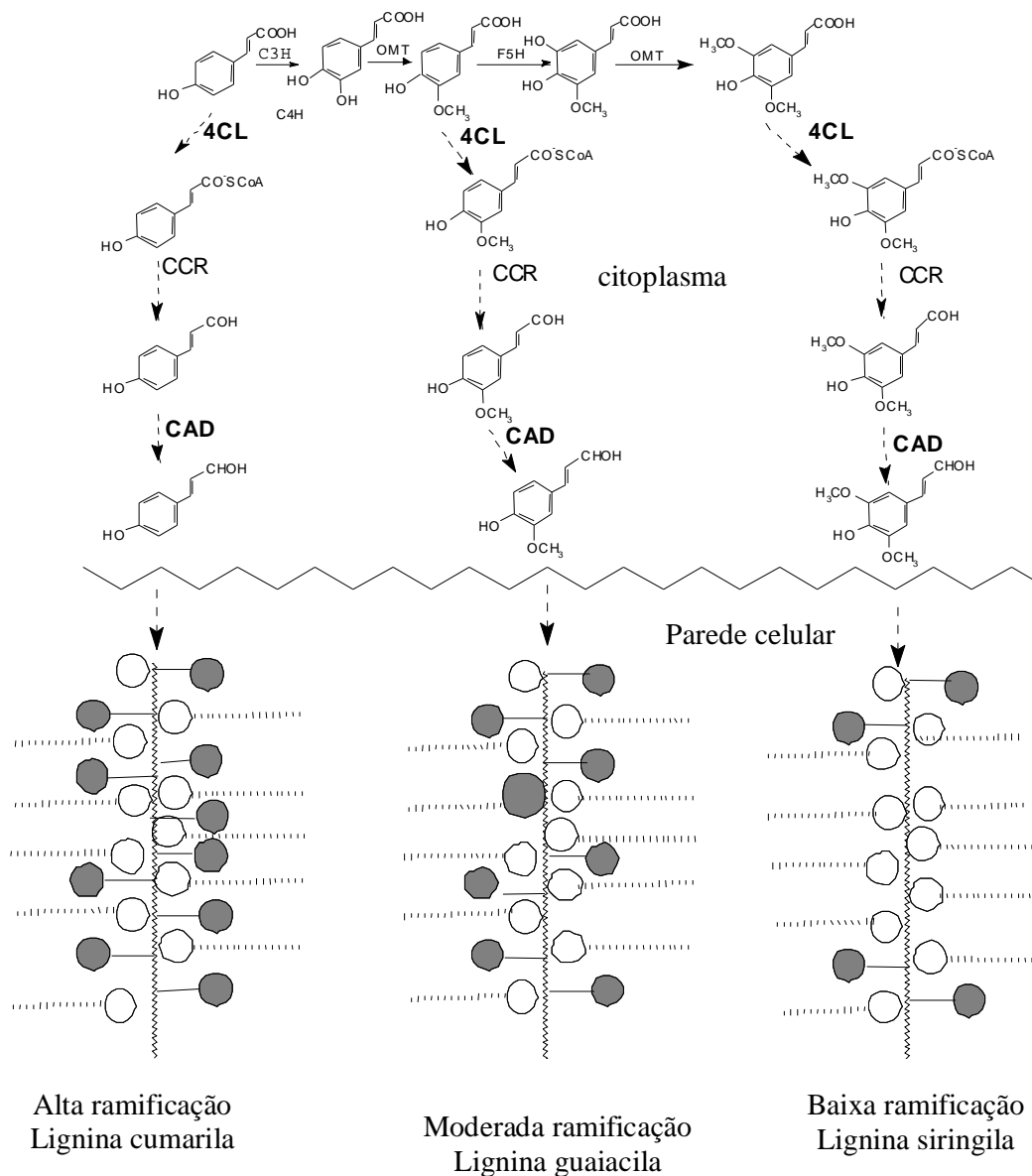


Figura 4. Formação das ligninas cumarila, guaiacila e siringila (ABREU et al., 2009).

Segundo LEWIS & SARKANEN (1998) o controle biológico da arquitetura molecular da lignina tem sido embasado na existência de proteínas dirigentes. A presença de monolignóis e enzimas oxidativas, em experimentos de síntese fornecem substâncias racêmicas, tendo como produto final à formação de substâncias ou fragmentos moleculares com ligações β -O-4 em concentrações inferiores às ligninas produzidas na parede celular. As proteínas dirigentes comandam a estereoespecificidade em lignanas formando as substâncias (+)-pinoreasinol e (-)-secoisolariciresinol. Essas proteínas estariam presentes na inicialização da polimerização, cujo processo começa na região da parede celular (DAVIN & LEWIS, 2000). Mais recentemente, as proteínas estruturais como as extensinas (HRGPs)

caracterizadas pela repedida seqüência de pentapeptídeo Ser-(Hip)₄, cuja estrutura consiste de uma cadeia em hélice de poliprolina II (KELLER, 1993; CASSAB, 1998) estão localizadas nos feixes vasculares das células a serem lignificadas, sendo descritas como possíveis sítios de nucleação para a formação da lignina, possivelmente por ação catalítica da ligação cruzada de isoditrosina e portanto, poderia afetar a polimerização da lignina (SHOWALTER, 1993). Pesquisas mostram que a lignina isolada muitas vezes está associada a resíduo de glicoproteínas da parede celular por ligação covalentemente à hidroxiprolina (WHITMORE, 1982).

Um sistema enzimático complexo é responsável pela formação dos precursores intermediários e majoritários finais da lignina (Figura 5). O metabolismo dos fenilpropanóides inclui uma série complexa de caminhos bioquímicos que proporcionam às plantas milhares de combinações. Muitas destas vias são intermediárias na síntese de substâncias estruturais das células, como a lignina (BOATRIGHT et al., 2004). Estes caminhos se ramificam gerando várias substâncias com funções essenciais para o desenvolvimento da planta e para suas interações ambientais (ALLINA et al., 1998).

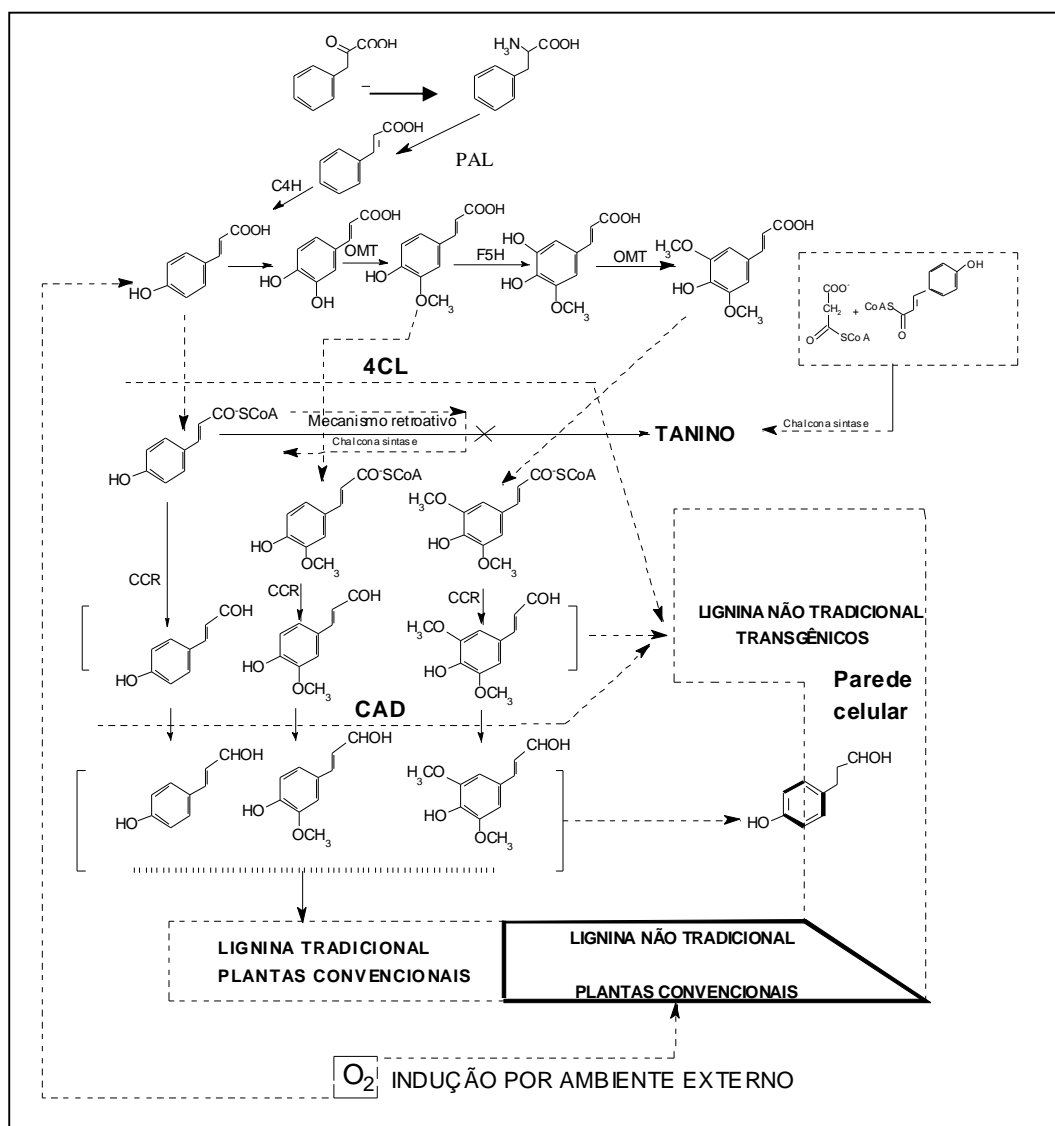


Figura 5. Rota biossintética da lignina tradicional e não tradicional, na parede celular de plantas superiores (PEREIRA et al., 2000).

Várias décadas de pesquisas têm elucidado a principal rota biossintética em relação aos monolignóis e demonstrado que a quantidade de lignina pode ser modificada e que as plantas podem tolerar mudanças na proporção composicional da lignina (cumarila/guaiacila/siringila) (VANHOLME et al., 2008).

Nestas rotas há atuação de enzimas fundamentais para a biossíntese da lignina. Durante a formação dos precursores da lignina algumas dessas enzimas atuam sobre o núcleo aromático dos fenilpropanóides, introduzindo hidroxilas em C-3 e C-5 e, metilando-as em seguida, enquanto outras desempenham importante papel na redução da cadeia lateral. A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas desde a fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato-4hidroxilase (C4H), hidroxicinamatoil COA ligase (4CL), 4-hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3H), 5-adenosil-metionina:cafeato/5-

hidroxi (**OMT**), ferulato-5-hidroxilase (**F5H**), hidroxicinamoil COA redutase (**CCR**) até a cinamil álcool desidrogenase (**CAD**). Estas enzimas do complexo citoplasmático que estão associadas à formação dos precursores da lignina apresentam funções específicas, desde a formação da fenilalanina até a dos monolignóis.

Fenilalanina amônia-liase (PAL) é uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina, catalisando a desaminação da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (RAES et al., 2003). De acordo com BATE et al. (1994) e SEWALT et al. (1997) a PAL se torna limitante quando sua atividade é reduzida de 25%, para 20%, tendo tal redução sido comprovada em células de fumo transgênico (*Nicotiana tabacum*).

Cinamato-4hidroxilase (C4H) controla a conversão do cinamato em *p*-cumarato. É o primeiro citocromo monooxigenase P450-dependente da via fenilpropanóide. São catalisadas três reações de hidroxilação sucessivas no anel na formação do monolignol, começando pela enzima C4H, seguido da C3H e da F5H (DIXON et al., 2001).

Hidroxicinamoil COA ligase (4CL) catalisa a formação de tio ésteres de CoA de ácido *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico, e ácido sinápico (LEE et al., 1997; HU et al., 1998). A abundância potencial de substratos pode explicar a existência de isoenzimas (4CL) na maioria das plantas superiores. Além das diferentes especificidades dos substratos, seus genes aparentam um padrão de expressão (espaço-temporal) tipicamente distinto (LEWIS E YAMAMOTO, 1998; HU et al., 1998; HARDING et al., 2002). Experimentos recentes com células transgênicas demonstraram que o papel do 4CL é contraditório em diferentes espécies, sugerindo variação nas plantas. *Arabidopsis* transgênicas com atividade reduzida de 4CL apresentaram redução da lignina guaiacila, mas com pouca alteração da lignina siringila (LEE et al., 1997). Tabaco transgênico de com atividade reduzida de 4CL, apresentaram uma maior redução do conteúdo da lignina siringila do que da guaiacila, embora ambos os tipos de lignina tenham sido alterados (KAJITA et al., 1997; KAJITA et al., 1996).

4-Hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3H) foi nomeada originalmente depois que sua função na hidroxilação do ácido *p*-cumárico foi determinada. Pesquisas recentes têm demonstrado que C3H₁ converte éster chiquimato e quinato de ácido *p*-cumárico preferencialmente no ácido cafeico correspondente, considerando que ácido *p*-cumárico e *p*-cumaroil - CoA não sejam substratos desta enzima (SCHOCH et al., 2001; FRANKE et al., 2002; NAIR et al., 2002). Estudos conduzidos por FRANKE et al. (2002) demonstraram que o ref8 (mutante de *Arabidopsis*) possui o gene defeituoso codificando a enzima C3H e a caracterização fenotípica deste, revelou a falta da atividade desta enzima conduzindo a diversas mudanças no metabolismo do fenilpropanóide. Estas alterações causaram mudanças na resistência da parede celular do ref8 à ação de hidrolases de polissacarídeos, aumentando a suscetibilidade ao ataque de fungos.

5-Adenosil-metionina:cafeato/5-hidroxi (COMT) foi postulado por ser uma enzima bifuncional metilando tanto o ácido cafeico quanto o ácido 5-hidroxiferúlico nas plantas superiores. Porém, resultados obtidos *in vitro* usando transgênicos de álamo (*Populus tremuloides*), liquidambar (*Liquidambar styraciflua*), alfafa (*Medicago sativa*), revelaram que o papel predominante da COMT é a metilação do 5-hidroxiconiferaldeído e/ou do álcool 5-hidroxiconiferílico para sinapaldeído e/ou para álcool sinápico, respectivamente (OSAKABE et al., 1999; LI et al., 2000; CHEN et al., 2001; GUO et al., 2001; PARVATHI et al., 2001; GOUJON et al., 2003). A enzima **CCoAOMT** (Cafeoil coenzima A o-metiltransferase) catalisa a metilação de cafeoil-CoA a feruloil-CoA (*in vitro* e *in vivo*) e 5-hidroxiferuloil-CoA para sinapoil-CoA (pelo

menos *in vitro*). Esta enzima juntamente com a COMT, é responsável pela metilação dos precursores dos monolignóis (YE et al., 1994; ZHONG et al., 1998; PINCON et al., 2001). De acordo com ZHONG et al. (1998) o emprego da técnica antisense mostrou que a redução da CCoAOMT resultou em uma diminuição no teor e na composição da lignina. A lignina guaiacila teve uma maior taxa de redução, resultando no aumento da relação S/G (siringila/guaiacila). Os mesmos autores também constataram que a redução simultânea de CCoAOMT e CAOMT resultou na diminuição do teor de lignina total. A redução da CAOMT resultou apenas na diminuição em unidades de lignina siringila. Estes resultados comprovaram que as reações de metilação são catalisadas pelas enzimas CCoAOMT e CAOMT.

Hidroxicinamoil COA redutase (CCR) que catalisa a conversão de ésteres cinamoil-CoA à cinamaldeídos, é uma das enzimas da parte específica do caminho do monolignol na biossíntese da lignina. Segundo PIQUEMAL et al. (1998) em tabaco, a baixa regulação de CCR afeta o teor e a composição da lignina, onde a relação S/G é maior, principalmente por causa de uma redução em unidades de G, porém a lignina se torna mais condensada. Segundo JONES et al. (2001) o aumento da celulose está relacionada a uma diminuição da lignina, observado com a baixa regulação da 4CL em álamos, não parece ser um fenômeno comum; mutantes *irx4* deficientes em CCR apresentam menor teor de lignina, mas nenhum aumento no teor de celulose foi constatado.

Ferulato-5-hidroxilase (F5H) é uma monooxigenase citocromo-P450-dependente (P450) participa da biossíntese de monômeros da lignina siringila, através da 5-hidroxilação do coniferaldeído e/ou do álcool coniferílico (HUMPHREYS et al., 1999; LI et al., 2000; HUMPHREYS & CHAPPLE, 2002).

Cinamil álcool desidrogenase (CAD) catalisa o último passo na biossíntese do monolignol, reduzindo-o a aldeídos e nos álcoois correspondentes. A enzima CAD reduz vários aldeídos, durante diferentes fases do desenvolvimento das plantas. Além da função de regulação da lignificação, vários genes da CAD foram caracterizados em resposta a patógenos em plantas (KIEDROWSKI et al., 1992). A enzima CAD regula a composição da lignina G:S detectada em uma ampla variedade de plantas, cujo polimorfismo sugere que esta enzima apresenta especificidade diferenciada na composição da lignina de Gimnospermas e Angiospermas. Em *Eucalyptus* a CAD₂ mRNA foi detectada em tecidos do xilema e de folhas (ABREU et al., 2003). A Tabela 1 resume as funções de cada enzima desta seqüência metabólica.

Tabela 1. Enzimas que atuam sobre a formação dos precursores da lignina no citoplasma das células vegetais.

SIGLA	ENZIMA	COMPARTIMENTO CELULAR	FUNÇÃO
PAL	Fenilalanina amônialiase	Citoplasma	Desaminação mediando a formação do ácido cinâmico
C3H	4-Hidroxicinamato-3-hidroxilase	Citoplasma	Hidroxilação do ácido <i>p</i> -cumárico
F5H	Ferulato-5-hidroxilase	Citoplasma	Produção da lignina siringila, porque é responsável pela 5-hidroxilação
OMT	5-Adenosil-metionina: cafeato/5-Hidroxiferulato-O-metiltransferase	Citoplasma	Enzima bifuncional metilando o ácido cafeico e o ácido 5-hidroxiferúlico, ou os tios ésteres correspondentes.
4CL	Hidroxicinamoil: CoA ligase	Citoplasma	Catalisa a formação de ésteres de CoA dos ácidos: <i>p</i> -cúmarico, cafeico, ferúlico, 5-hidroxiferúlico e sinápico
CCR	Hidroxicinamoil: CoA redutase	Citoplasma	Catalisa a conversão de ésteres de cinnamoil-CoA para cinamaldeído sendo a primeira da parte específica da biossíntese da lignina.
CAD	Cinamil álcool desidrogenase	Citoplasma	Catalisa o último passo da biossíntese do monolignol, isto é, a redução de aldeído ao álcool correspondente.
C4H	Cinamato-4-Hidroxilase	Citoplasma	Conversão do ácido cinâmico a ácido <i>p</i> -cumárico.

Fonte: MONTEIRO et al., 2004

Estas enzimas do complexo citoplasmático que estão associadas à formação dos precursores da lignina e apresentam funções específicas desde a formação da fenilalanina até a formação dos monolignóis. A polimerização enzimática destas unidades fenilpropanóides é o passo final da biossíntese das ligninas pelas plantas,

sendo que a porcentagem relativa de cada monômero fenólico dentro da molécula é dependente da origem filogenética vegetal (SARKANEN & LUDWIG, 1971).

Numerosas enzimas têm sido associadas à parede celular (CASSAB & VARNER, 1988; FRY, 1995), sendo algumas responsáveis pela modificação da maioria dos polissacarídeos da parede celular da planta, como: endoglucanases, xilosidases, pectinases, pectina metil esterases e xiloglucan endotransglicolases. Outras podem atuar na parede com potencial bactericida e fungicida, como: 1-3 β glucanase ou modificando outros substratos na parede, como: peroxidases, fosfatases e varias dehidrogenases. A função precisa de muitas dessas enzimas da parede celular já foram determinadas, mas elas estão duplamente envolvidas em numerosos processos, na modificação da parede, no transporte de metabólitos e na sinalização celular.

Um passo preliminar no uso de métodos moleculares, visando o melhor entendimento do processo de lignificação, tem sido a caracterização de genes que codificam diferentes passos enzimáticos ao longo do caminho biossintético da lignina. Atualmente, todos os genes que codificam as enzimas deste caminho têm sido clonados e seqüenciados. Isto é um resultado notável, quando comparado com a de outros biopolímeros importantes da parede celular, como a celulose e a hemicelulose, para as quais poucos genes associados aos seus caminhos biossintéticos têm sido caracterizados (BOUDET & CHABANNES, 2001).

A classificação atual divide as ligninas em duas classes principais: lignina guaiacila (tipo G) e lignina guaiacila-siringila (tipo G-S), com as ligninas cumarila-guaiacila (tipo H-G) e cumarila-guaiacila-siringila (tipo H-G-S) sendo subclasses das ligninas tipo G e G-S, respectivamente.

2.3 Peroxidase

São enzimas glicosiladas distribuídas em plantas, microrganismos e animais, existentes nos tecidos com diferentes formas moleculares, reagem a eventos externos como mudança no fotoperíodo, ataque de patógenos, etc. As peroxidases são enzimas glicoprotéicas globulares com massa de aproximadamente 42Kda, sendo responsáveis pela produção de radicais fenóxidos em diversas situações. Vários estudos sobre a ação da peroxidase- H_2O_2 na formação de polifenóis tem sido descritos na literatura (ROS-BARCELÓ, 2002a; 2002b). No caso das ligninas, a peroxidase catalisa reações oxidativas causando redução do peróxido de hidrogênio (Figura 6).

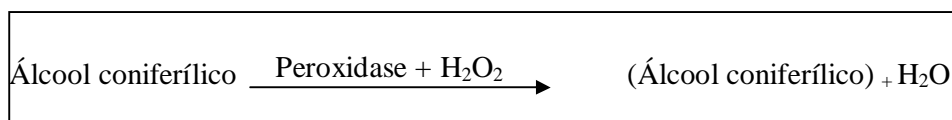


Figura 6. Esquema de redução do peróxido de hidrogênio.

2.4 DHP

A síntese de DHPs (polímero por oxidação desidrogenativa) que é um polímero similar à lignina, pelos métodos tradicionais descritos na literatura (métodos contínuo e descontínuo) julgados até a década de 80 como modelos nos estudos comparativos de formação da lignina, sugerem que o mecanismo de acoplamento oxidativo deve ocorrer inteiramente ao acaso (sem controle biológico), porém este mecanismo tem sido questionado (LEWIS & SARKANEN, 1998).

O modelo de formação da lignina na parede celular (polimerização) idealizado por FREUDENBERG & NEISH (1968) preconizava como sendo um produto do acoplamento ao acaso entre radicais fenólicos a semelhança dos DHPs (polímero por oxidação desidrogenativa) sintetizados *in vitro* (métodos contínuo ou descontínuo). Alguns questionamentos levantados sobre a existência de uma possível contribuição protéica na polimerização da lignina, partem da premissa da existência de um possível controle protéico (proteínas dirigentes), sobre os acoplamentos entre radicais de acordo com DAVIN & LEWIS, 2005).

2.5 Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos de plantas é um método no qual pequenos fragmentos, denominados de explantes, são isolados de uma determinada espécie vegetal, desinfestados e cultivados, sob condições assépticas, em meio de cultura contendo sais minerais (macro e micronutrientes), vitaminas e fonte de carbono em quantidades necessárias ao desenvolvimento vegetal. A concentração e o tipo de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura variam, conforme o objetivo e a fase do cultivo e também de acordo com a espécie cultivada (MCCOWN & SELLMER, 1987). A cultura de tecidos baseia-se na totipotência ou competência celular, que é a capacidade que as células possuem de regenerar uma planta inteira. Segundo KERBAUY (1999) a capacidade dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* para formar gemas, raízes ou embriões somáticos tem despertado a atenção de pesquisadores, devido à sua grande implicação prática e importância para o avanço dos conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e genética vegetal.

A planta é um organismo autotrófico que, para seu crescimento e desenvolvimento, necessita da energia da luz solar para sintetizar todos os seus componentes orgânicos a partir de dióxido de carbono, água e elementos minerais dissolvidos na solução do solo (TAIZ & ZEIGER, 2004). Essa exigência também é aplicável para a cultura *in vitro*. Segundo TORRES (2001) ao excisar parte da planta, órgão ou tecido para cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos, e requerem, para o crescimento e padrão de desenvolvimento, que o meio nutritivo onde foram inoculados, seja suplementado com as necessidades exógenas da célula, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia.

As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativados (CALDAS et al., 1998).

Segundo PASQUAL (2001a) uma das peculiaridades da cultura de tecidos vegetais é a possibilidade quase absoluta do controle de crescimento e desenvolvimento das plantas. Isso não seria possível sem a adição dos reguladores de crescimento ao meio de cultura, pois são estes componentes que direcionam o metabolismo do explante *in vitro* para o processo desejado.

O sucesso do processo de regeneração vegetal através da cultura de tecidos é bastante influenciado pelo protocolo utilizado na formulação do meio de cultura. Este meio tem que conter todas as substâncias que os tecidos normalmente obtêm do floema e do xilema. Os nutrientes essenciais incluem sais inorgânicos (macro e micronutrientes), fonte de carbono e de energia, vitaminas e reguladores de crescimento. Outros componentes tais como, substâncias nitrogenadas orgânicas, ácidos orgânicos e

substâncias complexas, podem ser importantes, mas são opcionais (GAMBORG & SHYLUK, 1981).

De acordo com McCOWN & SELLMER (1987) na cultura de tecidos, os fatores a serem considerados podem ser divididos em cinco categorias:

- 1) Genótipo, tipo de explante e estado fisiológico e de desenvolvimento da planta matriz doadora do explante;
- 2) Composição do meio de cultura;
- 3) Ambiente (condições de luminosidade, temperatura, umidade e pressão, frasco de cultura, etc.);
- 4) Tempo (do cultivo e do intervalo entre subcultivos sucessivos); e
- 5) Interações entre e dentro dos fatores mencionados acima.

O controle quase absoluto do crescimento e da morfogênese a partir de explantes *in vitro* é uma das principais características da cultura de tecidos (PASQUAL et al., 1998; PASQUAL, 2001b).

Os diversos processos de propagação de plantas apresentam algo em comum que é o processo morfo genético. Este processo é consequência integrada dos processos de divisão e diferenciação celular, resultando na formação de novos tecidos e órgãos (HANDRO & FLOH, 1990).

O processo de organogênese *in vitro* é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre o explante, meio de cultura e os fatores do ambiente (GEORGE, 1993; PIERIK, 1997; JOY & THORPE, 1999; PIQUERAS & DEBERGH, 1999). A resposta a este processo depende também da ação de reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (SUGIYAMA & MINOCHA, 1999).

As principais etapas envolvidas na rota morfogênica *in vitro* referem-se às fases de indução e de expressão, ou seja, indução das células a adquirir competência organogênica e a expressar esse potencial no desenvolvimento de órgãos (ZIV, 1999).

De forma geral, três fases fisiológicas estão envolvidas na organogênese:

- 1) aquisição da competência por meio da qual a célula se torna capaz de responder à presença de um indutor;
- 2) diferenciação e formação de determinado órgão escolhido, após a indução ou determinação de uma célula ou de várias células; e
- 3) crescimento e expressão da diferenciação (CHRISTIANSON & WARNICH, 1988).

A técnica de cultura de tecidos de plantas *in vitro* vem sendo rotineiramente aplicada a inúmeras espécies vegetais, pela possibilidade de manutenção da identidade genética dos indivíduos e obtenção de grande número de plantas sadias e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto tempo, independente da época do ano (PEREIRA & FORTES, 2003).

Através de cultura de tecidos vegetais pode-se acompanhar, observar processos que vão desde a bioquímica e morfologia da diferenciação celular até o desenvolvimento de tecnologias e métodos para a produção clonal e o melhoramento genético (VILLALOBOS & THORDE, 1991; ROCHA & QUOIRIN, 2004).

Segundo VALLE (2003) para cultivar plantas *in vitro*, quer sejam a partir de células isoladas, órgãos ou calos, deve-se, primeiramente, estabelecer as melhores condições de cultivo, sendo considerados como fatores relevantes: o meio de cultura, a temperatura, a agitação, a aeração, o projeto do reator, os fatores que podem causar contaminação, a incidência de luz e o fotoperíodo, a densidade celular, o uso de meio condicionado, o potencial osmótico e o pH.

A cultura de tecidos é considerada uma técnica importante para a propagação de várias espécies lenhosas e vem sendo utilizada com sucesso (LANDA et al., 2000). A propagação por meio de cultura de tecidos pode ser feita por via direta ou indireta, esta última, via formação de calos, é considerada uma forma potencial de propagação em massa (PIERIK, 1987; LANDA et al., 2000).

2.5.1 Calogênese

A formação de calos em um explante denomina-se calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática indireta (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004).

Uma das respostas mais comuns de um tecido cultivado *in vitro* é a formação de calos, que depende dos seguintes estágios: desdiferenciação, competência, indução, determinação e diferenciação em um órgão (KERBAUY, 1999). Entretanto, em certos casos, a cultura *in vitro* não promove a formação de calos, mas apenas uma proliferação celular restrita às regiões seccionadas, epidérmicas e subepidérmicas dos explantes, como formação de tecido de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemáticas (FLOH & HANDRO, 1985). A cultura de calos é útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (VENTURIERI & VENTURIERI, 2004).

Trabalhos de pesquisas com calos formados a partir de fragmentos de caules, folhas e raízes são realizados principalmente visando a determinação das condições ideais de cultura que os explantes requerem para sobreviver e crescer (SIQUEIRA & INQUE, 1992), o estudo do desenvolvimento celular, a produção de produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, a obtenção de suspensões celulares e a propagação, com a formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000).

A cultura de calos, de suspensões celulares e de protoplastos são de relevante importância nas investigações sobre a diferenciação celular e a biologia molecular (VEASEY et al., 1991). Através da cultura de células, linhas celulares mutantes com resistência a antibióticos, herbicidas, aminoácidos e seus análogos, toxinas fúngicas e tolerância a estresse ambiental tem sido selecionadas (BHOJWANI & RAZDAM, 1996). Outra aplicação da cultura de células está relacionada com a produção de metabólitos secundários na área industrial.

O cultivo de calos e células também tem facilitado a elucidação dos fatores que interferem no metabolismo secundário, tendo em vista a produção de substâncias de importância medicinal *in vitro* (OKSMAN-CALDENTY & INZÉ, 2004).

A partir da zona meristemática ou dos calos, o padrão de diferenciação pode conduzir a um grau de organização morfo-anatômico específica, refletindo na formação de um órgão, constituindo-se no processo denominado organogênese. Quando a formação do órgão é decorrente de tecido do explante, ou de pequena proliferação do mesmo, denomina-se organogênese direta, e quando ocorre a partir de células dos calos, denomina-se organogênese indireta (KUNEIDA & KERBAUY, 1986).

Os calos podem conter células ou grupos de células que possuem centros ativos de divisão celular. Em condições adequadas, esses centros são induzidos e se capacitam para a produção de órgãos; nos casos em que já são capazes, os centros são estimulados. As células capazes de responder a determinados estímulos são denominadas competentes, nelas podem ocorrer a diferenciação celular e a formação de brotos ou

raízes. A competência é o primeiro passo para a diferenciação celular; o segundo é a indução da determinação em células competentes. As células são determinadas quando são submetidas a um caminho específico de desenvolvimento geneticamente programado e continuam sem a influência de reguladores de crescimento (GEORGE, 1996).

Para a maioria das espécies eudicotiledôneas, uma combinação de auxinas e citocininas é fundamental para a produção de calos embriogênicos. Entretanto, para a maioria das monocotiledôneas, especialmente nas gramíneas, a adição de citocinina nem sempre é requerida para a formação de calos embriogênicos. Porém, nestes casos, muito provavelmente a concentração endógena de citocininas já é suficiente para promover o crescimento celular (TEIXEIRA, 2005).

O uso de meios de cultura apropriados para cada fase do cultivo é condição básica, devendo estes meios proporcionar os nutrientes necessários ao metabolismo das células vegetais em cultivo para o crescimento e a diferenciação dos tecidos (KOZAY et al., 1997).

O preparo do meio de cultura merece atenção com relação às concentrações dos componentes, principalmente dos reguladores de crescimento. A difusão dos componentes é alterada de acordo com a consistência do meio e, conseqüentemente, a disponibilidade desses elementos para a célula vegetal (VALLE, 2003).

O meio nutritivo usado para indução de calos embriogênicos e, posteriormente formação de embriões somáticos, em tecidos de coníferas, freqüentemente contém nitrogênio orgânico, suplementado por substâncias como caseína hidrolisada, glutamina, aspargina, ou pequena concentração de diversos aminoácidos (HAKMAN et al., 1985; DURZAN & GUPTA, 1987; GUPTA et al., 1987; BOULAY et al., 1988; HAKMAN & von ARNOLDI, 1988; von ADERKAR & BONGA, 1988; VERHAGEN & WANN, 1984).

Os hormônios são uma classe de substâncias químicas endógenas facilmente transportadas para as células responsivas, onde estão diretamente envolvidos no controle da atividade gênica na transcrição e tradução, de um grande número de processos. Supõe-se que estas células responsivas sejam caracterizadas pela presença de receptores que se ligam ao hormônio e subseqüentemente iniciam a resposta na célula (GUERRA et al., 2001).

Os efeitos dos reguladores de crescimento geralmente variam quanto às respostas das células, tecidos e órgãos *in vitro*, de acordo com as condições de cultivo, o tipo do explante e o genótipo da planta. Este efeito também depende do ambiente no qual órgão está sendo cultivado. Concentrações idênticas de um mesmo regulador de crescimento em dois meios básicos de cultura diferentes podem induzir respostas distintas (PIERIK, 1987).

Os reguladores de crescimento têm efeitos maiores sobre o metabolismo primário e secundário das plantas (FOWLER, 1988; ERTOLA et al., 1995). As classes de substâncias responsáveis por essa função são: auxina, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico e brassinosteróis (SALISBURY & ROSS, 1992).

Normalmente, na propagação *in vitro* os reguladores de crescimento constituem-se nos principais componentes do meio de cultura a serem considerados, tendo em vista que as respostas morfogênicas dependem da interação entre esses compostos e a espécie vegetal e do tipo de explante utilizados (COENEN & LOMAX, 1997; PIERIK, 1997).

A concentração dos e reguladores de crescimento é freqüentemente um fator importante na produção de produtos secundários (DiCOMOS & TOWRES, 1984;

DEUS & ZENK, 1982). A concentração, o tipo e a relação auxina/citocinina alteram significativamente as respostas das células vegetais cultivadas *in vitro* (MANTELL & SMITH, 1984).

KETCHUM et al. (1995) verificaram que a suplementação do meio de cultura com citocinina e auxina foi mais adequada para o crescimento celular e produção de calos, do que a adição apenas de auxina. MORALES et al. (1999) afirmam que frequentemente a indução de calos é obtida, quando os explantes são cultivados em meio contendo auxina ou alta relação citocinina/auxina.

O regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) tem sido mencionado como inibidor na produção de metabólitos secundários em várias espécies vegetais em grande número de casos. A substituição da auxina 2,4-D pelo ácido α -naftalenoacético (ANA) ou pelo ácido indolacético (AIA) tem demonstrado acentuar a produção de antocianinas em células em suspensão de *Populus* spp e de cenoura (*Daucus carota*) e betacianinas em culturas em suspensões de *Portulaca*, de nicotina em suspensões de fumo (*Nicotiana Tabacum*), de chiconina em suspensões de *L. erythrorhizon* e de antocianina em *M.citrifolia* (RAJENDRAN et al., 1992; ZENK et al., 1975). Entretanto, tem sido constatado que o 2,4-D estimula a biossíntese de carotenóides em células em suspensão cenoura (*Daucus carota*) (MOK et al., 1976) e a produção de antocianina em culturas de calos de *Oxalis linearis* (MEYER & VAN STADEN, 1995).

As citocininas apresentam diferentes efeitos dependendo do tipo de metabólito a ser produzido e da espécie de interesse. Desta forma, a cinetina (6-furfurilamino-purina) estimula a produção de antocianina em *Haplopappus gracilus*, entretanto inibe a formação de antocianina em cultura de células de álamo (*Populus spp*) (SETZ & HINDERER, 1988; MOK et al., 1976). Por outro lado, os ácidos giberélico e abscísico foram relatados como supressores da produção de antocianinas em inúmeras culturas (BOHN et al., 1988; SEITZ & HINDERER, 1988).

Uma das últimas inovações, na micropropagação de espécies lenhosas, tem sido a introdução do TDZ [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia] como regulador de crescimento no meio de cultura (GRAÇA et al., 2001). Embora tenha sido desenvolvido para ser utilizado como desfoliante em algodão, com o nome comercial de Dropp. Esta citocinina possui alta atividade em cultivos *in vitro*, quando utilizada em pequenas concentrações (MOK et al., 1982). A superior potencialidade do TDZ sobre as outras citocininas do tipo das adeninas, em particular à BAP (6-benzilaminopurina) e a zeatina [N^6 -(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil)amino purina], ficou comprovada em bioensaios com cultura de calos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (MOK et al., 1980).

2.5.2 Cultura de Células Vegetais

A cultura de células e de tecidos vegetais é fundamental para muitos aspectos da biotecnologia de plantas. Um grande número de aplicações das funções vegetais depende de habilidade das células e dos tecidos vegetais crescerem em soluções nutritivas de composição conhecida. Dentre as aplicações, cita-se: a propagação de plantas, a manutenção e conservação de germoplasma, a produção de compostos químicos (fotoquímicos) de valor comercial e a engenharia genética (VALLE, 2003).

Cultura de células em suspensão consiste em técnicas de indução, propagação e manutenção de células em meio líquido, sob agitação (mesa agitadora orbital). A célula vegetal possui totipotência (capacidade potencial para regenerar uma planta inteira), a

cultura de células em suspensão é uma ferramenta muito útil para micropropagação, melhoramento genético e conservação de recursos genéticos (MATSUMOTO, 2006).

Além destas aplicações, esta técnica não se refere somente à cultura de células em suspensão, mas também inclui o processo de regeneração de plantas. O emprego da cultura de células em suspensão na micropropagação já foi descrita para várias espécies vegetais, devido a sua alta eficiência de propagação, fácil adaptação para automatização, inclusive na produção de sementes sintéticas, e conseqüentemente possibilitando reduzir o custo operacional (KITTO & JANICK, 1985; REDENBAUG et al., 1986).

A utilização da tecnologia de culturas de células vegetais apresenta-se como uma via alternativa à produção de produtos naturais obtidos por síntese química ou microbiana, especialmente nas espécies vegetais raras ou ameaçadas de extinção. A cultura de células em suspensão é uma importante ferramenta para a obtenção de produtos vegetais de alto valor agregado, desde que a viabilidade econômica do processo seja viável (COSTA & RAPOSO, 2004).

As culturas de células de plantas, na sua maioria, produzem quantidades reduzidas e diferentes perfis de metabólitos secundários, quando comparadas à uma planta intacta, além disso, a quantidade e a qualidade da produção podem mudar com o tempo (SAJC et al., 2000). Essa característica pode ser atribuída à baixa diferenciação das células que compõem as culturas (Di COSMOS & MISAWA, 1995), entretanto, essa correlação não é generalizada (YEOMAN & YEOMAN, 1996). A produção de muitas substâncias do metabolismo secundário por cultura de células vegetais é marcadamente aumentada sob condições controladas de iluminação (fotoperíodo) (KIERAN et al., 1997).

A consistência do meio de cultura merece atenção com relação à disponibilidade dos seus componentes, principalmente dos reguladores de crescimento. A difusão destas substâncias é alterada de acordo com a consistência do meio e, conseqüentemente, a disponibilidade dos elementos às células vegetais também varia (VALLE, 2003).

A manipulação de nutrientes também é determinante em culturas vegetais. Os meios nutritivos baseiam-se nas necessidades das plantas quanto aos minerais, com algumas modificações para atender as necessidades *in vitro* específicas como metabólicas, energéticas e estruturais das células (PETERSEN, 2006).

Os reguladores de crescimento são as substâncias dos meios de cultura que mais afetam o metabolismo primário e secundário das plantas (FOWLER, 1988; ERTOLA et al., 1995). As classes responsáveis por esses efeitos são: as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o ácido abscísico, o etileno, as poliaminas, os jasmonatos, o ácido salicílico e os brassinosteróis (SALISBURY & ROSS, 1992).

O ácido indolacético (AIA) e as auxinas sintéticas, tais como o ácido indolbutírico (AIB), o ácido α -naftalenacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) estão entre as auxinas mais utilizadas na cultura de tecidos vegetais.

Os jasmonatos em plantas têm papéis fundamentais no gene e regulamento metabólico, defesa, respostas para trauma, reprodução, e possivelmente comunicação (LIECHTI & FARMER, 2002; DEVOTO & TURNER, 2003). São reguladores potentes de lipídio em plantas, medeiam respostas a trauma mecânico e patógenos e é importante na reprodução e regulação metabólica.

O TDZ (tiadizuron) tem sido usado na micropropagação, pois segundo HUETTMAN & PREECE (1993), é um excelente estimulante par formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1 μ m.

Nos meios de cultura utilizados para o cultivo de células vegetais, normalmente, são utilizadas concentrações de 20 e 30g/L de sacarose. PANDA et al. (1992)

descrevem que concentrações de sacarose acima de 2% (p/v) são adequadas, não somente para aumentar o rendimento de metabólitos secundários, como também a taxa de síntese.

O uso de um meio de cultura apropriado para cada fase do cultivo representa uma condição básica, devendo estes meios proporcionar os nutrientes necessários ao metabolismo das células vegetais e para o crescimento e diferenciação dos tecidos (KOZAY et al., 1997).

O estabelecimento de cultura de células vegetais em suspensão, sob contínua agitação em meio de cultivo líquido, é um processo que apresenta algumas limitações, mesmo quando a espécie/genótipo cultivado adapta-se bem a essa forma de cultivo. Populações celulares homogêneas que apresentam alta taxa de multiplicação são bastante adequadas para estudos de processos fisiológicos em plantas. Culturas de células em suspensão são utilizadas, principalmente para o isolamento de protoplastos, indução de embriogênese somática, produção de metabólitos secundários e estudos básicos de metabolismo (CELEDÓN et al., 2000).

As culturas líquidas apresentam ainda a vantagem de não sofrerem a influência da composição química das substâncias solidificantes, o que resulta em culturas mais uniformes. Também, a agitação necessária às culturas líquidas elimina a formação de gradientes físicos e químicos, permitindo maior disponibilidade dos nutrientes, permitindo a otimização do crescimento das culturas (CELEDÓN et al., 2000).

A cultura de células vegetais consiste na indução e proliferação de células a partir de um fragmento da planta em presença de substâncias nutrientes e reguladoras do crescimento vegetal. A cultura de células e tecidos pode produzir compostos idênticos ou similares àqueles presentes na planta matriz, ou ainda os compostos de interesse poderão estar ausentes (BOTTA et al., 2001).

2.6 Biotecnologia

Nos últimos anos, diferentes grupos de pesquisadores do Brasil, Austrália, Japão, Estados Unidos e Inglaterra, vêm atuando em laboratórios públicos e privados, em programas de transformação genética, visando à obtenção de plantas transgênicas de *Eucalyptus spp.*, contendo características como resistência a herbicidas, insetos, ao frio, a doenças e a modificação do teor e/ou composição da lignina. Estas mudanças são de grande importância comercial. Várias empresas privadas já desenvolvem metodologias eficientes para a transformação de diversas espécies e híbridos de *Eucalyptus spp.* Entretanto, devido a problemas de confidencialidade, estas informações, geralmente, não podem ser divulgadas (MACRAE e van STADEN, 1999).

Atualmente, as estratégias utilizadas com maior frequência e eficiência visando o estabelecimento de protocolos de transformação genética para o *Eucalyptus spp.* são aquelas baseadas nos sistemas por *Agrobacterium* e biobalística. Os benefícios advindos da biotecnologia ainda são incipientes. Serão necessários alguns anos para que novas aplicações possam ter aplicação comercial. Na sua maturidade, a biotecnologia proporcionará maior flexibilidade e eficácia no desenvolvimento de variedades transgênicas (BORÉM, 2001).

Apesar do grande número de trabalhos com *Eucalyptus spp.* com a ferramenta biotecnológica da cultura de tecidos, nada se conhece sobre o efeito que ocorre no âmbito molecular durante o tempo em que o material está sendo tratado, nem quais são os mecanismos que regulam a absorção dos reguladores de crescimento; portanto, mais

pesquisas são necessárias usando o estudo desse estímulo, principalmente com relação às vias de regeneração (ANDRADE et al., 2006).

O estudo da lignificação está atualmente beneficiando desenvolvimentos na biologia molecular e de transgênia. Perspectivas para futuros desenvolvimentos de pesquisas abordando a estrutura e organização da parede celular de plantas lignificadas em relação ao teor de lignina quanto a sua composição existindo a possibilidade de se trabalhar a relação existente entre as unidades constitucionais da lignina (cumarila, guaiacila e siringila) dependendo da finalidade que o setor florestal deseja como produto final.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos explantes

O experimento foi desenvolvido a partir de sementes de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake germinadas *in vitro*, foram adquiridas do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF-SP).

As sementes foram desinfestadas com uma solução contendo 100mL de hipoclorito 1% + 0,3mL de Tween 20, sob agitação, por 20 minutos; lavada por 5 vezes com H₂O bidesionizada autoclavada; e colocadas em papel filtro autoclavado para retirar a umidade das sementes. O tween 20 é um espalhante adesivo comumente utilizado, o qual aumenta a penetração da solução no tecido.

Foram preparadas soluções estoques de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hormônios e antibiótico (Tabela 2). Estas soluções estoques com validade de tempo variada: macronutrientes, micronutrientes e vitaminas com validade de três meses em temperatura de 5°C e armazenadas em vidro âmbar; antibiótico e hormônios com armazenamento de 30 dias, sendo que o AIA com validade de sete dias, a 5°C.

O uso de antibióticos e fungicidas previne a contaminação microbiana proveniente de infecções sistêmicas das plantas matrizes. Entretanto estas substâncias não podem ser usadas como substitutas eficientes das técnicas de assepsia do explante no momento do estabelecimento *in vitro*. É necessário, antes de escolher o produto, verificar se o mesmo não apresenta efeitos fitotóxicos ao explante (PASQUAL, 2001). Rifampicina e o benomil como fungicida, que são utilizados com frequência em culturas de tecidos e de células como antibiótico e fungicida, respectivamente.

O meio de cultura foi esterilizado em autoclavagem durante 20 minutos a 120°C e a uma pressão de 1,0 atm. Em seguida, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade de 250mL, contendo 40mL de meio MS, com 5 sementes, acrescido 30g/L de sacarose, 0,1 g/L de benomil, 0,1g/L de rifampicina e 3g/L de Phytigel®. Foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16/8 horas e intensidade luminosa de 30 mmol m⁻².s⁻¹. As plântulas foram cultivadas por 30 dias e então explantes (segmento caulinar) foram obtidos para produção de calos (Figura 7).

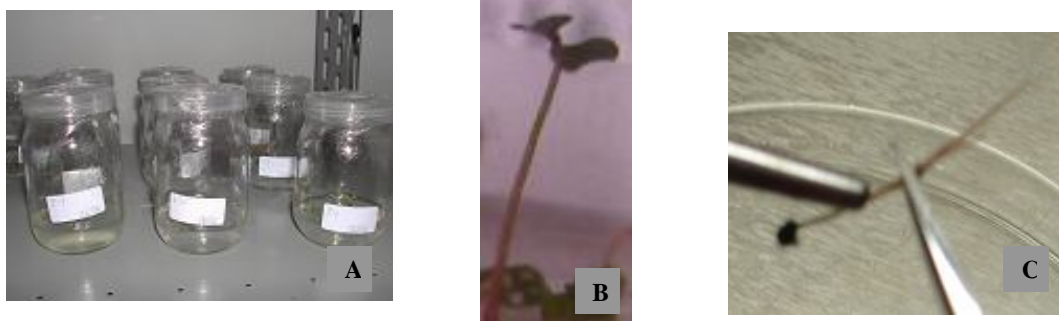


Figura 7. (A) Germinação, (B) Plântula com 30 dias e (C) Segmento caulinar para produção de calos de *Eucalyptus urophylla*.

Tabela 2. Meio de cultura MS para germinação.

NUTRIENTES/VITAMINAS	SOLUÇÃO ESTOQUE - g/L
NH ₄ NO ₃	165
KNO ₃	190
CaCl ₂ .2H ₂ O	44
MgSO ₄ .7H ₂ O	37
KH ₂ PO ₄	17
MnSO ₄ .H ₂ O	1,690
+ H ₃ BO ₃	0,620
+ ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,860
+ Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	3,73
+ FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78
Tiamina.HCl	0,02
+ Ácido Nicotínico	0,1
+ Piridoxina. HCl	0,1
+ Glicina	0,4
KI	0,083
CuSo ₄ .5H ₂ O	0,250
+ CoCl ₂ .6H ₂ O	0,250

3.2 Produção de calos

Para produção de calos com meio MS modificado (composto por todos os itens da Tabela 2, com exceção do KI) foram realizados 21 tratamentos, de acordo com a Tabela 3, com 5 repetições, com sete subculturamentos dos calos em intervalos de trinta dias.

Todos os tratamentos foram mantidos em BOD à de 25°C por 210 dias, em fotoperíodo nulo, visando a obtenção dos melhores protocolos com calos friáveis para produção de células em meio líquido suspenso.

Estes calos foram induzidos através de explante (segmentos caulinar) de 1 cm, os quais foram excisados de mudas com 30 dias após a germinação *in vitro* das sementes. Estes explantes foram inoculados em placas de Petri.

Foram utilizados tratamentos contendo os reguladores de crescimento auxina e citocinina:

- 1) AIA – ácido 3-indolacético;
- 2) 2,4-D – 2,4-diclorofenoxiacético;
- 3) ANA – ácido α -naftalenoacético; e
- 4) TDZ - 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia).

De forma combinada e isolada conforme especificado na Tabela 3 e Figura 8.

Tabela 3. Legendas, reguladores de crescimentos e quantidades de meio MS modificado utilizado nos tratamentos de calos de *Eucalyptus urophylla*.

Nomenclatura	Auxina	Citocinina	5 Placas de
---------------------	---------------	-------------------	--------------------

				Petri
EU1	AIA ¹	TDZ ¹		40mL
EU2	AIA ²	TDZ ¹		40mL
EU3	2,4-D ¹	TDZ ¹		40mL
EU4	2,4-D ²	TDZ ¹		40mL
EU5	ANA ¹	TDZ ¹		40mL
EU6	ANA ²	TDZ ¹		40mL
EU7	AIA ³	TDZ ¹		40mL
EU8	AIA ⁴	TDZ ¹		40mL
EU9	AIA ³	TDZ ³		40mL
EU10	AIA ⁴	TDZ ³		40mL
EU11	-	TDZ ¹		40mL
EU12	-	TDZ ²		40mL
EU13	-	TDZ ³		40mL
EU14	-	TDZ ⁴		40mL
EU15	-	TDZ ⁵		40mL
EU16	AIA ⁵	-		40mL
EU17	AIA ⁶	-		40mL
EU18	AIA ⁷	-		40mL
EU19	AIA ⁸	-		40mL
EU20	AIA ⁹	-		40mL
EU21	AIA ³	-		40mL

Nota: AIA – ácido 3-indolacético; 2,4-D – ácido diclorofenóxiacético; ANA – ácido α -naftalenoacético; TDZ: 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia; AIA¹:10 μ M; AIA²:15 μ M; AIA³:20 μ M; AIA⁴:25 μ M; AIA⁵:0,37 μ M; AIA⁶:0,55 μ M; AIA⁷:1,10 μ M; AIA⁸:6,67 μ M; AIA⁹:13,33 μ M 2,4-D¹:20 μ M, 2,4-D²:30 μ M; ANA¹:12 μ M; ANA²:16 μ M ; TDZ¹: 2 μ M; TDZ²: 2,43 μ M; TDZ³: 3 μ M; TDZ⁴: 4,82 μ M; TDZ⁵: 7,23 μ M.

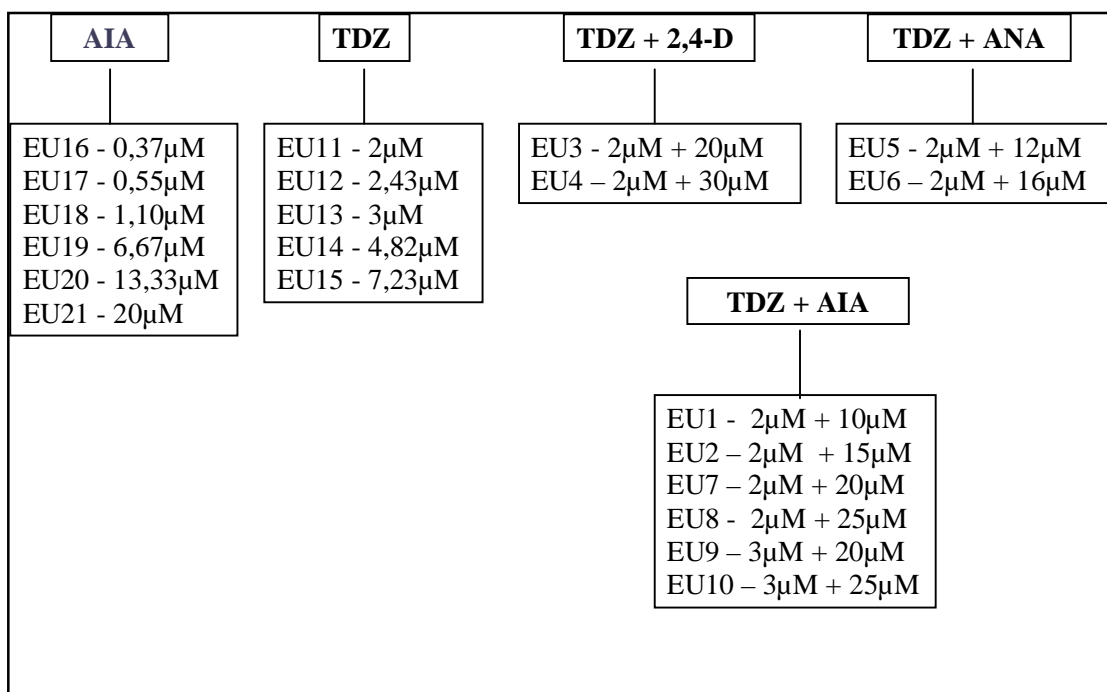


Figura 8. Relação dos tratamentos com as respectivas nomenclaturas.

3.2.1 Avaliação dos calos

Após a fase de produção de calos, estes foram avaliados aos 210 dias de cultivo *in vitro* em relação a textura. Para este critério foi estabelecido quatro classificações: calo friável, calo semifriável, calo semicompacto e calo compacto. Sendo calo friável: células fracamente unidas fáceis de serem separadas; calo compacto: células fortemente unidas, difíceis de serem separadas; calo semifriável/calco semicompacto: com características intermediárias entre o friável e o compacto.

3.2.2 Seleção do calo

A seleção do calo foi feita pelos calos com textura friável, sendo o tratamento EU9 (20 μ M de AIA + 3 μ M de TDZ) foi escolhido para iniciar em meio líquido (suspensão) para a produção de células livres.

3.3 Preparação do meio de cultura de suspensão para produção de células de *Eucalyptus urophylla*

Os calos selecionados do tratamento EU9, originados do mesmo explante, com peso de 0,90 g. Inicialmente, divididos ao meio, sendo cada metade colocada em frascos de Erlenmeyer, com capacidade de 250 mL, contendo 125 mL de meio MS modificado (MURASHIGE & SKOOG, 1962) líquido, sem a adição de KI, suplementado com

20 μ M de AIA + 3 μ M de TDZ (EU9), em mesa agitadora com 100 rpm, temperatura de 25 \pm 1 $^{\circ}$ C.

No período de 60 dias, com intervalos de sete em sete dias, as células e os aglomerados foram subculturados. A medida que aumentava a produção celular, as células e os aglomerados foram sendo distribuídos respectivamente para quatro, oito e dezesseis frascos de Erlenmeyer. Em todos os subculturamentos as células foram transferidas para um meio novo contendo uma alíquota de 10 mL do meio líquido anterior.

3.3.1 Tratamentos com elicitores para indução de lignina na parede das células em suspensão e lignina extracelular

As células já produzidas há 60 dias foram então transferidas para um meio de suspensão fresco contendo os elicitadores. Os tratamentos foram compostos de meio MS modificado suplementado com ácido jasmônico, ácido α -naftalenoacético e sacarose, e o controle (MS modificado puro) para induzir a produção de lignina extracelular ou de algum (ns) de seu (s) precursor (es) em meio de cultura básico MS. Foram utilizadas 4 repetições para cada tratamento (MS modificado suplementado e puro) (Tabelas 4 e 5, respectivamente). As células e aglomerados permaneceram nos respectivos tratamentos por 30 dias.

Tabela 4. Nomeação dos tratamentos com elicitores para células no meio de suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

TRATAMENTOS	ELICIADORES
URO1c	MS modificado + AJ (Ácido jasmônico)
URO2c	MS modificado + ANA (ácido α -naftalenoacético)
URO3c	MS modificado + Sacarose
URO4c	MS modificado puro (controle)

Tabela 5. Nomeação utilizada nos tratamentos para a indução de lignina extracelular no meio de suspensão celular.

TRATAMENTOS	ELICIADORES
URO1le	MS modificado + AJ (ácido jasmônico)
URO2le	MS modificado + ANA (ácido α -naftalenoacético)
URO3le	MS modificado + Sacarose
URO4le	MS modificado puro (controle)

3.4 Separação das células em suspensão do meio líquido

A separação das células em suspensão do meio líquido foi realizada por filtração utilizando Millipore com membrana 0,22 μ m para cada repetição de cada tratamento. Dois produtos foram obtidos desta filtração; sendo eles: (1) as células do *Eucalyptus urophylla* produzidas e (2) o meio líquido da suspensão celular para obtenção da lignina extracelular.

Foram realizadas análises para cada um destes dois produtos. A partir das células de *Eucalyptus urophylla* obteve-se a lignina tioglicolato e quantificação por espectroscopia no ultravioleta (UV) na faixa de 280 nm (BRUCE & WEST, 1989). Com o meio líquido da suspensão celular de cada tratamento foi realizado a quantificação por espectroscopia no UV e teste de Wiesner. Foi obtido também do meio líquido, após filtração e centrifugação um precipitado (lignina extracelular) segundo a metodologia de NOSE et al. (1995).

3.5 Teste Wiesner

Para indicar a presença de lignina e/ou derivados fenólicos liberados no meio de cultura, foi realizado, em capela de fluxo laminar, com pequena alíquota do meio de cultura de células em suspensão de cada tratamento o teste de cor do reagente Wiesner (Figura 9).

Do meio líquido filtrado em membrana Millipore 0,22 μ m, de cada tratamento foi colocada uma alíquota (três gotas com pipeta μ L) cada gota em diferentes partes de um retângulo de papel, cromatográfico (de aproximadamente 7 x 2,5 cm), esperou-se um minuto em seguida foi adicionado a cada uma das três gotas (com pipeta μ L) os reagentes (floroglucinol e ácido clorídrico) respectiva e seqüencialmente. Após os resultados foram fotografados.

O reagente foi preparado por uma combinação de 50 mL de uma solução de floroglucinol 2% em etanol 95% e 25 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado (ADLER et al., 1948). Como este reagente não é muito estável, a solução de

floroglucinol foi armazenada em vidro âmbar (com rolha de vidro), sendo adicionado ao HCl.

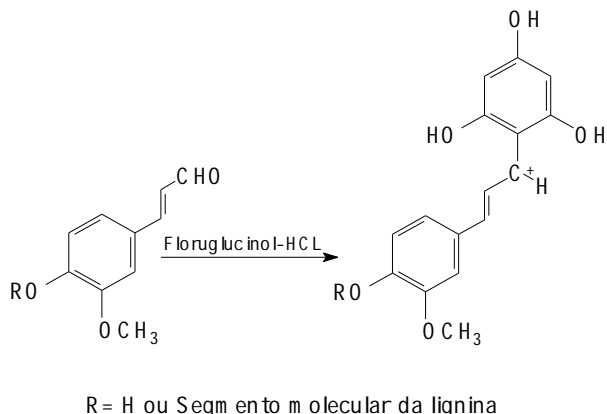


Figura 9. Reação de Wiesner.

3.6 Preparação de três repetições do filtrado da suspensão para produção de DHPs a partir de subtratamentos.

Foram feitas três repetições com o filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla* para síntese de material semelhante à lignina em meio de cultura MS.

O filtrado da suspensão celular de cada tratamento foi usado como colchão, isto é, substrato para a possível formação de material semelhante à lignina – para receber, por gotejamento controlado, a peroxidase, o peróxido de hidrogênio e a combinação deles.

O experimento foi realizado, em uma sala com temperatura controlada a 25°C da seguinte forma:

Foram preparados 112 mL/tratamento de meio MS básico líquido sem KI, Phytigel® e sacarose, sendo, que 24 mL foi utilizado para solubilizar 2,4 mg de peroxidase e 88 mL foram utilizados para adicionar 76 µL de peróxido de hidrogênio; para cada solução foi utilizado balão volumétrico de 250 mL revestido com papel alumínio para minimizar a interferência da luz e adicionado gás nitrogênio contido em um balão de látex passando através de uma seringa

Para o colchão foi utilizado balão de 500 mL de duas bocas revestido com papel alumínio onde foi colocado o filtrado (125 mL) em ambiente saturado N₂ sobre uma placa agitadora que manteve a solução (colchão) em constante agitação. A adição das soluções de peroxidase, peróxido de hidrogênio e combinação de peróxido de hidrogênio com peroxidase por gotejamento realizado através de uma bomba peristáltica (Tabela 6);

Após 48 horas, a solução reacional foi centrifugada a 23000 rpm por 15 minutos e os precipitados (pellets) lavados uma vez com água destilada e bidesionizada, secos

em temperatura ambiente e acetiladas. Os precipitados foram analisados por infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN H).

Tabela 6. Nomeação utilizada nos subtratamentos do filtrado da suspensão para produção de DHPs.

Tratamentos	Precusores
URO1fh	MS + H ₂ O ₂
URO1fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO1fp	MS + Peroxidase
URO2fh	MS + H ₂ O ₂
URO2fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO2fp	MS + Peroxidase
URO3fh	MS + H ₂ O ₂
URO3fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO3fp	MS + Peroxidase
URO4fh	MS + H ₂ O ₂
URO4fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO4fp	MS + Peroxidase

Nota: URO1 (MS + ácido jasmônico); URO2 (MS + ANA); URO3 (MS + Sacarose) e URO4 (MS).

3.7 Preparo dos DHPs

A obtenção do DHP (polímero por oxidação desidrogenativa) se deu em meio reacional por polimerização contínua controlada. As soluções foram preparadas e adicionadas ao colchão, 413 mL de meio MS básico líquido livre de KI, phytigel® e sacarose. O álcool coniferílico foi dissolvido (50mg) em meio MS puro (88 mL), o peróxido de hidrogênio (0,76 mL) foi dissolvido em 88mL de meio MS puro e a peroxidase (hoserdish) 275 unidade, na quantidade de 2,4mg em 24mL de meio MS, todas estas soluções em pH 5,8 então, três soluções foram adicionadas lentamente ao colchão (meio MS) por fluxo contínuo de velocidade de gotejamento de 2 mL/hora.

Todo este meio reacional permaneceu em atmosfera de N₂. A reação ocorreu no período de 48 horas. Todo este processo também foi feito para o álcool sinapílico.

O experimento foi realizado em uma sala com temperatura controlada a 25°C, o experimento foi realizado da seguinte forma:

Após 48 horas, o substrato (do balão de 500 mL) foi centrifugado à 23000 rpm por 15 minutos e os precipitados lavados uma vez com água destilada e bideionizada, secos em temperatura ambiente e acetilados e os pellets foram analisados por RMN H.

3.8 Acetilação

Os produtos extracelulares assim como os DHPs foram acetilados dissolvendo-os inicialmente em piridina e em seguida anidrido acético na proporção 1:1 durante 48 horas em temperatura ambiente. Após as 48 horas, os produtos acetilados foram purificados por precipitação em éter etílico e em seguida lavados e centrifugados três vezes. Posteriormente foi seco sob vácuo em dessecador de vidro, com KOH, por três dias (ABREU et al., 2006).

3.9 Obtenção da lignina tioglicolato da parede das células em suspensão

As células cultivadas nos quatro tratamentos, descritos anteriormente, foram coletadas individualmente por filtração em membranas de Millipore (0,22 µm), após 30 dias de cultivo.

Após a filtração, a lignina foi extraída da suspensão das células, separada e quantificada de acordo com a técnica descrita por BRUCE & WEST (1989). Esta técnica é baseada na derivação da lignina com o ácido tioglicólico que representa a lignina tioglicolato (NUÑEZ-PALEMUS & OCHOA-ALEJO, 2005).

De acordo com o método BRUCE & WEST (1989) modificado, 2g de células de cada tratamento foram pesadas e homogeneizadas no macerador mecânico de tecido Tekmar em 40 mL de metanol por 1 minuto, depois centrifugadas a 23.000 rpm por 10 minutos a 25 ° C. O material foi lavado com metanol, o resíduo foi transferido para frascos de vidro e colocado em estufa à 60° por 24hs. Após o resfriamento foi pesado amostras de 50 mg (dos resíduos retirados da estufa) de cada tratamento e em tubos de vidros fechados foram adicionados 5 mL de HCl 2N e 0,5 mL de ácido tioglicólico (procedimento realizado em capela de exaustão), os tubos lacrados foram colocados em água fervente e agitados para hidratar o ar inicialmente, os tubos foram colocados em

estufa por 4hs a 100 °C, o material foi esfriado e depois centrifugado a 23.000 rpm por 15 minutos a 25 °C e os supernadantes (líquidos) foram descartados e as porções residuais lavadas uma vez com 5 mL de água bidesionizada.

As porções residuais foram suspensas em 5 mL de NaOH 0,5 N e os frascos de vidro lacrados com parafilme e agitado (50 rpm) a 25 °C por 18hs para extração da lignina de tioglicolato, as amostras foram centrifugadas a 23.000 rpm por 15 minutos a 25°C. Os supernadantes (líquidos) foram retirados dos tubos da centrífuga e transferidos para frascos de vidro, onde 1 mL de HCl concentrado foi adicionado para cada tratamento, o líquido já contendo a lignina ficou em repouso para precipitar sob refrigeração por 4 horas a 4 °C, então o líquido foi retirado da refrigeração e centrifugado a 23.000 rpm por 15 minutos, as ligninas obtidas, que possuem uma cor marrom-alaranjada, foram dissolvidas em 10 mL de NaOH 0,5N. A quantificação foi realizada utilizando um aparelho espectrofotométrico UV.

3.10 Determinação do teor de lignina por UV do filtrado da suspensão celular

A técnica acima descrita por BRUCE & WEST (1989) foi uma preparação das amostras a serem quantificadas. A curva de calibração foi realizada com a relação entre a concentração e a absorbância com amostra padronizada de lignina de Björkman de *Galeziana gorzeana* diluídas em NaOH com seis concentrações (0, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L).

As amostras de cor marrom-alaranjada obtidas das ligninas tioglicolato realizada nas células dos tratamentos, foram diluídas em 10 mL de NaOH 0,5N, com uma pipeta (5 mL), foi colocado 4 mL das amostras diluídas NaOH 0,5N (de cada tratamento) na cubeta de quartzo introduzindo-a no compartimento apropriado (porta –amostra) do espectrômetro.

As concentrações de lignina dos tratamentos (tabela 5) foram determinadas aplicando a seguinte equação: $A = k_1c + k_0$, onde A = absorbância; $k_1 = 0,001589$, c = concentração de lignina (ppm) e $k_0 = 0,130143$

Este mesmo procedimento também foi utilizado para quantificar amostras da lignina extracelular dos tratamentos:

Foi realizada a relação entre a concentração e a absorbância com amostra padronizada de álcool coniferílico dissolvida em MeOH com seis concentrações (0, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L) para a formação da curva de calibração (para as ligninas extracelulares).

Em amostras de 20 mL de meio líquido foram adicionadas 20 mL de MeOH diluído (1:10) dos tratamentos (tabela 6) (pelo método descrito por NOSE, et al., 1995 com modificações). Com uma pipeta (5 mL), foi colocado 4 mL (do meio líquido com o MeOH diluído) na cubeta de quartzo introduzindo-a no compartimento apropriado (porta –amostra) do aparelho (etapa igualmente realizada para a lignina da parede celular e para a lignina extracelular).

As concentrações de lignina dos tratamentos (Tabela 3) foram determinadas aplicando a seguinte equação: $A = k_1c + k_0$, onde A = absorbância; $k_1 = 0,001779$, c = concentração de lignina (ppm) e $k_0 = 0,048378$.

3.11 Liofilização do precipitado do filtrado da suspensão celular

O precipitado da centrifugação do filtrado da suspensão celular do *Eucalyptus urophylla* foi congelado por 24hs no freezer, depois colocado no liofilizador Enterprise I - Terroni por 16hs para desidratação completa do material para análises no IV e RMN H e RMN ¹³C.

3.12 Análise no Infravermelho

Das amostras liofilizadas, foram pesadas 2 mg de cada tratamento e maceradas com 200 mg de KBr (brometo de potássio) para produção de pastilhas de KBr. Os espectros foram registrados em aparelho de espectroscopia no IV por Nicolet 6700 FT IR

3.12.1 Infravermelho dos DHPs dos filtrados

Os materiais resultantes dos DHPs dos filtrados obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 16 horas. Das amostras secas, foram pesadas 2 mg de cada tratamento e maceradas junto com 200 mg de KBr para produção da pastilhas a serem analisadas. Os espectros foram registrados em aparelho por espectroscopia no IV por IV por Nicolet 6700 FT IR

3.13 RMN H

Os materiais extracelulares (precipitados) obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 16 horas. Para determinar estruturalmente o material extracelular foi utilizada RMN H. Das amostras liofilizadas, foram pesadas 100 mg de cada amostra dos tratamentos e dissolvidas em 0,5 mL de clorofórmio deuterado. Os espectros foram registrados em um aparelho Bruker AC 200 Advance 400 MHz.

3.13.1 RMN H dos DHPs dos filtrados e DHPs do meio MS

Os materiais formados dos DHPs dos filtrados e dos DHPs do meio MS obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 16 horas. Das amostras secas, foram pesadas 100 mg de cada tratamento e dissolvidas em 0,5 mL em CDCl₃. Os espectros foram registrados em um aparelho Bruker AC 200 Advance 400 MHz.

3.14 RMN ¹³C no estado líquido

A espectrometria de RMN¹³C é uma importante técnica para análises de lignina, em particular para determinar estruturas secundárias não receptivas a análise através de outros métodos (ROBERT, 1992). Os materiais extracelulares (precipitados) obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 16 horas para completa desidratação. Das amostras secas, foram pesadas 100 mg de cada tratamento e dissolvidas em 0,5 mL de DMSO-d₆ e a solução foi examinada por espectroscopia e os espectros foram registrados em aparelho Bruker AC 200 Advance 400 MHz. para RMN ¹³C.

3.14.1 RMN¹³C DHPs do meio MS

Os DHPs do meio MS obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 16 horas para completa desidratação. Das amostras secas, foram pesadas 100 mg de cada tratamento e dissolvidas em 0,5 mL de DMSO-d₆ e as soluções foram examinadas por espectroscopia e os espectros foram registrados em aparelho Bruker AC 200 Advance 400 MHz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Formação dos Calos

Em todos os tratamentos testados, os explantes de segmento caulinar de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake formaram calos após 30 dias de cultivo na BOD, sob condições de escuro, exceto o tratamento EU4 (2,4-D: 30µM e TDZ: 2µM), que continha alta relação auxina/citocinina. Os reguladores de crescimento utilizados (AIA, 2,4-D, ANA e TDZ) tanto na forma isolada, como na forma combinada (auxina e citocinina) tiveram êxito na indução de calos (Tabela 7). Foram testados tratamentos com a auxina (AIA) de forma isolada e as auxinas (AIA, ANA e 2,4-D) combinadas com a citocinina (TDZ). Todos estes tratamentos realizados foram feitos para estabelecer os melhores protocolos para utilização destes calos em cultura em suspensão de células.

Tabela 7. Tratamentos utilizados para a formação de calo, em explantes de segmento caulinar de *Eucalyptus urophylla*.

Tratamentos	Auxina	Citocinina	Textura
EU1	AIA ¹	TDZ ¹	Semicompacto
EU2	AIA ²	TDZ ¹	Semifriável
EU3	2,4-D ¹	TDZ ¹	Semicompacto
EU4	2,4-D ²	TDZ ¹	Não formou
EU5	ANA ¹	TDZ ¹	Semicompacto
EU6	ANA ²	TDZ ¹	Semifriável
EU7	AIA ³	TDZ ¹	Semicompacto
EU8	AIA ⁴	TDZ ¹	Semicompacto
EU9	AIA ³	TDZ ³	Friável
EU10	AIA ⁴	TDZ ³	Friável
EU11	-	TDZ ¹	Semicompacto
EU12	-	TDZ ²	Friável
EU13	-	TDZ ³	Friável
EU14	-	TDZ ⁴	Semifriável
EU15	-	TDZ ⁵	Semifriável
EU16	AIA ⁵	-	Friável
EU17	AIA ⁶	-	Friável
EU18	AIA ⁷	-	Friável
EU19	AIA ⁸	-	Compacto
EU20	AIA ⁹	-	Compacto
EU21	AIA ³	-	Compacto

Nota: AIA¹:10µM ; AIA²:15µM; AIA³:20µM; AIA⁴:25µM ; AIA⁵:0,37µM ; AIA⁶:0,55µM ; AIA⁷:1,10µM ; AIA⁸:6,67µM; AIA⁹:13,33µM 2,4-D¹: 20µM, 2,4-D² 30µM ; ANA¹: 12µM , ANA²:16 µM ; TDZ¹: 2µM; TDZ²: 2,43µM; TDZ³: 3µM; TDZ⁴: 4,82µM; TDZ⁵: 7,23µM

As auxinas são muito utilizadas, principalmente em trabalhos de micropropagação, sendo incorporadas ao meio de cultura para promover a formação de calos, o crescimento de células em suspensão e de órgãos, e para regular a morfogênese, especialmente quando associadas às citocininas (OLIVEIRA et al., 2006). As auxinas mais utilizadas no cultivo *in vitro* são os ácidos: indol-3-acético (AIA), α -naftalenoacético (ANA) e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (CARVALHO, 1999).

Estes reguladores de crescimento foram utilizados neste trabalho. Foi também utilizado a citocinina (TDZ), indicada por ser um poderoso regulador de crescimento já testado para cultura de células de *Eucalyptus* spp. por GRAÇA et al. (2001) e BARRUETO CID, 2002. Os fitormônios exercem um papel crítico influenciando todo aspecto de crescimento e desenvolvimento da planta (DAVIES, 1995).

GAMBORG (1982) e GEORGE (1996) afirmam que é possível o estabelecimento de cultura de calo de praticamente qualquer espécie vegetal e a partir da maioria de suas partes, quando ao meio de cultura são acrescidas auxinas e citocininas. A textura e a morfologia do calo dependem dos diferentes constituintes do meio de cultura. Geralmente, são produzidos calos friáveis, quando cultivados em meio de cultura contendo alta concentração de auxina e baixa de citocinina, enquanto que, e se a relação é inversa, os calos produzidos formam estruturas compactas.

Segundo REY et al. (1980) a conformação globular, friável e o crescimento dos calos são determinados pelas auxinas e citocininas, sendo que a primeira determina um calo mais friável enquanto as citocininas produzem calos mais firmes (compactos).

Porém nos tratamentos testados, os calos obtidos, a partir dos explantes caulinares de *Eucalyptus urophylla*, nas condições empregadas neste trabalho, formaram estruturas diversificadas, algumas citadas pelos autores mencionados anteriormente. Os calos obtidos apresentaram variação em relação à textura, dependendo do tratamento empregado.

4.1.1 AIA (ácido 3-indolacético)

O meio de cultura MS com regulador de crescimento AIA (ácido 3-indolacético) quando utilizado isolado, como nos tratamentos: EU16 (0,37 μ M), EU17 (0,55 μ M), EU18 (1,10 μ M), EU19 (6,67 μ M), EU20 (13,33 μ M) e EU21 (20 μ M), induziu a produção de calos que foram classificados em relação à textura.

Foi observado que nos tratamentos EU16, EU17 e EU18 que utilizaram baixíssima concentração de AIA entre 0,37 μ M – 1,10 μ M todos os calos apresentaram-se compactos (Figura 10). No tratamento EU19 que teve a concentração seis vezes maior (6,67 μ M) em relação aos tratamentos anteriores, os calos apresentaram textura semifriável.

Nos tratamentos EU20 (13,33 μ M) e EU21 (20 μ M), contendo concentrações mais altas de AIA, foram obtidos calos friáveis. ULISSSES et al. (2007) trabalhando com ovários extraídos de inflorescências de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink cultivados em meios de cultura contendo 11,42 μ M de AIA, 45,3 μ M de 2,4-D, 5,71 μ M de AIA e 22,65 μ M de 2,4-D, verificaram que altas concentrações de auxinas induziram também a formação de calos friáveis.

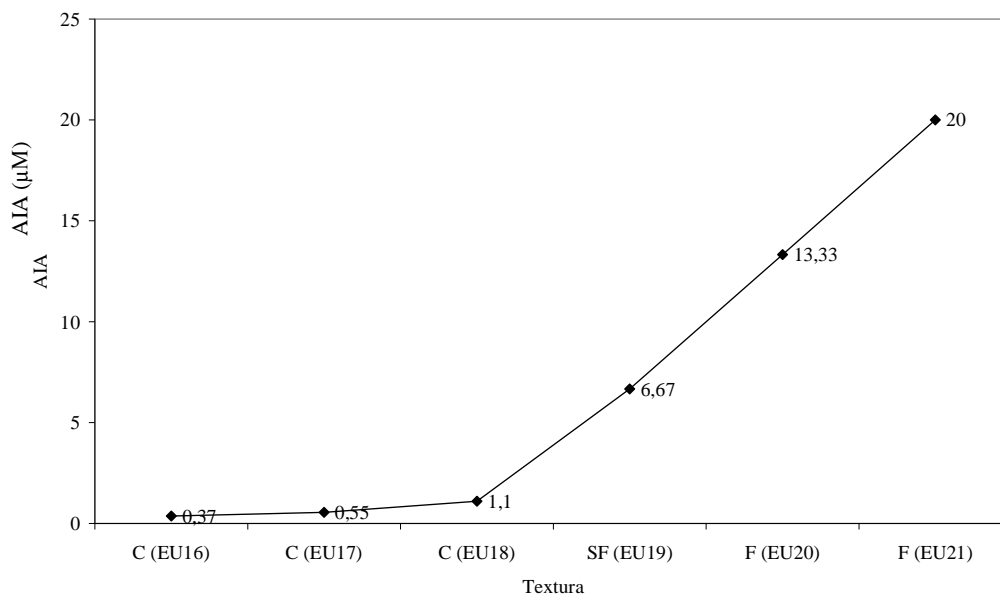
O aumento da concentração de AIA, a partir de 13,33 μ M, promoveu a formação de calos friáveis, contrastando com os tratamentos, cujas concentrações eram iguais ou inferiores a 1,10 μ M, com calos compactos. Comparando-se os resultados obtidos com os de GASSER et al. (2008) que induziram calos em explantes de fumo cultivados em meio MS contendo alta concentração de AIA, 34,25 μ M, obtendo calos também com textura friável, reafirmando que o AIA quando utilizado isoladamente, em altas concentrações, induz a formação de calos friáveis.

A calogênese é dependente de um balanço equilibrado entre os reguladores de crescimento, auxinas e citocininas. Nos tratamentos utilizados (EU16, EU17, EU18, EU19, EU20 e EU21), provavelmente, com o aumento da concentração do AIA no meio de cultura ocorreu um equilíbrio do conteúdo endógeno de citocininas do explante

proporcionando a formação de calos semifriáveis e friáveis, como pode ser observado nos tratamentos EU19, EU20 e EU21 (Figura 11).



Figura 10. Foto do calo com textura compacta, obtido a partir de explante de segmento caulinar de *Eucalyptus urophylla*, formado no tratamento EU16 (0,37 μM de AIA).



Nota: EU19 - AIA⁷ 0,37 μM ; EU20: AIA⁸ 0,55 μM ; EU21: AIA⁹ 1,10 μM ; EU16: AIA⁵ 6,67 μM ; EU 17: AIA⁶ 13,33 μM , EU18: AIA³ 20 μM , F - friabilidade; SF - semifriável e C – compacto

Figura 11. Tipo de textura apresentado pelos calos obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus urophylla*, cultivados em diferentes tratamentos utilizando AIA de forma isolada.

4.1.2 TDZ (Tiadizuron)

Foram testados cinco tratamentos utilizando como regulador de crescimento TDZ, EU11 (2 μM); EU12 (2,43 μM); EU13 (3 μM); EU14 (4,82 μM) e EU15 (7,23 μM).

O tratamento EU11(2 μM) foi o único no qual a textura dos calos formados foi semicompacta (Figura 12). Com o aumento da concentração desta citocinina (TDZ) para 2,43 μM (EU12) e 3 μM (EU13) a textura dos calos tornou-se friável.

Já nos tratamentos EU14 (4,82 μ M) e EU15 (7,23 μ M), os calos obtidos apresentaram textura semifriável. Verificou-se que a textura desejada (friável) dos calos, nas condições trabalhadas, foi obtida quando a concentração do TDZ foi entre 2,43 μ M e 3 μ M.

De acordo com MURTHY et al. (1998) os calos de uma forma geral induzidos em baixas concentrações de TDZ, geralmente tendem a promover a formação de calos mais compactos em relação às outras citocininas. Coadunando com que ocorreu neste trabalho, na menor concentração utilizada de TDZ, 2 μ M, tratamento EU11 os calos formados obtiveram textura semicompacta.



Figura 12. Foto do calo de textura semicompacta, obtido a partir de explante de segmento caulinar de *Eucalyptus urophylla*, formado no tratamento EU11 (2 μ M de TDZ).

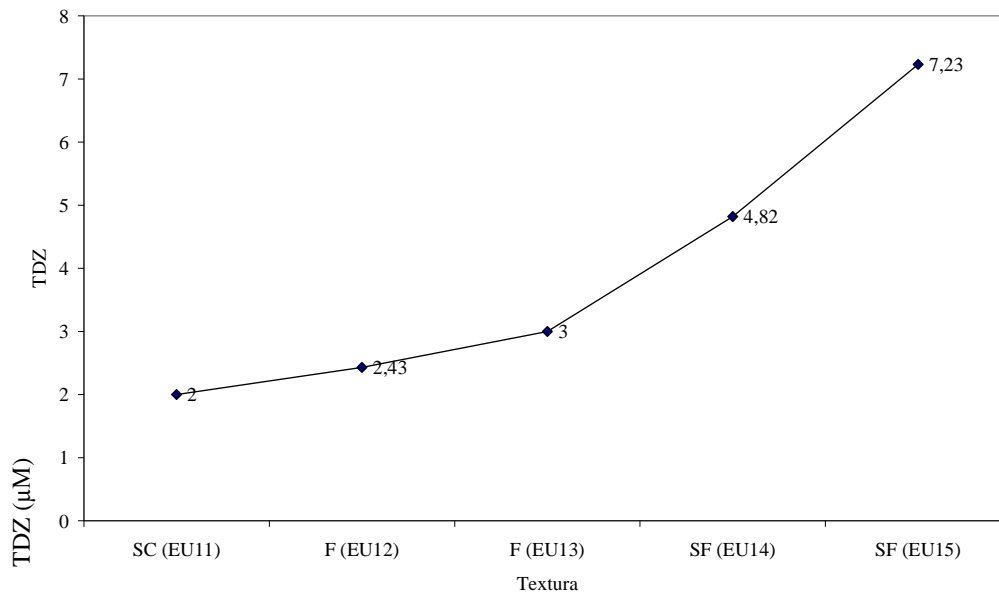
SANTOS et al. (2002) trabalhando com curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius* L. B. Smith) usando meio MS suplementado com TDZ (1,13 μ M e 2,27 μ M) revelou-se um potente indutor da calogênese *in vitro*.

O TDZ é conhecido por induzir efeitos em várias espécies vegetais, particularmente em plantas lenhosas, dependendo da concentração usada (BARRUETO CID et al., 1997; LU, 1993). Em experimentos conduzidos por BARRUETO CID et al. (1999) com explantes foliares de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, foram usados somente TDZ na concentração de 2 μ M em meio SP, a indução de calos foi de 100% e estes apresentaram-se compactos.

Comparando com o tratamento EU11 que continha a mesma concentração de TDZ, 2 μ M, os calos formados apresentaram textura semicompacta, ressaltando que quando a concentração de TDZ foi aumentada para de 2,43 μ M, como no tratamento EU12, foi observada textura friável nos calos (Figuras 13 e 14).



Figura 13. Fotos dos calos de textura friável, obtido a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus urophylla*, formados no tratamento EU12(2,43 μM de TDZ).



Nota: TDZ¹: 2 μM ; TDZ²: 2,43 μM ; TDZ³: 3 μM ; TDZ⁴: 4,82 μM ; TDZ⁵: 7,23 μM ; SC: semicompacto; SF: semifriável e F: friável.

Figura 14. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus urophylla*, cultivados em diferentes tratamentos utilizando TDZ de forma isolada.

4.1.3 AIA e TDZ (Tiadzuron)

Dentre os tratamentos testados de forma combinada (auxina + citocinina) utilizou-se AIA + TDZ nos seguintes tratamentos: EU1 (10 μM AIA + 2 μM TDZ), EU2 (15 μM AIA + 2 μM TDZ), EU7 (20 μM AIA + 2 μM TDZ), EU8 (25 μM AIA + 2 μM TDZ), EU9 (20 μM AIA + 3 μM TDZ) e EU10 (25 μM AIA + 3 μM TDZ).

Houve uma variabilidade em relação à textura apresentada pelos calos cultivados nestes seis tratamentos estudados. Nos tratamentos EU1, EU7 e EU8 os calos

apresentaram-se semicompactos, sendo que nestes três tratamentos foram mantidas as concentrações de TDZ (2 μ M) e alterando apenas as concentrações de AIA (10 μ M, 20 μ M e 25 μ M, respectivamente).

No entanto, no tratamento EU2, no qual utilizou-se a mesma concentração de TDZ (2 μ M), mais a concentração intermediária de AIA (15 μ M), foi observada uma textura semifriável, nos calos formados (Figura 15).

As citocininas participam na regulação de muitos processos nas plantas, induzindo a divisão celular em calos na presença de auxina, promovendo a formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, entre outros (TAIZ & ZEIGER, 2004).

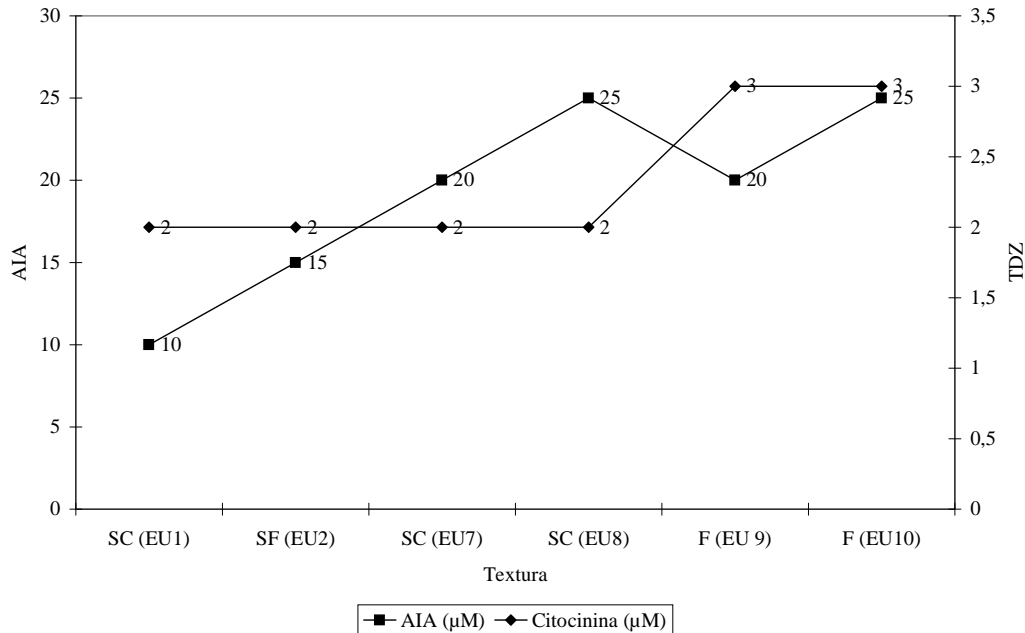
LEDO et al. (2005) induziram a formação de calos, em segmentos caulinares e nodais de plântulas de mangabeira, em meio de cultura MS suplementado com 5,71 μ M de AIA e 2,22 μ M; 4,44 μ M ou 8,88 μ M de BAP, obtendo calos friáveis.

Já nos tratamentos EU9 e EU10 os calos foram friáveis, utilizando as mesmas concentrações de auxinas (20 μ M e 25 μ M, respectivamente) dos tratamentos que foram semicompactos (EU1, EU7 e EU8), porém aumentando a concentração da citocinina (TDZ) para 3 μ M com calos friáveis. Pode-se supor que, sendo o TDZ um potente indutor da calogênese *in vitro*, este teve efeito nestes dois tratamentos (Figura 16).

Contrastando com os resultados obtidos por LAMEIRA et al. (2002), que obtiveram calos de textura friável, quando cultivaram segmentos nodais de plântulas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) em meio de cultura MS contendo 1,14 μ M AIA + 2,32 μ M cinetina.



Figura 15. Calos de textura semifriável EU2 (15 μ M de AIA + 2 de TDZ)



Nota: AIA¹:10µM; AIA²:15µM; AIA³:20µM; AIA⁴:25µM; TDZ¹: 2µM; TDZ³: 3µM; SC: semicompacto; SF: semifriável e F: friável.

Figura 16. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus urophylla*, cultivados em diferentes tratamentos utilizando AIA e TDZ de forma combinada.

4.1.4 ANA (ácido α -naftalenoacético) e TDZ (Tiadzuron)

Os tratamentos testados com ANA + TDZ foram EU5 (12µM ANA + 2µM TDZ) e EU6 (16 µM ANA + 2µM TDZ).

Os calos obtidos no tratamento EU5 apresentaram textura semicompacta. Já com os calos formados no tratamento EU6 (16 µM) tinham a textura semifriável. Como nesses dois tratamentos manteve-se a mesma concentração de TDZ (2µM), pode-se concluir que as concentrações de ANA se sobrepuseram em relação à textura de ambos os tratamentos.

ALVES et al. (2004) utilizaram como reguladores de crescimento ANA + TDZ, para a indução de calos em explantes foliares de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Esses autores obtiveram calos compactos quando ao meio de cultura foram adicionadas as seguintes concentrações: T1-2,27µM TDZ + 2,69µM ANA; T2- 2,27µM TDZ + 0,54µM ANA; T3-0,23µM TDZ + 0,054µM ANA e T4- 4,54µM TDZ + 0,54µM ANA no clone 2. A relação de auxina/citocinina no trabalho citado não foi favorável ao desenvolvimento de calos friáveis, no qual manteve uma alta relação citocinina/auxina na maioria dos tratamentos, contrastando com a relação utilizada no presente trabalho nos dois tratamentos EU5 (12µM ANA + 2µM TDZ) e EU6 (16 µM ANA + 2µM TDZ) que teve relação inversa, obtendo-se no tratamento EU6, calos semifriáveis tendendo a friáveis (Figuras 17, 18 e 19).

CARVALHO (2007) em experimento realizado com explantes caulinares do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* inoculados em meio MS suplementado com os reguladores de crescimento TDZ + Picloram, nas concentrações 4,54 μ M de TDZ + 4,14 μ M de Picloram e 4,54 μ M de TDZ + 20,7 μ M de Picloram, os calos apresentaram textura semifriável. No presente trabalho, observou-se a mesma textura nos dois tratamentos apesar da diferença na relação auxina/citocinina. No tratamento EU6 (16 μ M ANA + 2 μ M TDZ) utilizando uma alta relação auxina/citocinina, obteve-se calos com textura semifriável, diferentemente do tratamento EU5 (12 μ M ANA + 2 μ M TDZ), que mesmo mantendo esta alta relação, os calos apresentaram textura semicompacta.

REY & MROGINSKI (1996), trabalhando com *Aeschynomene* spp. observou que nos tratamentos contendo ANA e BAP, os explantes apresentaram comportamentos diferenciados como enrugamento da folha, formação de raiz diretamente do explante, calos compactos e com raiz e coloração variando entre o branco, marrom e acinzentado.



Figura 17. Calos com textura semicompacta, EU 5 (12 μ M ANA + 2 μ M de TDZ)

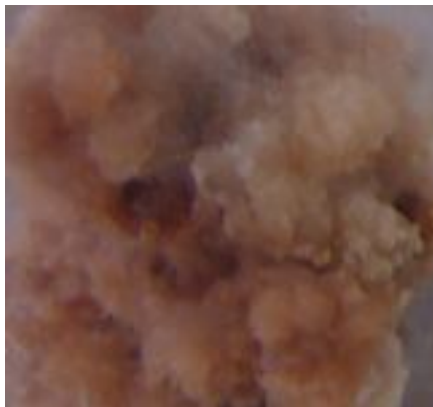
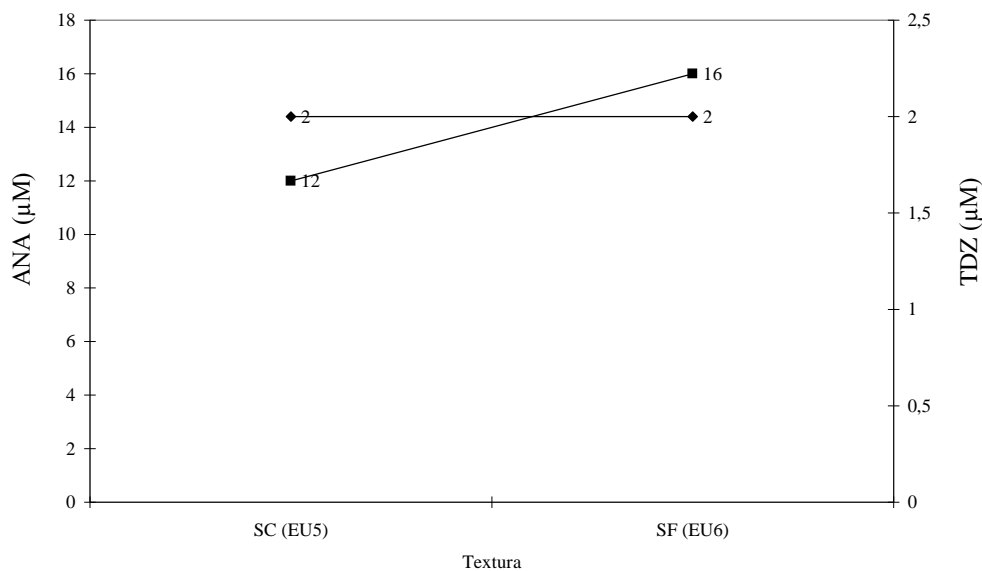


Figura 18. Foto dos calos com textura semifriável, obtido a partir de explantes de segmento caulinar de *Eucalyptus urophylla*, formado no tratamento EU 6 (16 μ M ANA + 2 μ M TDZ).



Nota: ANA¹: 12µM , ANA²:16 µM; TDZ¹: 2µM; SC: semicompacto e SF: semifriável.

Figura 19. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus urophylla*, cultivados em diferentes tratamentos utilizando ANA e TDZ de forma combinada.

4.1.5 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e TDZ (Tiadzuron)

Foram testados dois tratamentos com os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ de forma combinada, EU3 (20µM 2,4-D + 2µM TDZ) e EU4 (30µM 2,4-D + 2µM TDZ).

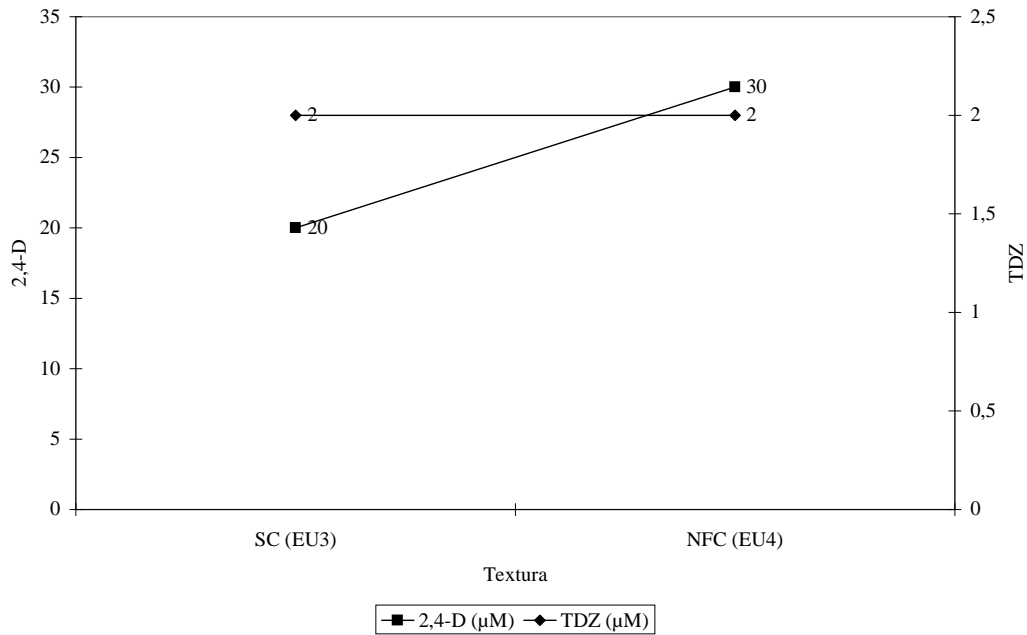
As combinações propostas para 2,4-D e TDZ (auxina + citocinina), nestes dois tratamentos, foram mantidas em alta relação auxina/citocinina. Entretanto, o único tratamento no qual não foi observada a formação de calos, dentre os 21 tratamentos estudados, foi o EU4, contendo 30µM de 2,4-D + 2µM de TDZ. Já no tratamento EU3 foi obtida a produção de calos de textura semicompacta. Pode-se observar que a auxina utilizada, 2,4-D na concentração 30µM, em combinação com 2µM TDZ em *Eucalyptus urophylla* teve um efeito inibitório para formação de calo. Entretanto, JAMAL (1985) trabalhando com *Eucalyptus tereticornis* obteve calos friáveis quando utilizou meio de cultura suplementado com 2,27µM de 2,4-D + 2,22µM de BAP (Figura 20).

Entretanto, ALBARRÁN et al. (1997) cultivaram segmentos foliares de mogno em meio de cultura de MS contendo a metade da concentração de sais, e como resultado obtiveram maior resposta para a formação de calos friáveis na presença de tiadiazuron (TDZ 0,9 µM) e de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D 22,6 µM).

Quando BARRUETO CID et al. (1994) utilizaram no meio de cultura MS o regulador de crescimento 2,4-D na concentração 4,53µM, obtiveram calos friáveis em alho (*Allium sativum* L., cv. Chonan), usando concentração quatro vezes menor, que a empregada no presente trabalho. Contudo com a mesma concentração de 2,4-D 4,53µM

+ 0,56 μM de BA utilizando segmentos foliares de *Gypsophila paniculata* inoculados em meio MS, SALMAN (2002) obteve também a friabilidade dos calos.

Apesar do 2,4-D ser a auxina mais frequentemente usada na indução de calogênese, neste trabalho, as concentrações usadas desta auxina combinadas com o TDZ apresentaram respostas não satisfatórias.



Nota: 2,4-D¹: 20 μM , 2,4-D² 30 μM , SC: semicompacto e NFC: não formou calo

Figura 20. Tipo de textura apresentado pelos calos, obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus urophylla*, cultivados em diferentes tratamentos utilizando 2,4-D e TDZ de forma combinada.

4.2 Teste de Wiesner realizado com amostra do meio de cultura de células de *Eucalyptus urophylla*

Com a realização do teste de Wiesner foi constatada a presença de substâncias fenólicas (lignina extracelular) em todos os tratamentos realizados (URO1, URO2, URO3 e URO4) em meio de suspensão celular de *Eucalyptus urophylla* (Figura 21).



Figura 21. Teste Wiesner dos tratamentos URO1, URO2, URO3 e URO4

4.3 Quantificação da lignina no Ultravioleta

Os dados experimentais apresentaram-se distribuídos segundo o teste de Lilliefor, ao nível de significância de 5% para teor de lignina da parede das células e para lignina extracelular do meio de suspensão de *Eucalyptus urophylla*, e a média contrastadas pelo teste de Tukey, ao mesmo nível de significância (Tabelas 16 e 17, Anexo I; Tabelas 18 e 19 Anexo II).

4.3.1 Quantificação da lignina da parede das células de suspensão de *Eucalyptus urophylla*

A quantificação da lignina foi realizada pelo método BRUCE & WEST (1989) da parede das células de *Eucalyptus urophylla* produzidas em suspensão celular em meio MS modificado com a adição de elicitores, sendo realizados quatro tratamentos (URO1c, URO2c, URO3c e URO4c) de acordo com a Tabela 8.

Através da curva de calibração: $C = (Abs - 0,130143) / 0,001589$, foram determinadas as concentrações da lignina da parede das células de *Eucalyptus urophylla* pela absorvância na faixa de 280nm.

Tabela 8. Nomenclatura dos tratamentos com eliciadores para células no meio de suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

Tratamentos	Eliciadores
URO1c	MS modificado + AJ
URO2c	MS modificado + ANA(ácido α -naftaleno)
URO3c	MS modificado + Sacarose
URO4c	MS modificado puro (controle)

Nota: MS: meio de cultura Murashige & Skoog modificado, 1962; AJ: ácido jasmônico e ANA: ácido α -naftalenoacético

De acordo com a análise estatística pelo teste Tukey as concentrações de lignina na parede das células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* foram estatisticamente diferentes entre si conforme tabela 9.

Tabela 9. Comparações através do Teste Tukey a nível de 5% de significância das médias dos teores de lignina da parede das células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*.

Tratamento	Repetições	Médias
URO3c	3	361,9833a
URO2c	3	303,2467b
URO1c	3	282,9000c
URO4c	3	235,4867d

Pode-se observar que todos os tratamentos utilizados com os reguladores de crescimento, ácido jasmônico (URO1c), ANA (URO2c) e com a sacarose (URO3c) tiveram um aumento no teor de lignina em relação ao controle.

O tratamento URO3c teve um aumento na ordem de 53%, foi o que utilizou a sacarose como elicitador na quantidade 3% (p/v) em meio MS. A sacarose foi um bom indutor de lignina na parede das células.

Corroborando com este resultado, NOSE et al. (1995) analisou o efeito da transferência de culturas de células em suspensão de *Pinus taeda* para uma solução de 8% (p/v) de sacarose resultando em uma significativa alteração na parede celular e no metabolismo da célula.

A sacarose é a fonte de carboidrato mais utilizada em meio de cultura de uma maneira geral, podendo também ser utilizados outros mono e dissacarídeos. A concentração mais utilizada em meio de cultura de tecidos é 3% (p/v) sendo suficientes para os processos de iniciação e diferenciação (GUERRA et al., 2001).

Ocorrendo exatamente a mesma constatação do autor acima para a lignificação da parede das células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*, com a mesma concentração habitualmente usada teve-se a concentração mais elevada de lignina na parede das células em suspensão.

Nos tratamentos que foram utilizados reguladores de crescimento (ácido jasmônico e ANA) tiveram um acréscimo em relação ao controle (URO4c). Porém menor do que quando utilizada a sacarose, como podemos observar na Figura 22. No tratamento URO2c (MS + ANA) o teor de lignina teve um aumento de 28% em relação ao controle.

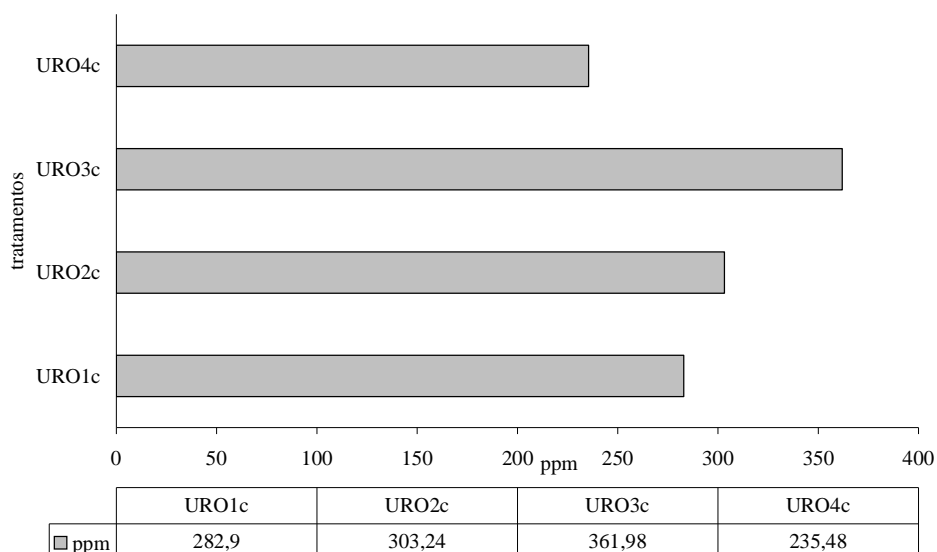


Figura 22. Teor de lignina na parede das células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*.

O tratamento URO1c (MS + ácido jasmônico) teve um aumento de 20% no teor de lignina em relação ao controle e foi o que menos induziu a formação de lignina dos três tratamentos que utilizaram elicitores, exceto o controle. O ácido jasmônico atua ativando genes para produção da PAL (que participa do caminho biossintético da lignificação) que catalisa substâncias especiais (KAVALIER, 2000).

Quando FÜRDEN et al. (2005) trabalhando com *Linum album* utilizou como elicitador o jasmonato de metila (200mM) em cultura de células em suspensão, a fenilalanina amônia-ase aumentou atividade imediatamente depois da adição desse regulador, alcançando um máximo entre 4 h e 24 h depois da elicitação, enquanto a atividade CAD enzima presente na etapa final do caminho biossintético da lignina e o conteúdo de lignina das células não foram afetados.

4.3.2 Quantificação da lignina extracelular do meio em suspensão de *Eucalyptus urophylla*

Com o meio líquido da suspensão celular, onde foram produzidas as células de *Eucalyptus urophylla* em meio MS modificado, com a adição de eliciadores. Foram realizados quatro tratamentos (URO1le, URO2le, URO3le e URO4le) de acordo com a Tabela 10. Com quantificação na faixa de 280 nm por espectroscopia em UV do material solúvel de acordo com NOSE et al. (1995).

Tabela 10. Nomenclatura utilizada nos tratamentos para a indução de ligninas extracelulares encontrados no líquido da suspensão celular.

Tratamentos	Elicidores
URO1le	MS modificado + AJ
URO2le	MS modificado + ANA
URO3le	MS modificado + Sacarose
URO4le	MS modificado puro (controle)

Nota: MS: meio de cultura Murashige & Skoog modificado, 1962; AJ: ácido jasmônico e ANA: ácido α -naftalenoacético.

A curva de calibração gerou uma equação: $C = (Abs - 0,048378) / 0,001779$, através desta equação foram determinadas as concentrações da lignina extracelular no meio em suspensão de *Eucalyptus urophylla* pelas absorvâncias.

Com a análise estatística pelo teste Tukey as concentrações das ligninas extracelulares no meio em suspensão de *Eucalyptus urophylla* foram estatisticamente diferentes entre si conforme Tabela 11.

Tabela 11. Comparações através do Teste Tukey a nível de 5% de significância das médias dos teores das ligninas extracelulares do meio de suspensão de *Eucalyptus urophylla*.

Tratamento	Repetições	Médias
URO3le	3	108,8333a
URO2le	3	89,5567b
URO1le	3	78,2967c
URO4le	3	69,6767d

Da mesma forma que ocorreu na parede das células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*, com o teor de lignina, aconteceu com as ligninas extracelulares, todos os tratamentos que tiveram eliciadores (URO1le, URO2le e URO3le) teve um aumento no teor das ligninas extracelulares em relação ao controle URO4le, como podemos observar na Tabela 11, todos foram estatisticamente diferentes entre si pelo teste Tukey a nível de 5% de significância.

O tratamento URO3le (MS + sacarose) foi o que apresentou o maior teor de lignina extracelular no meio de suspensão confirmando que a sacarose é um bom

indutor tanto de lignina na parede das células em suspensão, quanto da lignina extracelular no meio de suspensão.

LESNEY (1989), MESSNER & BOLL (1994) e NOSE et al. (1995) relatam que a formação da lignina extracelular tem sido reportada em cultura de células em suspensão de algumas espécies de conífera, particularmente quando utiliza-se elicitores com altas concentrações de sacarose.

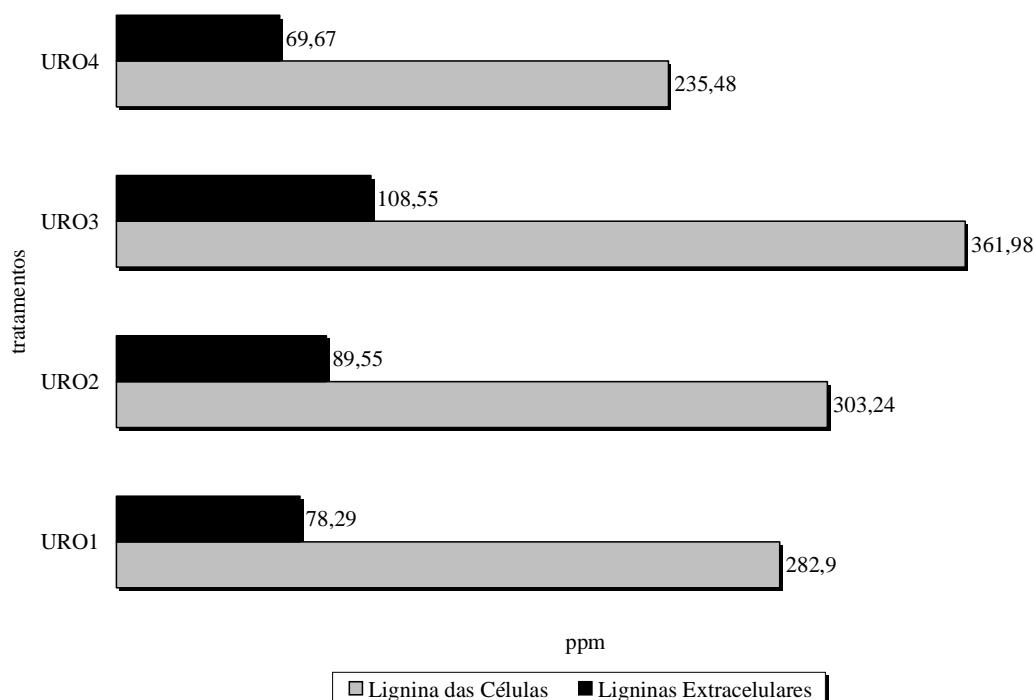
Comprovando a importância da sacarose para a indução da lignina extracelular quanto polilignóis extracelulares em culturas em suspensão em gimnosperma e angiospermas.

No tratamento URO2le (MS + ANA) teve um aumento de 28% de ligninas extracelulares no meio em suspensão de *Eucalyptus urophylla*. A auxina sintética ANA também elicitou a formação das ligninas extracelulares de forma superior que o outro regulador de crescimento ácido jasmônico (URO1pe) utilizado.

Segundo PETERSEN (2006) algumas auxinas como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) inibem a produção de metabólitos em uma grande quantidade de casos onde a eliminação deste ou a mudança por outros como ácido α -naftalenoacético (ANA) ou ácido indol acético (AIA) mostram a possibilidade do aumento de substâncias como antocianinas, ligninas e outras em suspensões celulares.

4.3.3 A inter-relação do teor de lignina da parede das células em suspensão com as ligninas extracelulares do meio de suspensão de *Eucalyptus urophylla*

Como pode-se observar, o teor de lignina das parede das células e o teor de lignina extracelular presente no meio em suspensão nos tratamentos (URO1, URO2, URO3 e URO4) apresentaram uma correlação positiva dos elicitores (ácido jasmônico, ácido α -naftalenoacético, sacarose e controle) sendo a sacarose o maior teor tanto de lignina da parede, como das ligninas extracelulares (Figura 23).



4.4 Análises de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN de H e ^{13}C é capaz de fornecer informações detalhadas a cerca dos componentes majoritários presentes em diferentes regiões específicas, assim como sua dinâmica molecular (SILVA, 2005).

4.4.1 RMN ^{13}C dos DHPs

Os DHPs (polímero por desidrogenação oxidativa) produzidos foram obtidos reproduzindo os mesmo tratamentos utilizados na suspensão celular, para indução de lignina extracelular em meio de suspensão com células de *Eucalyptus urophylla*.

Dentre os tratamentos realizados (Tabela 12) houve formação da DHPs nos seguintes tratamentos: DHP1c (Figura 24)., DHP2c e DHP4c, que utilizaram como um dos precursores o álcool coniferílico e a DHP2s com o álcool sinapílico.

Não foi identificado os DHPs nos tratamentos com sacarose utilizando ambos precursores (álcool coniferílico e sinapílico) (Figuras 55 a 57 no Anexo VI), sendo observado que trabalhando com o precursor álcool sinapílico existe uma dificuldade já relatada em alguns trabalhos (HIGUCHI, 1997) para formação do DHP. Foi obtido sucesso com o DHP2s que utilizou como colchão o meio MS suplementado com a auxina (ANA).

Tabela 12. Tratamentos realizados síntese de DHPs.

Tratamentos	Colchão	Precursores
DHP1c	MS + AJ	Álcool coniferílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase
DHP2c	MS + ANA	Álcool coniferílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase
DHP3c	MS + Sacarose	Álcool coniferílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase
DHP4c	MS Puro	Álcool coniferílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase
DHP1s	MS + AJ	Álcool sinapílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase
DHP2s	MS + ANA	Álcool sinapílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase
DHP3s	MS + Sacarose	Álcool sinapílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase
DHP4s	MS Puro	Álcool sinapílico + H ₂ O ₂ + Peroxidase

Nota: MS: meio de cultura Murashige & Skoog modificado, 1962; AJ: ácido jasmônico; ANA: ácido α -naftalenoacético e H₂O₂: Peróxido de hidrogênio.

Os sinais do espectro da RMN ¹³C do DHP2c em relação a RMN ¹³C da DHP4c foram mais acentuados em relação a maioria do sinais quando o colchão com meio MS foi suplementado com a auxina ANA e administrados os mesmo precursores conforme Tabela 13 apresentaram com maior intensidade. Pode-se citar como exemplo os sinais **110 ppm** (C-2) (anel guaiacílico), **55ppm** (metoxila do anel do guaiacílico) (Figuras 25 e 26, respectivamente).

Em relação a DHP1c pode observar a presença de sinais semelhantes a DHP4c, com intensidades parecidas como o pico **55,92ppm** (C- β de β -5/ Metoxila aromática em G) e **20,75ppm** do carbono metílico (grupo CH₃ de grupos acetilicos) (Figura 27).

A atuação do regulador de crescimento ANA (auxina) foi superior em relação ao ácido jasmônico na formação do DHP. Ressaltando que o único DHP formado com um dos precursores (álcool sinapílico) foi também com a auxina ANA a DHP2s.

Todos os DHPs formados tiveram a presença marcante da ligação β -O-4 em decorrência dos sinais: **144,35ppm** - C4 em unidade G de β -O-4; **134,26ppm** - C1 de β -O-4; **85,61ppm**- C β em β -O-4 em unidade G, **71,82ppm** - C α de β -O-4 e **65,17ppm**- β -O-4 com carbonila em α . A ligação de β -O-4 é a subestrutura mais abundante e importante da lignina, assim como nos DHPs. Para elucidar a propriedade e reatividade deste polímero, modelos com ligações β -O-4, são freqüentemente usado. Estas pequenas combinações de modelo são bastante simples e é fácil caracterizar, porém, não reproduzem perfeitamente o polímero da lignina (KISHIMOTO et al., 2006).



Figura 24. DHPc1 em meio reacional por polimerização contínua controlada.

Tabela 13. Sinais da RMN ^{13}C do controle da DHP do álcool coniferílico.

Deslocamento químico (ppm)	Deslocamento químico (LIN & DENCE, 1992)
170,76 - 168,30 – Carbonila ester alifático/Carbono Primário/Hidroxila aromática	171 – Carbonila ester alifático/Carbono Primário/Hidroxila aromática
150,82 - C3 em unidade G	149,1 - C3 em unidade G
148,09 - C-4 em unidade G	147,4 – C-4 em unidade G
144,35 - C-4 em unidade G de β -O-4	145,3 - C-4 em unidade G de β -O-4
134,26 – 132,26 – C1 de β -O-4	135,3 – C1 de β -O-4
130,58 – C- α do álcool cinamílico	130,86 – C- α do álcool cinamílico
127,91 – 127,55 - C- α e C- β de ARCH=CH-CH ₂ OH	127,91 - C- α e C- β de ARCH=CH-CH ₂ OH
121,31 – 121,16 - C-1 em H benzoato	121,31 C-1 em H benzoato
119,7 - 120,31 C-6 em unidade G/e/ne	120,31 C-6 em unidade G/e/ne
115,27 - 115,33 C-5 em unidade G /e/ne	115,33 C-5 em unidade G /e/ne
110,44 – C-2 em unidade G-G	110,9 – C-2 em unidade G-G
88,2 – C α em β -5	87,2 – C- α em β -5
88,21 – 85,61 – C α em β -5	88 - C- α em β -5Nimz
80,27 - C- β e C- α em unidades β -O-4/ α -4	80,27 - C- β e C- α em unidades β -O-4/ α -4
71,82 - C- γ em unidade β - β	71,82 - C- γ em unidade β - β
65,17 - C γ de β -5/ β -O-4 com carbonila em α	63 - C γ de β -5/ β -O-4 com carbonila em α
65,17 - C γ de β -5/ β -O-4 com carbonila em α	66,10 - C γ de β -5/ β -O-4 com carbonila em α
65-17 - C γ de álcool coniferílico acetilado em γ	65,6 - C γ de álcool coniferílico acetilado em γ
54,15 - C β em β -5	55 - C β em β -5
55,90 – Metoxila aromática em G e em S	55,7-55,90 – Metoxila aromática em G e em S
30,0 – Resíduo alifático	-
20,99 – Grupo CH ₃ de grupos acetílicos	20 - Grupo CH ₃ de grupos acetílicos
20,75 - Grupo CH ₃ de grupos acetílicos	20 - Grupo CH ₃ de grupos acetílicos

Nota: e-eterificado, ne não eterificado

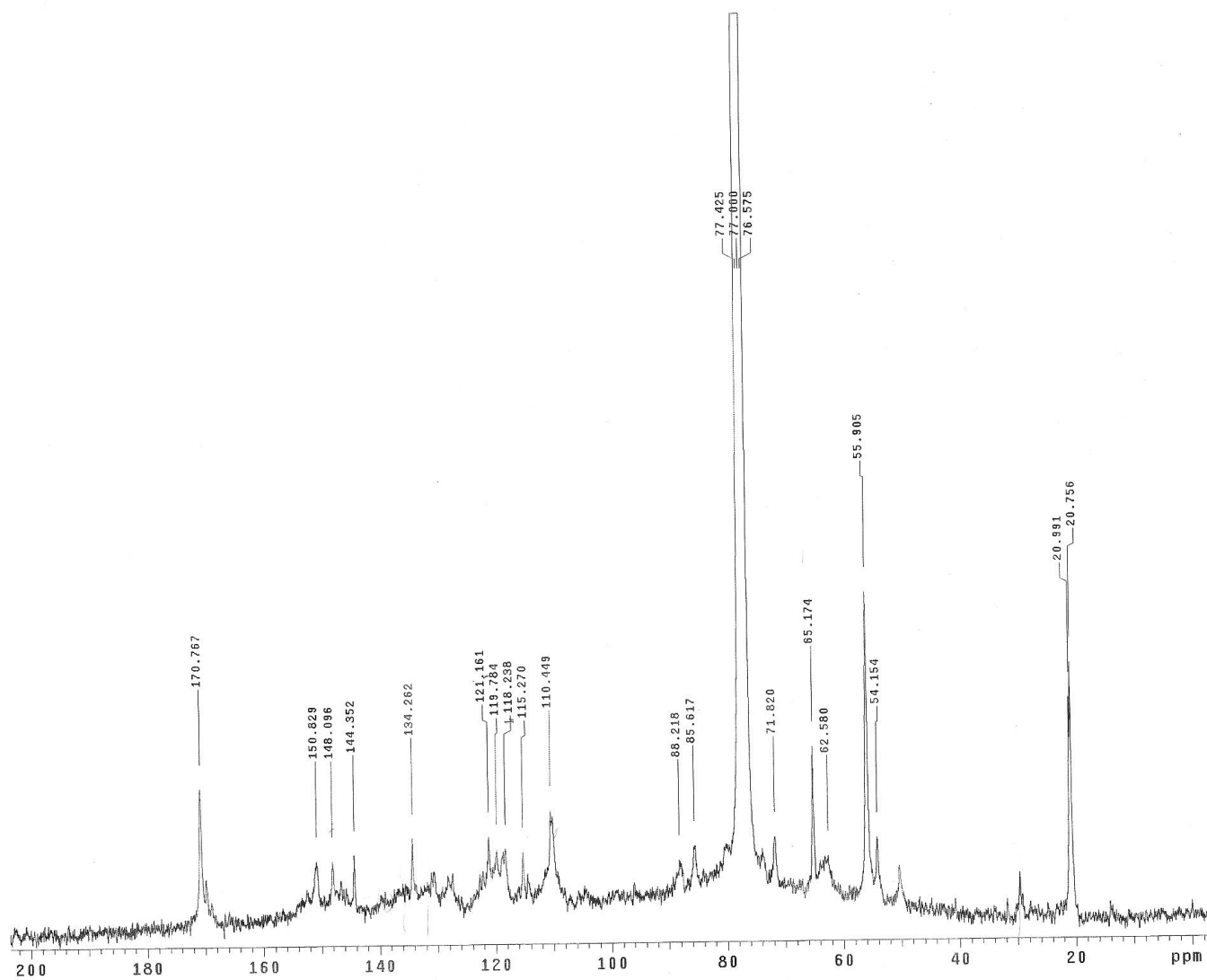


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C da DHP2c.

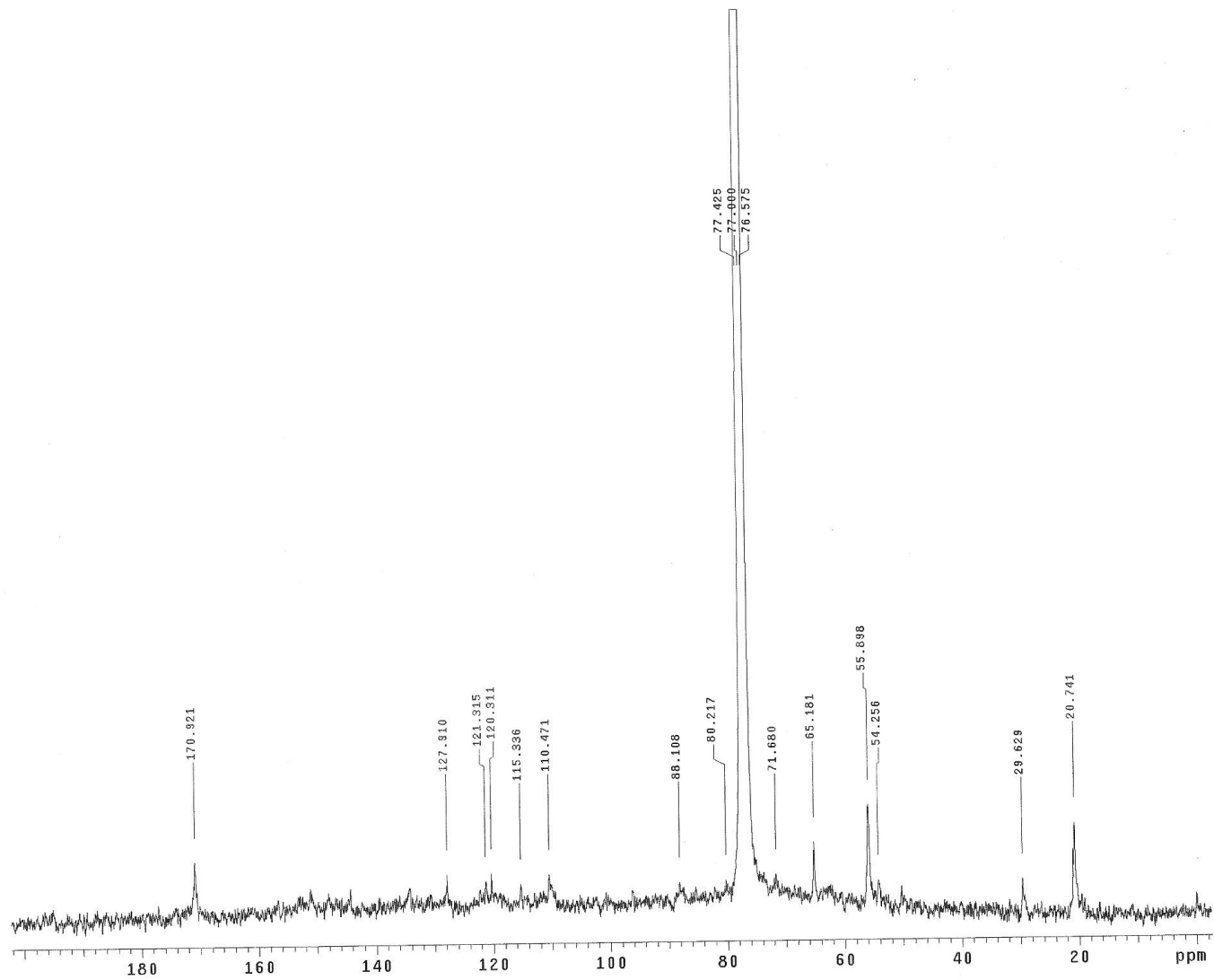


Figura 26. Espectro da RMN ^{13}C da DHP4c.

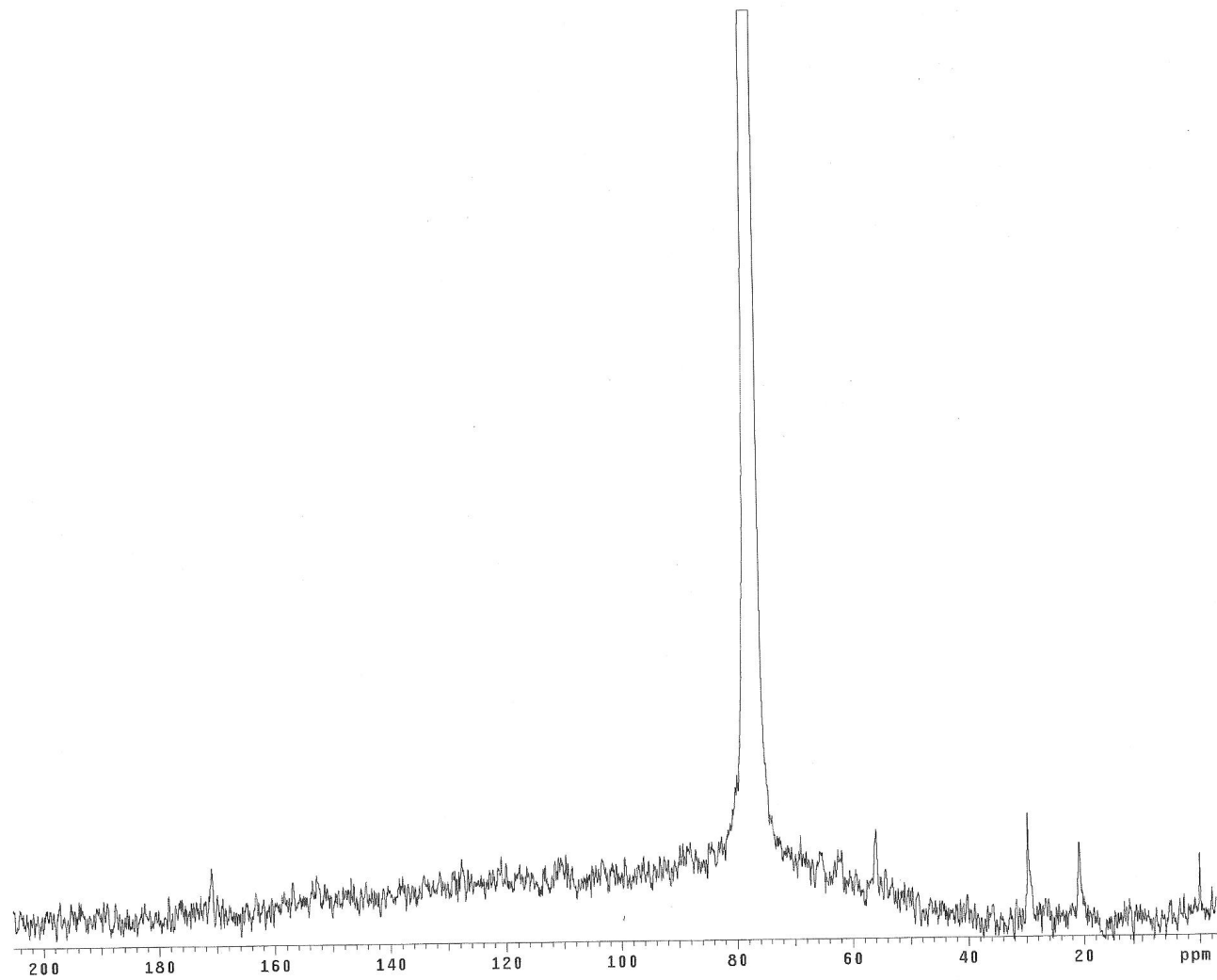


Figura 27. Espectro da RMN ^{13}C da DHP1c.

4.4.2 RMN H dos DHPs

Foi realizada também a análise da RMN H para os DHPs de todos os tratamentos (Tabela 14). Sendo a polimerização desidrogenativa sintética uma simplificação dos processos de lignificação, esta constitui uma ferramenta única para elucidar o modelo estrutural da lignina e estudar os possíveis caminhos químicos seguidos durante a biossíntese da lignina (RALPH et al., 1992; HIGUCHI, 1980) (Figuras 50 a 54, Anexo V).

O DHP4c (controle que tem um dos precursores o álcool coniferílico) teve seus sinais mais importantes **69,71ppm** (Hidrogênio aromáticos), **4,72ppm** (Hidrogênio em posição beta de estruturas β -O-4) e **3,85ppm – 3,92ppm** (Hidrogênio metoxílicos) (Figura 28).

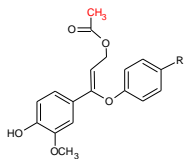
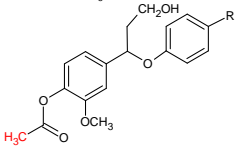
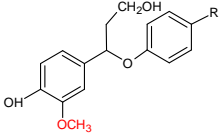
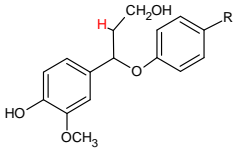
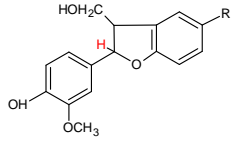
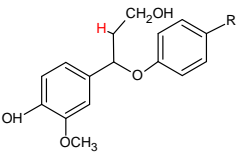
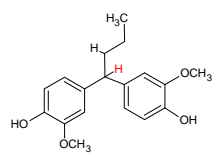
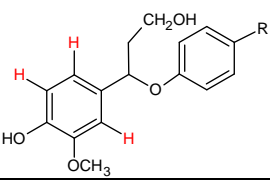
Na formação do DHP2c (Colchão MS + ANA e precursores conforme Tabela 12) com colchão enriquecido de auxina apresentou uma funcionalidade eficiente na formação da DHPs, quando um dos precursores foi o álcool coniferílico ou álcool sinapílico.

Os sinais característicos deste tratamento DHP2c foram: **6,89ppm** (Hidrogênio aromáticos), **6,15ppm** (Hidrogênio alfa em estrutura β -O-4 / Hidrogênio alfa em estrutura β -O-1), **5,50ppm** (Hidrogênio em posição alfa em estrutura β -O-5), **4,73ppm** (Hidrogênio em posição beta de estruturas β -O-4) e **3,92ppm** (Hidrogênio metoxílicos) (Figura 29).

O DHP1c (Colchão MS + ácido jasmônico e precursores conforme **tabela 12**) teve seus sinais mais característicos em **3,86ppm** (Hidrogênio metoxílicos) e **6,90ppm** (Hidrogênios aromáticos) (Figura 30). O DHP4s (controle que tem um dos precursores o álcool sinapílico), DHP1s e DHP3s não tiveram formação.

O DHP2s teve os seus sinais característico em **3,53ppm – 3,79ppm** (Hidrogênio metoxílicos) e **6,75ppm** (Hidrogênio aromáticos) (Figura 31).

Tabela 14. Sinais, atribuições e estruturas da RMN H.

DESLOCAMENTO QUÍMICO H (ppm)	DESLOCAMENTO QUÍMICO H (LIN & DENCE, 1992) (ppm)	ESTRUTURA
1-1,34 – H contaminante	1,26 - H contaminante	-
2,03-2,12 – Acetato Alifático	2,01– Acetato Alifático	
2,31 – Acetato Aromático	2,28 – Acetato Aromático	
3,85 – 3,92 – Hidrogênio metoxílicos	3,81 – Hidrogênio metoxílicos	
4,10 –4,38 - Hidrogênio de Várias Estruturas	4,27–4,30 - Hidrogênio de Várias Estruturas	-
4,72 – Hidrogênio em posição beta de estruturas β-O-4	4,65 - Hidrogênio em posição beta de estruturas β-O-4	
5,50 – Hidrogênio em posição alfa em estrutura β-O-5	5,49 - Hidrogênio em posição alfa em estrutura β-O-5	
6,15 - Hidrogênio alfa em estrutura β-O-4 / Hidrogênio alfa em estrutura β-O-1	6,06 - Hidrogênio alfa em estrutura β-O-4 / Hidrogênio α em estrutura β-O-1	
6,91 – Hidrogênio Aromáticos	6,93– Hidrogênio Aromáticos	
		

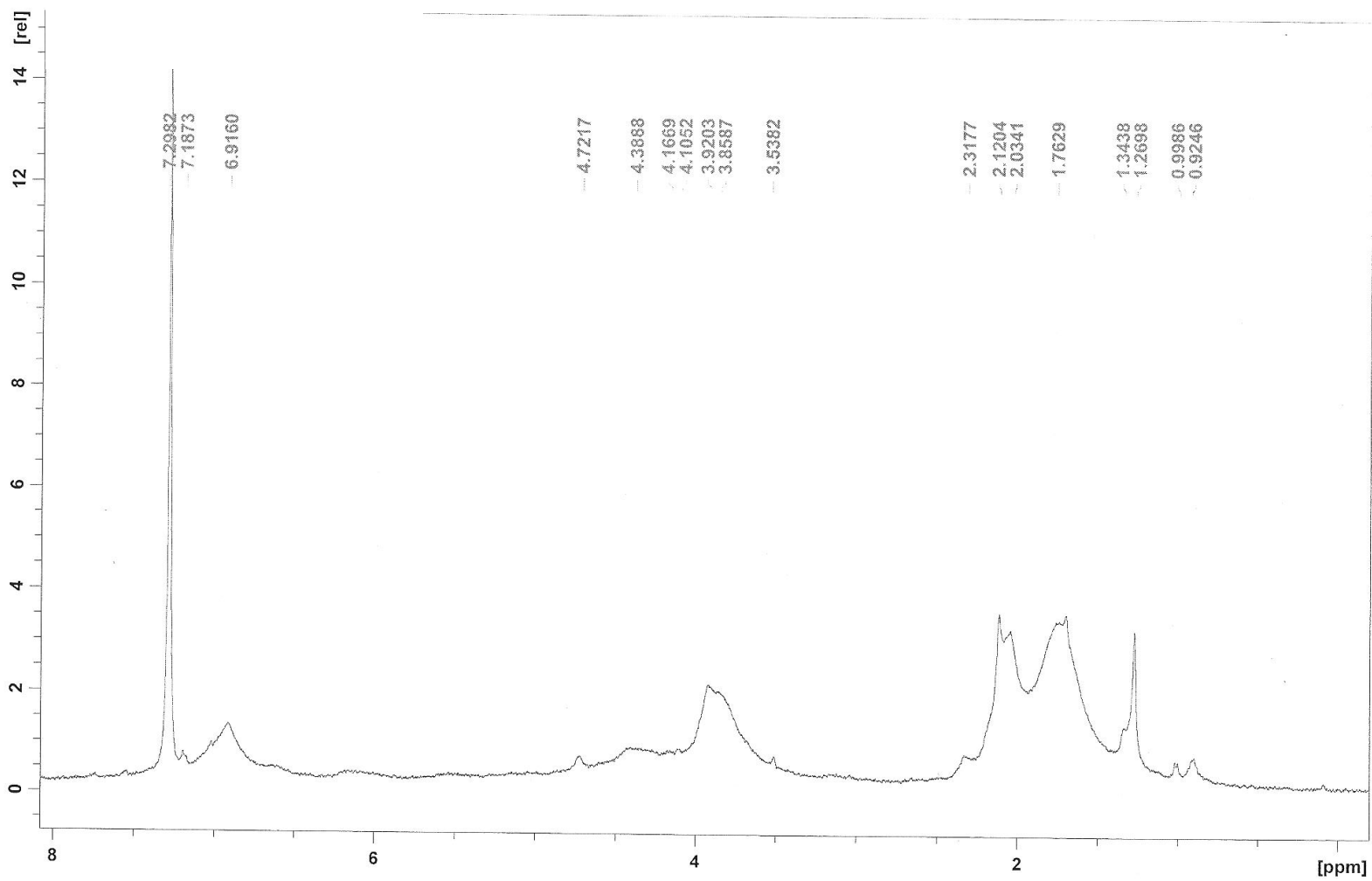


Figura 28. Espectro da RMN H do DHP4c.

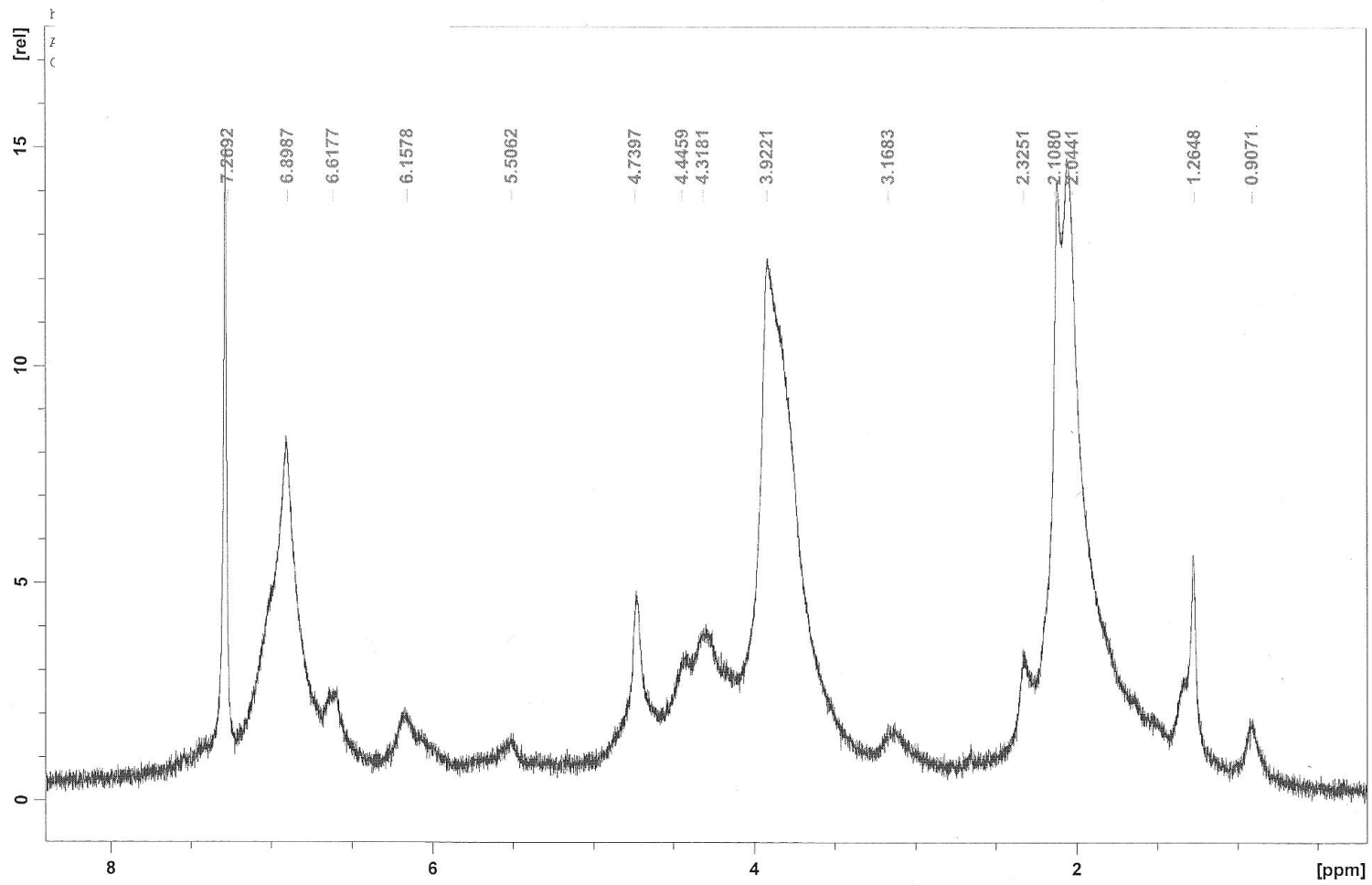


Figura 29. Espectro da RMN H do DHP2c.

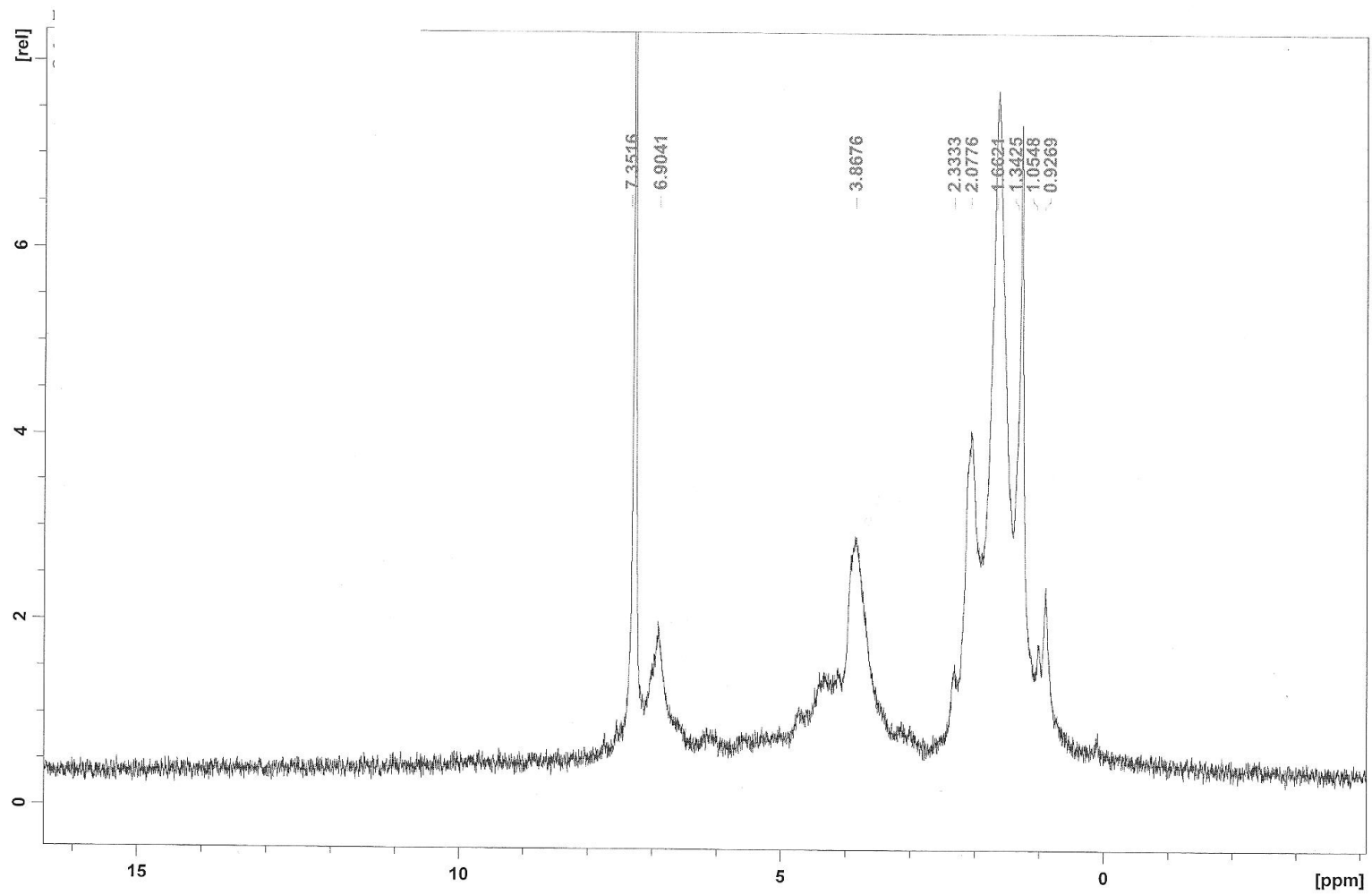


Figura 30. Espectro da RMN H do DHP1c.

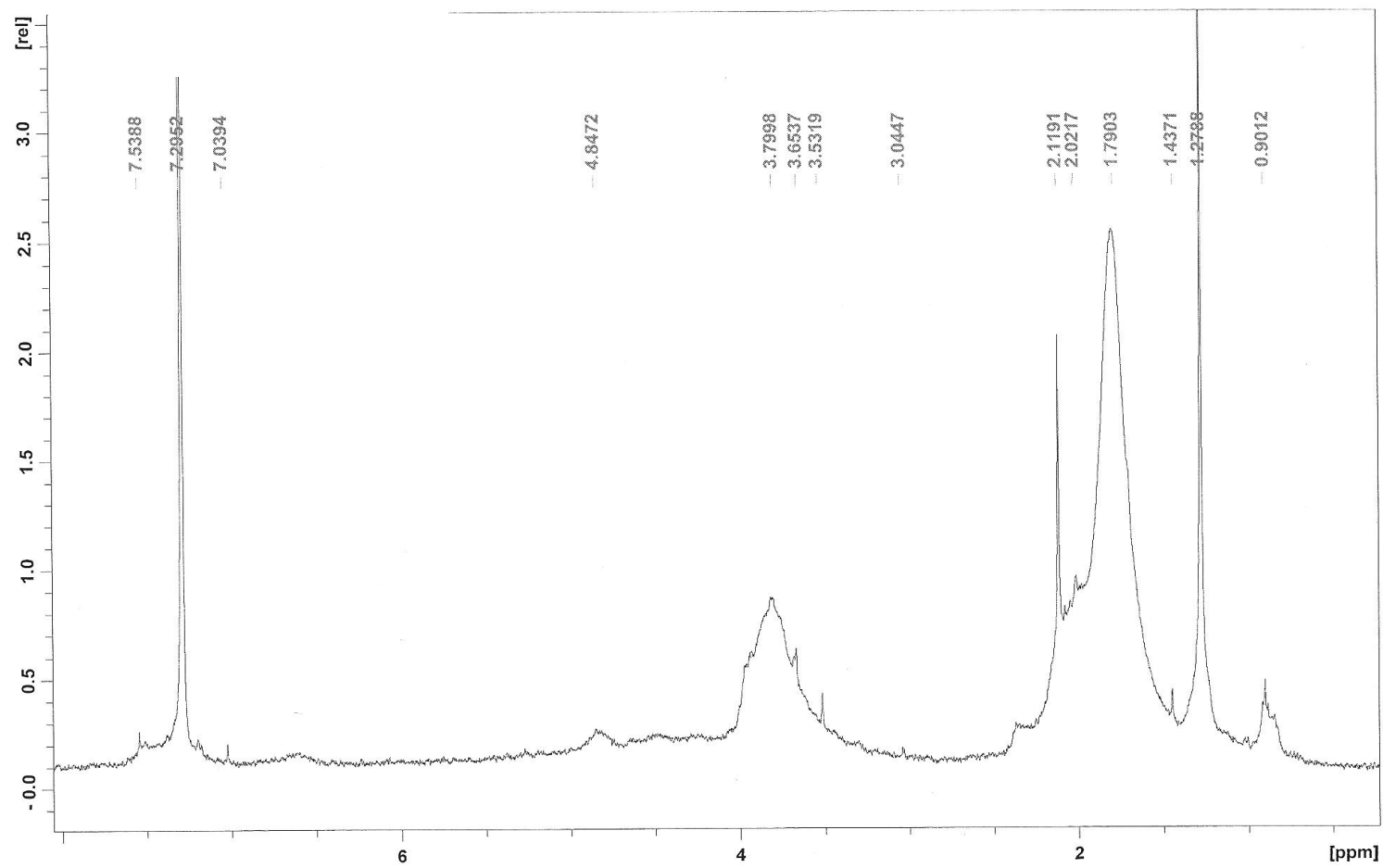


Figura 31. Espectro da RMN H do DHP2s.

4.4.3 RMN H dos DHPs dos subtratamentos dos filtrados da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*

Foram realizados para estes filtrados espectros de RMN H que não apresentou claramente sinais característicos de DHP. Alguns sinais típicos de lignina podem ter sido suprimidos em decorrência da baixíssima concentração de material fenólico na mistura analisada (Figuras 58 a 68, Anexo VII).

4.4.4 RMN H da lignina extracelular dos filtrados da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*

Os resultados dos espectros dos tratamentos (URO11e, URO21e, URO31e e URO41e) do meio extracelular do filtrado, no quais, não foram realizados subtratamentos e sim analisados depois da separação por filtração em milipore. Os espectros detectaram a presença de lignina extracelular (Figuras 32, 33, 34, 35 e 36).

Nos tratamentos realizados podemos observar alguns sinais característicos de lignina como: **6,23-7,30ppm** (Hidrogênio alfa em estrutura β -O-4 / Hidrogênio alfa em estrutura β -O-1); **3,74-3,83ppm** (Hidrogênio metoxílicos) e **4,72ppm** (Hidrogênio em posição beta de estruturas β -O-4).

4.4.5 RMN ^{13}C dos DHPs da lignina extracelular dos filtrados da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*

As amostras dos tratamentos dos filtrados da suspensão celular não foram suficiente para confirmar a presença de lignina extracelular através da RMN ^{13}C , porém foram analisadas e confirmadas através do teste Wiesner, UV e RMN H (Figuras 69 a 72, Anexo VIII).

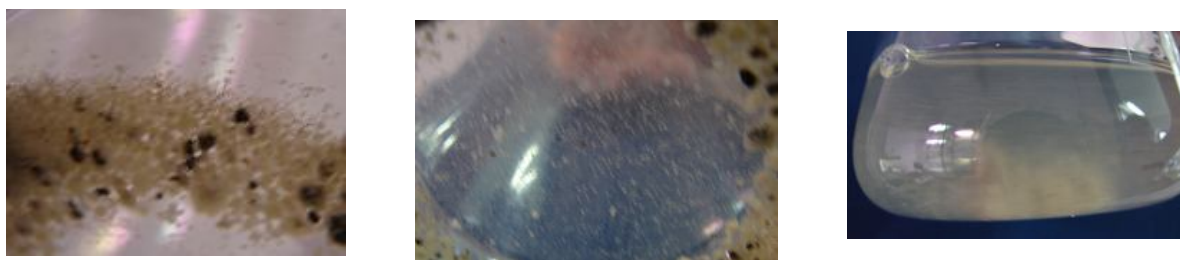


Figura 32. a) Células em suspensão de *Eucalyptus urophylla*
b) Visão da lignina extracelular no meio em suspensão
c) Névoa formada pela lignina extracelular com Erlenmeyer em movimento

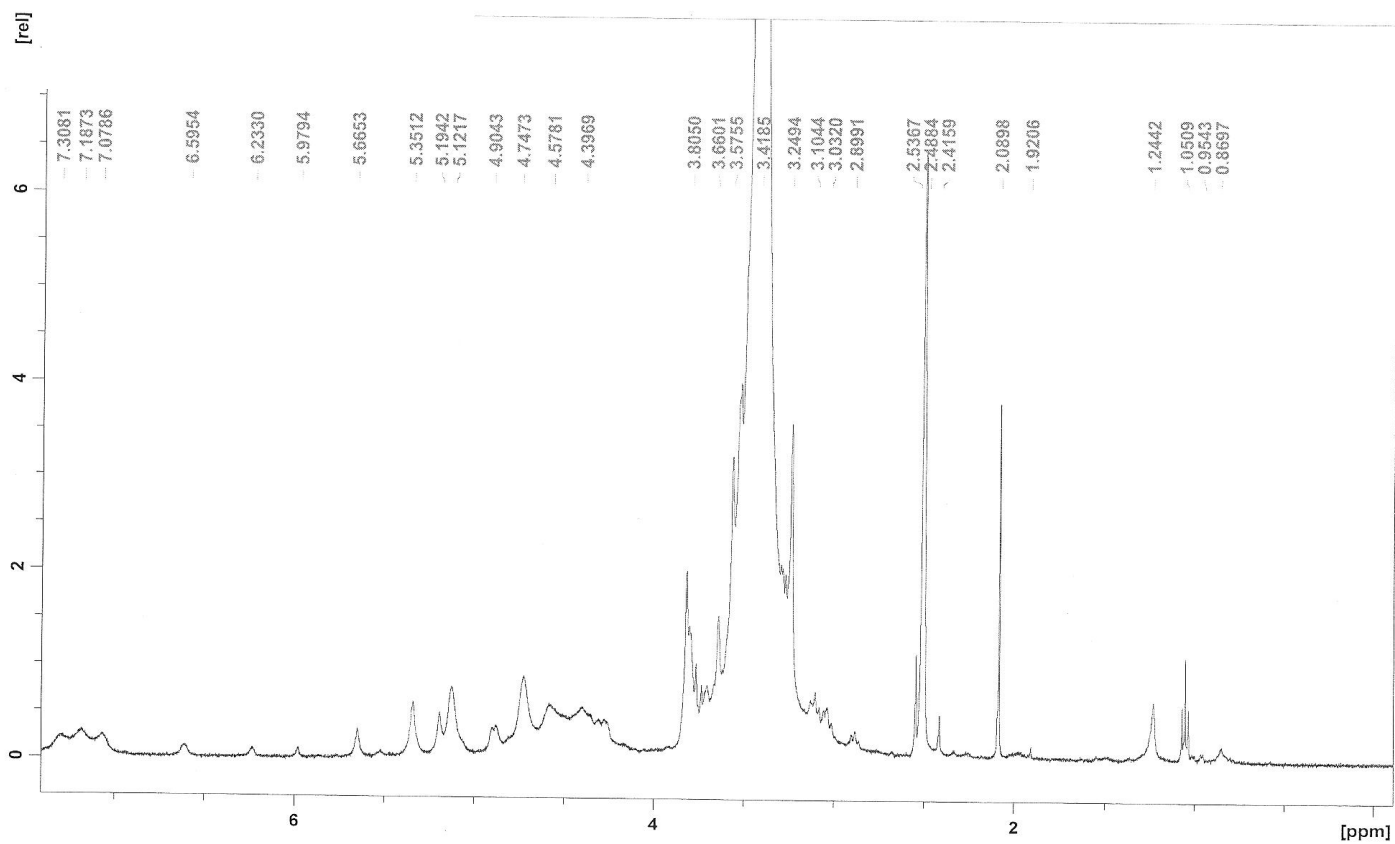


Figura 33. Espectro da RMN H do URO11e.

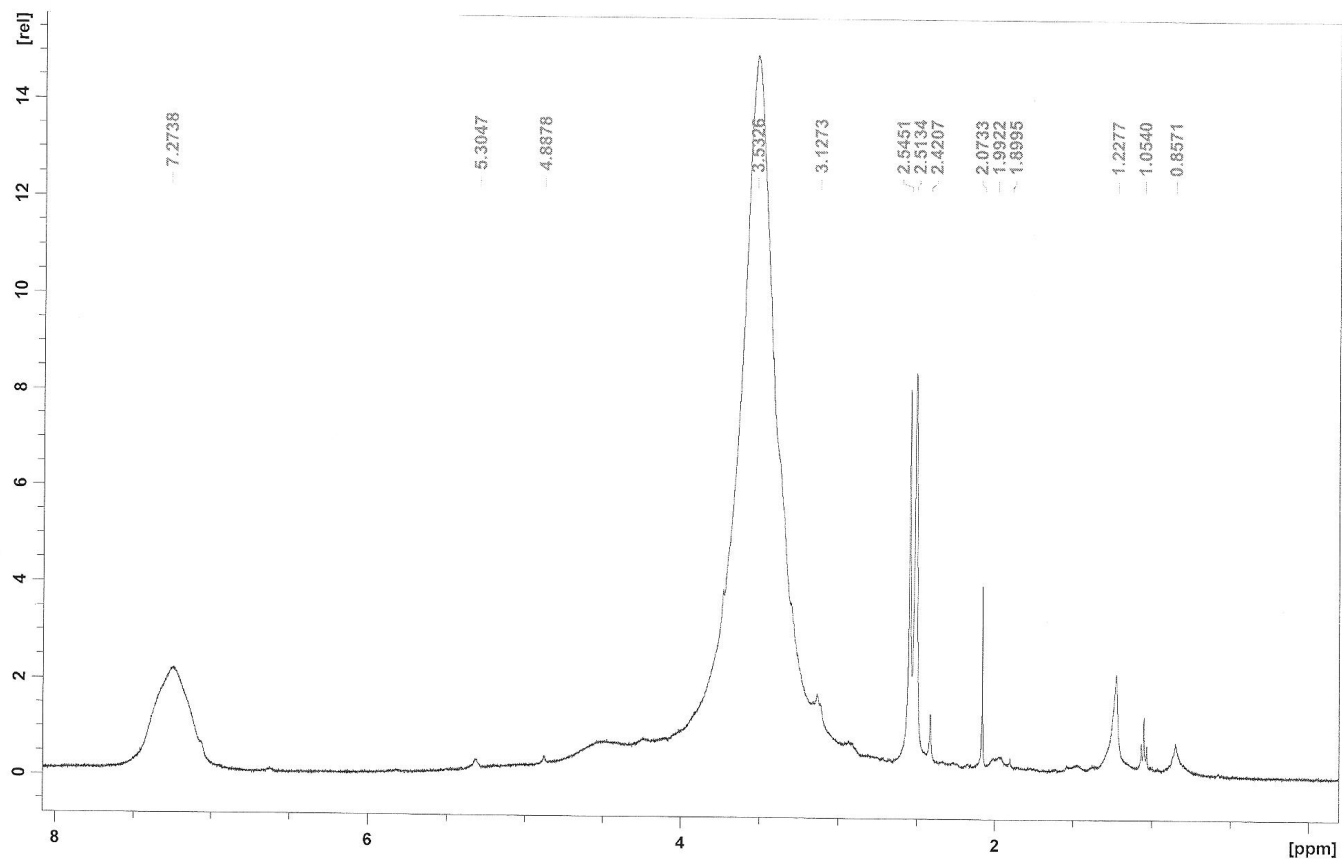


Figura 34. Espectro da RMN H do URO2le.

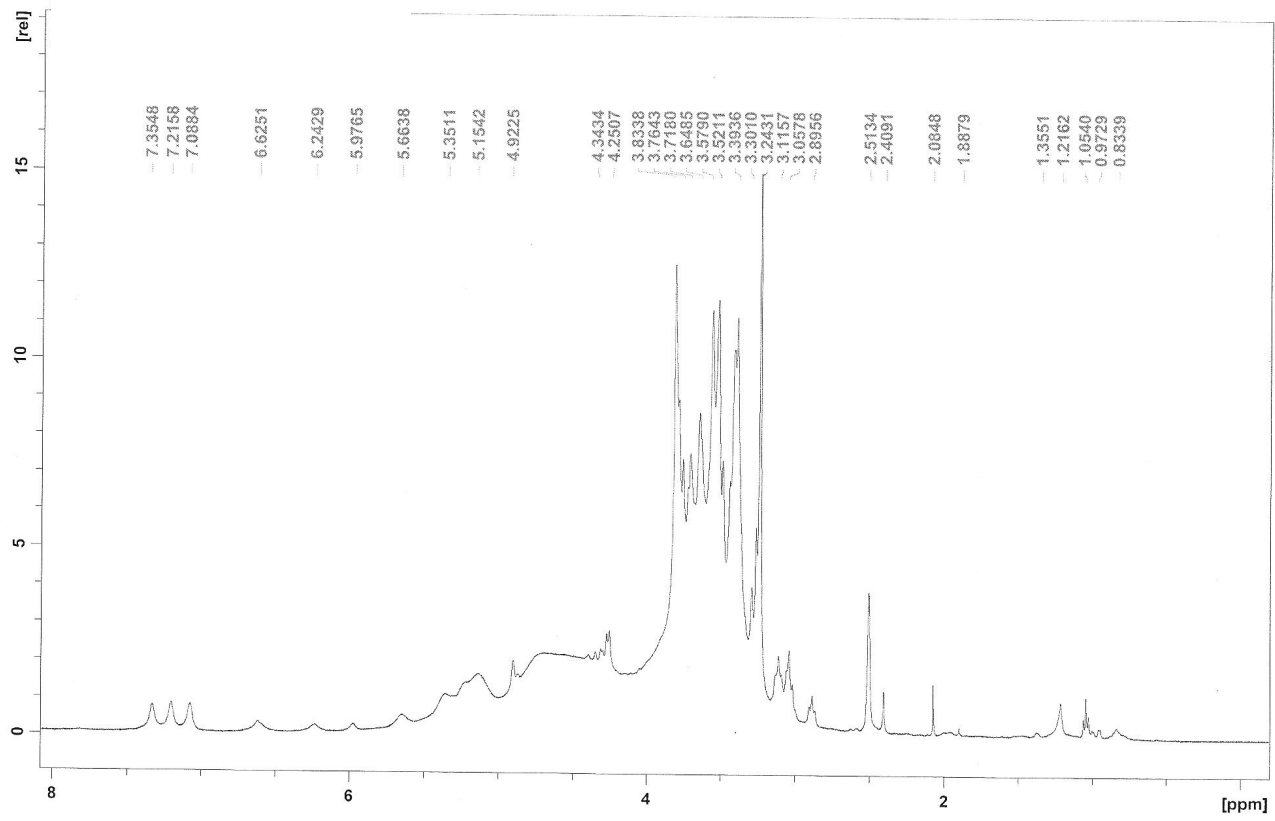


Figura 35. Espectro da RMN H do URO3le.

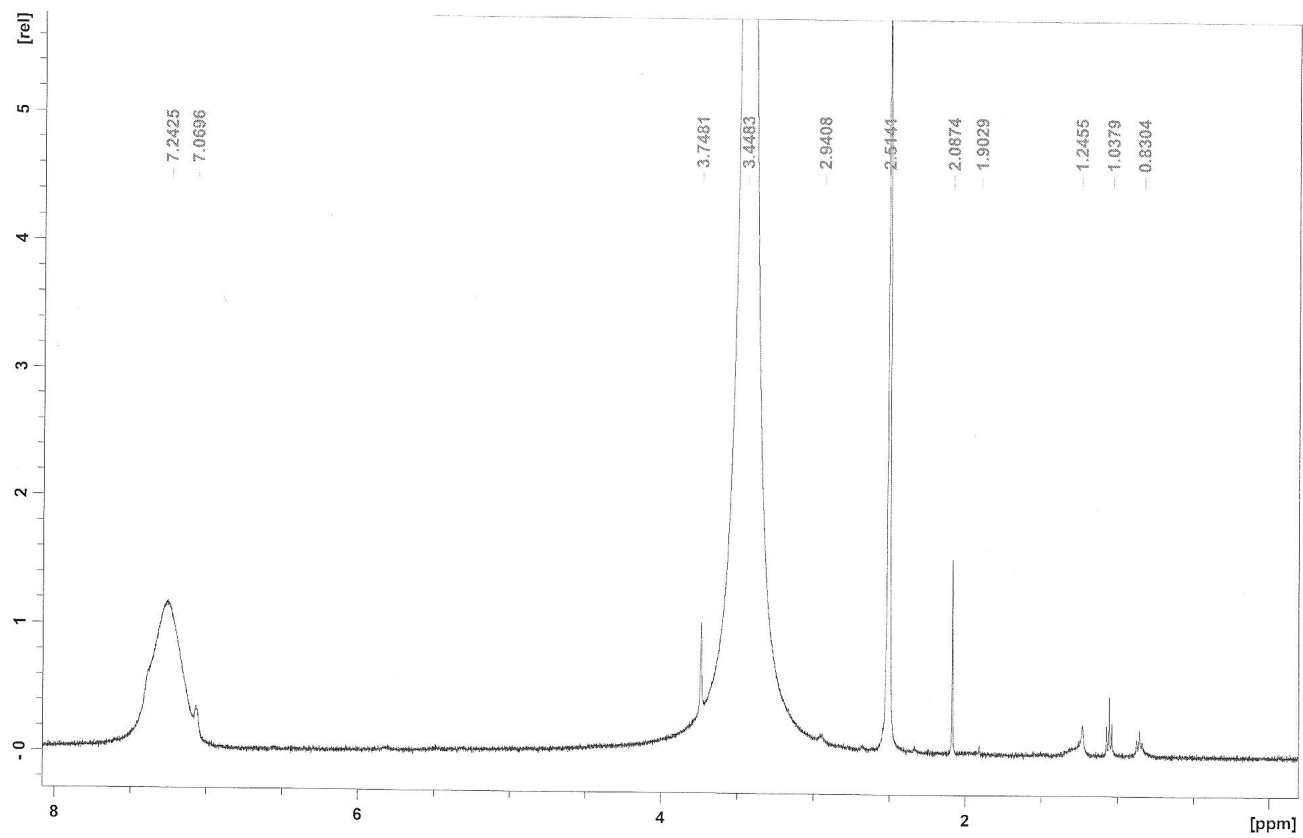


Figura 36. Espectro da RMN H do URO4le.

4.5 Infravermelho dos DHPs dos subtratamentos dos filtrados da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES & FASCIO, 2004).

No infravermelho a análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornece, através de um simples exame do espectro e consulta a tabelas de dados, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula. Esta técnica baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais) (BARBETTA & MAGINI, 2007).

Os tratamentos realizados em meio líquido da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla* (URO1, URO2, URO3 E URO4), quando coletada as repetições, foram filtradas em filtro milipore para a separação das duas partes, tendo a primeira parte as células em suspensão de *Eucalyptus urophylla* e a segunda parte o filtrado.

A partir destes filtrados, foram realizados subtratamentos para cada tratamento (URO1, URO2, URO 3 e URO4). Estes subtratamentos foram realizados para analisar quais os possíveis precursores que foram liberados no meio extracelular do caminho biossintético da lignificação (Tabela 15) (Tabela 20, Anexo III).

Tabela 15. Nomenclatura utilizada nos subtratamentos do filtrado da suspensão celular para produção dos DHPs.

Tratamentos	Precursos
URO1fh	MS + H ₂ O ₂
URO1fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO1fp	MS + Peroxidase
URO2fh	MS + H ₂ O ₂
URO2fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO2fp	MS + Peroxidase
URO3fh	MS + H ₂ O ₂
URO3fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO3fp	MS + Peroxidase
URO4fh	MS + H ₂ O ₂
URO4fhp	(MS + H ₂ O ₂) + (MS + Peroxidase)
URO4fp	MS + Peroxidase

Nota: URO1 (MS + ácido jasmônico); URO2 (MS + ANA- ácido α -naftalenoacético); URO3 (MS + Sacarose) e URO4 (MS).

Os resultados da análise de IV dos subtratamentos do filtrados não tiveram a presença de alguns sinais característicos da lignina, por exemplo, 1500 cm^{-1} como pode-se observar no tratamento URO1fp (Figura 37). Constatando desta forma que não houve formação de DHP (Figuras 38 a 49, Anexo IV).

Os filtrados da suspensão celular utilizados para formar os subtratamentos foram elicitados com reguladores de crescimento + MS (ácido jasmônico e ANA), sacarose + MS e MS sem eliciador. As células de *Eucalyptus urophylla* produzidas liberaram substâncias para o meio celular que podem ter inibido a formação dos DHPs.

Os subtratamentos utilizados podem ter causado um efeito inibitório nas concentrações utilizadas ou foram insuficientes para produção de DHPs (Tabela 14).

No subtratamento URO1fp pode-se observar a presença de sinais 1655 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} , 1227 cm^{-1} e 1066 cm^{-1} , que não são característicos da lignina ou DHP, que são $1505\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$ representando a vibração do esqueleto aromático, $1325\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ com a atribuição da respiração do anel siringílico e $1266\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$ com a atribuição da respiração do anel guaiacílico de acordo com ABREU (1995).

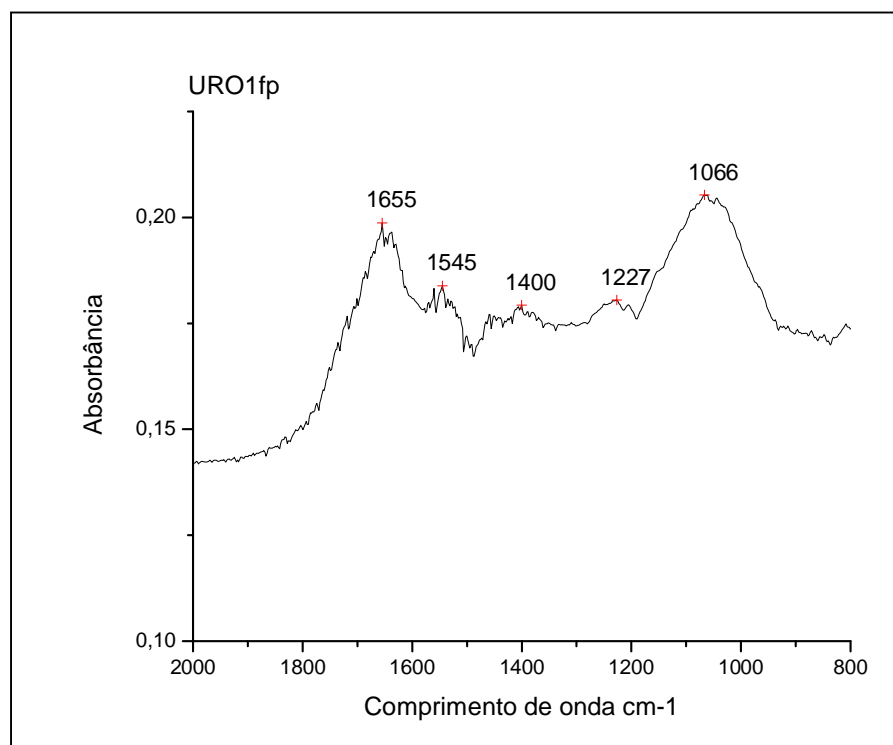


Figura 37. Infravermelho do tratamento URO1fp do filtrado da suspensão de *Eucalyptus urophylla*.

No entanto, JOSELAU & RUEL (1997) conseguiram sintetizar três DHPs *in vitro* por polimerização dos monolignóis correspondente catalisada por uma solução tampão na presença de peróxido de hidrogênio e os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, sendo adicionado simultaneamente por 120 horas. Assim, um homopolímero de G (G-DHP), um homopolímero de H (H-DHP), e um polímero misturado de GS (GS-DHP) foi obtido,

respectivamente, da polimerização de álcool coniferílico, álcool cumarílico e de uma mistura dos álcoois coniferílico e sinapílico com predomínio do álcool sinapílico. Neste trabalho os autores não utilizaram como precursor a peroxidase.

5. CONCLUSÕES

- Os melhores protocolos formulados para a produção de calos de textura friável de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake foram suplementados com os reguladores de crescimento AIA (EU20 e EU21), TDZ (EU12 e EU13) e AIA + TDZ (EU9 e EU10) na sua forma isolada e conjugada;
- Os protocolos EU2 (AIA + TDZ), Eu6 (ANA + TDZ), EU14 (TDZ), EU15 (TDZ) e EU19 (AIA) apresentaram calos semifriáveis;
- Os calos tiveram textura compacta foram os protocolos que foram suplementados com o regulador de crescimento AIA na suas menores concentrações: EU16 (0,37 μM), EU17 (0,55 μM) e EU18 (1,1 μM);
- O protocolo EU1 (AIA + TDZ) mesmo utilizando a mesma concentração de citocinina do EU2 (AIA + TDZ), porém uma concentração menor de auxina induziu calos com textura semicompacta;
- Situação inversa dos protocolos EU7 e EU8 com textura semicompacta; quando nos protocolos EU9 e EU10 foi mantido as mesmas concentrações de auxina, mas a concentração de citocinina (TDZ) aumentou houve indução de calos friáveis.
- O único protocolo utilizando citocinina (TDZ) na sua menor concentração 2 μM (EU11) teve textura semicompacta;
- Nos protocolos EU3 (2,4-D + TDZ) e EU5 (ANA + TDZ) tiveram calos compactos;
- O único protocolo que não induziu a formação de calo foi o EU3 suplementados com 30 μM 2,4-D + 2 μM TDZ;
- O meio de suspensão celular de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake pelo teste Wiesner confirmou a presença de substâncias fenólicas;
- A sacarose (URO3c) foi a que mais induziu a lignificação na parede das células em suspensão, obtendo 361,98ppm, 53% a mais de lignina do que o controle (URO4c);
- Os reguladores de crescimento usados também como elicitores o ANA (URO2c) e o ácido jasmônico (URO1c) também aumentaram a taxa de lignificação da parede das células em suspensão, em 303,24ppm (28% a mais que o controle) e 282,9ppm (20% a mais que o controle) respectivamente;

- O elicitor que mais induziu a célula a liberar precursores para a formação da lignina extracelular foi a sacarose (URO3le) com 108,55ppm, sendo 55% a mais do que o controle URO4le);
- Os elicitores, ácido jasmônico e ANA (reguladores de crescimento) também elicitaram as células a liberarem precursores para o meio em suspensão para formação da lignina extracelular, tendo o URO1le 78,29ppm e o URO2le 89,55ppm, com uma taxa de lignificação de 12% e 28%, respectivamente;
- As DHP1c, DHP2c e DHP4c foram sintetizadas com o precursor álcool coniferílico, H₂O₂ e peroxidase;
- A sacarose na formação das DHPs teve uma ação inibitória tanto quando o precursor foi o álcool coniferílico, como quando foi o álcool sinapílico;
- A DHP2s foi a única sintetizada que teve como precursor o álcool sinapílico, H₂O₂ e peroxidase;
- Através das análises de IV e RMN H foi constatado que não houve formação de DHPs dos subtratamentos do filtrado da suspensão celular;
- As análises de RMN induziram a formação de lignina extracelular em todos os tratamentos: URO1, URO2, URO3 e URO4; e
- Todos os elicitores utilizados tiveram uma resposta positiva em relação a taxa de lignificação celular, quanto a indução da formação da lignina extracelular, inclusive o controle.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento do mecanismo de formação da lignina ainda requer muitas pesquisas de natureza teórica e experimental. A ativação e desativação de enzimas do caminho biossintético da lignina tem demonstrado através de vários estudos com sucesso, que é possível modelar a formação da lignina de acordo com a sua finalidade. Pesquisas com reguladores de crescimento em mudas de *Eucalyptus* spp. como demonstraram Pereira (2005) e Monteiro (2005) pode ser uma linha para futuras pesquisas relacionando aumento e diminuição do teor da lignina.

Novas perspectivas com cultura de células de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake surgem como uma maneira eficaz para o entendimento da biossíntese da lignificação. Através de novas visões bioquímicas sobre a formação da lignina permitindo ajustar a quantidade lignínica nas plantas como também modificar a arquitetura molecular e sua deposição nos diferentes locais da parede celular.

O completo entendimento das propriedades químicas da parede celular, incluindo a via de biossíntese da lignina em níveis bioquímicos e moleculares, relacionado com a espessura e resistência da parede, na determinação da composição e teor de lignina, contribui com potencial uso nos mais diversificados setores.

A utilização da biotecnologia através da cultura de tecidos na produção de plantas *in vitro* vem sendo desenvolvida há muitas décadas, com diversas aplicações tanto para o estudo da biossíntese de metabólitos secundários e melhoramento genético de plantas, podendo também ser uma ferramenta biotecnológica que pode e deve interferir diretamente em estudos comparativos para desenvolvimento de tecnologias para o uso florestal, através da interação da fisiologia e bioquímica de hormônios em plantas lenhosas *in vitro* para o esclarecimento das diversas rotas envolvendo inclusive mecanismos no controle da planta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. dos S. **Biossíntese de Lignificação**, UFRRJ, Itaguaí, 63p., 1994.

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.

ABREU, H. S., NASCIMENTO, A. M. & MARIA, M. A. Lignin structure and wood properties, Wood and Fiber Science, v. 31, n. 4, 426-433, 1999.

ABREU, H. S.; MAÊDA, J.; LATORRACA, J. F.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, F.; CARMO, J. Proposta de modificação da biossíntese da lignina como estratégia para correção de defeitos em madeiras. **Silva Lusitana**, V.11, n.2, p.217-225, 2003.

ABREU, S.H. Determinação do teor de lignina por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier para as madeiras de *Lophantera lactescens*, *Gallesia gorazema*, *Peltogyne paniculata*, *Aspidosperma macrocarpum* e *A. polyneuron*. **Revista Universidade Rural, Série Ciência da Vida**. V.17, n.1, pp.45-49, 1995.

ABREU, S.H.; LATORRACA, J. V. F.; PEREIRA, W. P. R.; MONTEIRO, M.B.O.; ABREU, F.A.; AMPARADO, K.F. A supramolecular proposal of lignin structure and its relation with the wood properties. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n.1, 1-6, 2009.

ADLER, E.; BJÖRKQUIST, J.; HAGGROTH, S. Über die Ursache der Farbreaktionen des Holzes. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, Denmark, V.2, p.93-94, 1948.
AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, Academic Press, San Diego, 635p. 1997.

ALBARRÁN, J. G.; VIELMA, M.; CONTRERAS, I. G. Cultivo *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King.: estudio de condiciones óptimas para la regeneración y transformación genética. **Revista Forestal Venezolana**, v. 41, n. 2, p. 111-118, 1997.

ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G., O'NEILL, M.A., SCHOLS, H.A. & VORAGEN, A.G.J. **A hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants**. Editores J. VISSER & A.G.J. VORAGEN, Elsevier Science. p.47-55, 1996.

ALLINA, S. M; PRI-HADASH, A; THEILMANN, D. A; ELLIS, B. E; DOUGLAS, C. J. 4- Coumarate: coenzymeAligase in hybrid poplar. **Plant Physiology**. 116:743–54, 1998.
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.

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação in vitro de *Euclyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p.1715-1719, 2006.

ANTEROLA A.M. & LEWIS N.G. Trends in Lignin Modification - a Comprehensive Analysis of the Effects of Genetics Manipulations-Mutations on Lignification and Vascular Integrity. **Phytochemistry**, v.61, p.221–294, 2002.

ANTEROLA AM, JEON J-H, DAVIN LB, LEWIS NG. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. **Journal Biology Chemistry**. 277:18272–80, 2002.

ARGYROPOUPOS, D.S.; MENACHEM, S.B. Lignin. **Adv. Bloch Enc Biotech**, v. 57, p. 127-158, 1997.

BARBETA, C.M. & MAGINI, M.R. Espectros eletromagnéticos na região do infravermelho: utilização na caracterização de novos materiais. **Anais do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**. 2007.

BARRUETO CID, L.P.; GOMES, A.C.M.; COSTA, S.B.R; TEIXEIRA,J.B. Micropropagation of *Miconia* sp, a woody Melastomataceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.9, pp.21-25, 1997.

BARRUETO CID, L.P.; ILLG, R.D.; PIDRABUENA,A.F. Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., cv. “ Chonan”) via cell culture in liquid medium. **In Vitro Cell Developmental Biology**, v.30, pp.150-155, 1994.

BARRUETO CID, L.P.; MACHADO, A.C.M.G; CARVALHEIRA,S.B.R.C.; BRASILERIO, A.N.M. Plant Regeneration from seedling explants of *Eucalyptus garmdis* x *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 56, pp.17-23, 1999.

BATE NJ, ORR J, NI W, MEROMI A, NADLER- HASSAR T. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in

transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.91, p.7608–12, 1994.

BERNARDS, M. A.; LEWIS, N. G. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. **Phytochemistry**. v.47, n.6, pp.915-33, 1998.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant Tissue Culture: Theory and Practice**. Amsterdam: Elsevier, 767p., 1996.

BIDLACK, J.; MALONE, M. & BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**. v.72, p.51-56, 1992.

BOATRIGT, J; NEGRE, F; CHEN, X; KISH, C. M; WOOD, B; PEEL, G; ORLOVA, I; GANG, D; RHODES, D; DUDAREVA, N. Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in Petunia Petal Tissue **Plant Physiology**. v.135, pp.1993-2011, 2004.

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

BOHM H, RINK E. BETALAINES. In: Constabel F, Vasil I, editors. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**, vol. 5. New York: Academic Press, pp. 449–63, 1988.

BORÉM, A . **Melhoramento de Plantas**. Editora: UFV, 500p. 2001,

BOSISIO, B.M. **Avaliação de Tendências Evolutivas Vegetais Via Quantificação Lignínica**. Dissertação de mestrado. FIOCRUZ, Brasil, 148 p., 1996.

BOTTA, B; SILVESTRINI, A; VITALLI, A & MONACHE, GD. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Eds.). **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Capeco: Argos, p.354-79, 2001.

BOUDET, A. & CHABANNES, M. Gains achieved by molecular approaches in the area of lignification **Pure Applied Chemistry**, v.73, n. 3, p. 561–566, 2001.

BOUDET A. M. Towards an understanding of the supramolecular organisation of the lignified wall. In: Rose JKC (ed) **The Plant Cell Wall**, 1st edn. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2003.

BOULAY, M. P.; GUPTA, P.K.; KROGSTRUP, P. & DURZAN, D. J. Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* Karst.). **Plant Cell Report**, v.7, pp. 134-137, 1988.

BROWN, R. M. Jr.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends Plant Scienc.** v.1, p.149-156, 1996.

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.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plants Physiologists. p.1367, 2000.

BURLAT, V.; KWON, M.; DAVIN, L. B. & LEWIS, N. G. Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. **Plant Physiology**, v.6, p. 803-1042, 2001.

BUSAM, G.; JUNGHANNS, K.T.; KNEUSEL, R.E.; KASSEMAYER, H.H.; MATERN, U. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme a 3-O-methyltransferase proposed for the induce 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 in *Vitis vinifera* L. Responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. Plant Physiology, v.115, p.1029-1038, 1997b.

CALDAS, L.S. **Micropropagação de Plantas do Cerrado**. Anais do Congresso Nacional de Botânica, 47, 1996, Nova Friburgo. Nova Friburgo, RJ, p.22, 1996.

CALDAS, L.S.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M. E. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, v.1, 509p. 1998.

CARVALHO, E.C.S. **Antioxidantes, Reguladores de Crescimento e Estresse Térmico na embriogênese Somática de *Eucalyptus* spp.** Tese de Doutorado. UFV. 114p., 2007.

CARVALHO, J.M.F.C. de. **Técnicas de Micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 39p. (Embrapa Algodão. Documentos, 64), 1999.

CASSAB, G. I. Plant cell wall proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.49, p.281-309, 1998.

CASSAB, G. I. & VARNER, J. E. Cell wall proteins. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.49, p.281-309, 1988.

CELEDÓN, P. A. F.; KOBAYASHI, A. K.; VIEIRA, L. G. E. Utilização de nutrientes por células de algodoeiro cultivadas em suspensão. **Scientia Agrícola**. v.57, n.3. p. 431-437, 2000.

CHEN, F; KOTA, P; BLOUNT, J. W; DIXON, R. A. Chemical synthesis of caffeoyl and 5-OH coniferyl aldehydes and alcohols and determination of lignin *O*-methyltransferase activities in dicot and monocot species. **Phytochemistry**, V.58, p.1035–42, 2001.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **Hort Science**, v.23, 515-519, 1988.

COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, v.2, n.9, p.351-356, 1997.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Review Molecular Cell Biology**. v.6, p.850–61, 2005.

COSTA, M. E. L. ; RAPOSO, S. Reactores para cultura de células vegetais. **Edições Técnicas**, p. 15, 2004

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal – Parte I: Células e Tecidos**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 308 p., 1986.

DARLEY, C.P.; FORRESTER, A. M. AND MCQUEEN-MASON, S. J.. The molecular basis of plant cell wall extension. **Plant Molecular Biology**, v.47, p.179–195, 2001.

DAVIES, P. J. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: DAVIES, P. J. (Ed.) **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2.ed. Estados Unidos, Kluwer Academic Publishers, Cap.1, p.1-12, 1995.

DAVIES, P.J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology** (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 1995.

DAVIN, L. B. E LEWIS, N. G. **Phenolic metabolism in plants**, Plenum Press, New York, p.325. 1992.

DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Lignin and lignan biochemical pathways in plants: an unprecedented discovery in phenolic coupling. **Ann. Acad Bras Cienc Suppl** v.67, p.363–378, 1995.

DAVIN, L. B.; WANG, H. B.; CROWELL, A. L.; BEDGAR, D. L.; MARTIN, D. M.; SARKANEN, S.; LEWIS, N. G. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. **Science**, v.275, p.362-366, 1997.

DAVIN, L., B. & LEWIS, N.G. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis, Plant Physiology. v.123, p.453-462, 2000.

DAVIN B.L., LEWIS G. N. Lignin primary structures and dirigent sites. Current Opinion Biotechnology, v.16, n.4, pp.407-15, 2005.

DEUS, N.B.S., ZENK, M.H. Exploitation of plant cells for the production of alkaloids in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. **Planta Med**, n.50, p.427-31. 1982

DEVOTO, A.; TURNER, J. G. Regulation of Jasmonate-mediated Plant Responses in Arabidopsis. *Annals of Botany*. v.92, pp. 329-337, **2003**.

DICOSMO F, TOWERS GHN. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In: Timmerman BN, Steelink FA, Loewus FA, editors. **Recent advances in phytochemistry**, vol. 18. New York: Plenum, pp. 97-175, 1984.

DICOSMOS, F.; MISAWA, M. Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production, In: **Biotechnology Advances**. Pergamon: Grã Bretanha, v.13, n.3, p.425-453, 1995.

DIXON, R. A; CHEN, F; GUO, D; PARVATHI, K. The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid," or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, v.57, pp.1069-84, 2001.

DONALDSON, LA. Lignification and lignin topochemistry: an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v.57, pp.859-873, 2001

DURZAN, D. J. & GUPTA, P. K. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. **Plant Scienc**, v.52, pp. 199-235, 1987.

ERTOLA, R.J.; GIULIETTI, A. M.; CASTILLO, F. J. Design, formulation, and optimization of media. In: **Bioreactor System Design**. Marcel Dekker: Nova Iorque, p. 109-121, 1995,

- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Editora Edgard Blucher, 1976.
- FENGEL, D. E WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reaction**, Berlin 1 ed. Walter de Gruyter, p. 66.1984.
- FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.1794-1800, 1985.
- FOWLER, M. W. Plant cell culture: natural products and industrial application. **In: Biotechnology of Higher Plants**. Intercept: Reino Unido, p.107-158, 1988.
- FRANKE, R.; HEMM, M. R.; DENAULT, J. W.; RUEGGER, M. O.; HUMPHREYS, J. M.; CHAPPLE, C. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis. **The Plant Journal**, V.30, n.1, p.47-59, 2002.
- FREUDENBERG, K. Biosynthesis and constitution of lignin. **Nature**, v.183, p.1152-1155, 1959.
- FREUDENBERG K, NEISH AC, ed. **Constitution and Biosynthesis of Lignin**. Berlin: Springer-Verlag. 129 pp. 1968.
- FRY, S.C. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.497-520, 1995.
- FÜRDEN B. VAN, HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Report**, v.24, pp. 312–317, 2005.
- GAMBORG, O.L.; SHYLUK, J.P. Nutrition, media, and characteristics of plant cell and tissue cultures. Eds. THORPE, T.A. **Plant Tissue culture: methods and applications in agriculture**, Academic Press, p. 21-44, 1981.
- GAMBORG, O.L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R.; CONSTABEL, F. **Culture methods**. Ottawa:Saskatoon, p.1-9. 1982.
- GANG, D. R.; COSTA, M. A.; FUJITA, M.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; WANG H-B, BURLAT, V.; MARTIN, W.; SARKANEN, S.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. **Chem Biol**, v.6, p.143–151, 1999.

GARTNER, B. L. **Plant Stems: Physiology and Functional Morphology**. Academic Press Inc. 427 p., 1995.

GASSER, R., KERN, H.; DÉFAGO G. Resistance of Tobacco to *Thielaviopsis basicola* under Tissue Culture Conditions and Increased Susceptibility after Transformation with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. **Journal of Phytopathology**. v.123, n.2, pp. 105 – 114, 2008.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture - Part 1: The technology**. 2nd ed. Edington, England: Exegetics, v.2. 574 p. 1996.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture - The technology**. 2nd ed. Edington, England: Exegetics, v.1. 575 p. 1993.

GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L. Qualidade da Madeira. In: Aluizio Borém de Oliveira. (Org.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa-MG: UFV, v. Único, p. 25-54. 2007.

GOTTLIEB, O. R. BORIN, R. M. B. E BOSÍSIO, B. MLignification: an evolutionary perspective, **An. Acad. bras. Ci.**, v. 67 (Supl 3) p.355-361, 1995.

GOTTLIEB, O. R. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity, **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p.2545-2558, 1989.

GOUJON, T; SIBOUT, R; EUDES, A; MACKAY, J; JOUANIN, L. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*, **Plant Physiol Biochem**, V.41, p.677–687, 2003.

GRAÇA, M. E. C.; FILHO, A. N. K.; MEDEIROS, A. C. S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas, benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim Pesquisa Florestal**. n.43, p.107-112, 2001.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J. B. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.E.; BUSSO, J.A. (Ed.). **70 Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH. v.2, p. 533-568, 2001.

GUO, D; CHEN, F; INOUE, K; BLOUNT, J. W; DIXON, R. A. Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. **Plant Cell**, V.13, p.73–88, 2001.

GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. & FINKLE, B. J. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (Loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. **Canada Journal Forest Research**, v.17, pp1130-1134, 1987.

HAKMAN, I & von ARNOLD, S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (White spruce). **Physiology Plant**, v.72, pp. 579,587, 1988.

HAKMAN, I.; FOWKE, L. C.; von ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). **Plant Scienc**, v. 38, pp.53-59, 1985.

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

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. A organização de um laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, p.29-36, 1990.

HARDING, S.A; LESHKEVICH, J; CHIANG, V. L; TSAI, C. J. Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4- coumarate: coenzyme A ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. **Plant Physiology**, V.128, p.428-38, 2002.

HATFIELD, R. & VERMERRIS, W. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. **Plant Physiol**, v.126, p.1351-1357, 2001.

HIGUCHI, T. Biochemistry and molecular biology of wood. **Springer, 506p., 1997.**

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Sci. Technol.** 24, 23-63, 1990.

HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. In: KIRK, T. K; HIGUCHI, T.; CHANG, H. (Ed). **Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications.** Boca Raton, v. I, p. 02. 1980.

HIGUCHI, T., ITO, T., HIBINO, T. E SHIBATA, D. Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene: Wine-red lignin from coniferyl aldehyde, **Journal of Biotechnology**, n. 37, p.151-158, 1994.

HU, W. J; KAWAOKA, A; TSAI, C. J; LUNG, J; OSAKABE, K. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen *Populus tremuloides*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.95, p.5407–12, 1998.

HUMPHREYS, J. M; HEMM, M. R; CHAPPLE, C. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450- dependent monooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, V.96, p.10045–50, 1999.

HUMPHREYS, J. M. & CHAPPLE, C. Rewriting the lignin roadmap. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.224-229, 2002.

HUETTMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, n.33, pp.105–119, 1993.

JAMAL, S. **Mass propagation of *Eucalyptus tereticornis***. Msc Thesis, Dept. of Bot Univ. of Peshawar, Pakistan, 1985.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin and hemicellulose. **Biochemistry of Microbial Degradation**, p.233-277, 1994.

JONES, L.; ENNOS, A R.; TURNER, S. R. Cloning and characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin deficient mutant of *Arabidopsis*. **Plant J.** v.26, p.205–216, 2001.

JOSELAU, J.P. & RUEL, K. Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes. **Plant Physiology**. v. 114, pp.1123-1133, 1997.

JOY, I. R. W.; THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: Soh, W.Y.; BHOJWANIN. S. S. (Eds.). **Morphogenesis in Plant Tissue Cultures**. London: Kluwer Academic Publishers. pp. 171-214, 1999.

KAJITA S, KATAYAMA Y, OMOI S. Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate:CoA ligase. **Plant Cell Physiol**. V.37, p.957-651, 1996.

KAJITA, S.; HISHIYAMA, S.; TOMIMURA, Y.; KATAYAMA, Y.; OMORI S. Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate: Coenzyme A ligase is depressed. **Plant Physiology**, V.114, p.871-791, 1997.

KAVALIER, A. The effects of methyl jasmonate on the anthocyanin content and growth rates of the Wisconsin fast plants *Brassica rapa*. **Research preformed at the College of Charleston**, 2000.

KELLER, B. Structural Cell Wall Proteins , **Plant Physiolol.** v.101, p.1127-1130, 1993.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.E.; BUSSO, J.A. (Ed.). 70 **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH. v.2, p.519-531, 1999.

KETCHUM, R. E. B.; GIBSON, D. M.; GALLO, G. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 185-193, 1995.

KISHIMOTO, T.; URAKI, Y.; UBUKATA, M. Chemical synthesis of β -O-4 type artificial lignin. **Organic and Biomolecular Chemistry**. n.4, pp.1343–1347., 2006.

KIEDROWSKI, S; KAWALLECK, P; HAHLBROCK, K; SOMSSICH, I. E; DANGL, J. L. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis RPM1* disease resistance locus. **Embo Journal** , v.11, p.4677–4684, 1992.

KIERAN, P. M.; MACLOUGHLIN, P. F.; MALNE, D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p. 39-52, 1997.

KITTO, S. L.; JANICK, J. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, n.2, p. 277-282, 1985.

KLOCK, U. **Propriedades químicas da Madeira**. Apostila do Curso de Tecnologia de Madeira/Transformação da Madeira. UFPR, Curitiba – PR, 62p., 1994.

KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 49-56, 1997.

KRAUS, J. E. **A célula Vegetal**. In: GLORIA, Beatriz A. da.; GUERREIRO, Sandra Maria C. Anatomia Vegetal. Viçosa: UFV, 2003.

KUNIEDA, M.K.; KERBAUY, G.B. Formação de gemas em raízes adventícias de couve-flor cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n.9, p.231–238, 1986.

LAMEIRA, O. A.; SABÁ, R. T.; PINTO, PEREIRA, J. E. B.; AMORIM, A. C. L. ; LUZ, José Magno Queiroz . Embriogênese somática de *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi). **Acta Horticulturae, Leuven**, v. 569, p. 271-274, 2002.

LANDA, F.S.L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.

LEE, D.; MEYER, K.; CHAPPLE, C.; DOUGLAS, C. J. Down-regulation of 4-coumarate:CoA ligase (4CL) in *Arabidopsis*: effect on lignin composition and implications for the control of monolignol biosynthesis. **Plant Cell**. V.9, p.1985-98, 1997.

LESNEY, M. S. Growth responses and lignin production in cell suspension of *Pinus elliottii* 'elicited' by chitin, chitosan or mycelium of *Cronartium quercum* f.sp. *fusiforme*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. n.19, pp. 23–31, 1989.

LEWIS, N. G. & SARKANEN, S. **Lignin and lignan biosynthesis**, Washington:American Chemical Society, , DC.p.436.1998.

LEWIS, N. G. & YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annu. Rev. Plant Mol. Biol.**, V.41, p.455-496, 1998.

LEWIS, N. G.; DAVIN, L. B.; SARKANEN, S. Lignin and lignan biosynthesis: distinctions and reconciliations. *In* NG Lewis, S Sarkanen, eds, **Lignin and Lignan Biosynthesis**, v.697. ACS Symposium Series, Washington, DC, pp 1–27, 1998.

LI, L.; POPKO, J.L.; UMEZAWA, T.; CHIANG, V.L. 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in Angiosperms. **J. Biol. Chem.** V.275, p.6537-6545, 2000.

LIECHTI, R.; FARMER, E. E. The Jasmonate Pathway. **Science** Vol. 296. no. 5573, pp. 1649 - 1650

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

LOPES, W.A. & FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n.4, pp.670-673, 2004.

LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology**, v.29, pp.92-96, 1993.

MANTELL SH, SMITH H. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. In: Mantell SH, Smith H, editors. **Plant Biotechnology**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, pp. 75–108, 1984.

MARIA, M. A., ABREU., H. S. & REIS, J. L. Dual oxidation ways toward lignin evolution, **Floresta e Ambiente**, n. 1, v. 8, p.207- 210, 2001.

MATSUMOTO, K. Cultura de células em suspensão – focalizando a bananeira. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, p.126, 2006.

McCANN, M. C. & ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall. In C. W. Lloyd (ed). **The Cytoskeletal Basis of plant Growth and Form**. Academic Press, London, pp. 109-129, 1991.

MCCOWN, D.D. & SELLMER, J.C. IN: BONGA, J.M.; & DURZAN, D.J. (Ed.) **Cell and tissue culture in forestry** 1, 4-14, 1987.

MESSNER, B. & BOLL, M. Extracellular peroxidases of suspension culture cells of spruce (*Picea abies*). Fungal elicitor-induced inactivation (in preparation). **Plant Cell Tissue Organ Culture**. v. 36, n.1, pp. 81-90, 1994

MEYER HJ, VAN STADEN J. The in vitro production of an anthocyanin from callus cultures of *Oxalis linearis*. **Plant Cell Tissue Organ Culture** , n.40, p.55–8, 1995.

MICIC, M.; ORBULESCU, J.; RADOTIC, K.; JEREMIC, M.; SUI, G. ZHENG Y.; LEBLANC, R. M. ZL-DHP lignin model compound at the air – water interface. **Biophysical Chemistry**, V.99, p.55-62, 2002.

MOK MC, GABELMAN WH, SKOOG F. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota*. **Journal of the American Society for Horticultural Science** , n.101, p.442–9, 1976.

MOK, D. W. S.; MOK, M. C.; ARMSTRONG, J. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-Thiadiazol-5-yl urea and its effect on cytokinin autonomy in callus cultures of *Phaseolus*. **Plant Physiology**. V.65, n.6, p. 24, 1980.

MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO. Cytokinin activity of N- phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1509-1511, 1982.

MONTEIRO, M. B. O. **Lignina e Tanino como Estratégia de Defesa em Árvores.** Monografia, UFRRJ, Seropédica, p. ,2002

MONTEIRO, M. B. O. **Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido jasmônico e 2,4-diclorofenoxiacético em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.** Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, p.77, 2005.

MONTEIRO, M.B.O.; PEREIRA, R.P.W.; ABREU, H. S.; Bioquímica da lignificação de células xilêmicas. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 48-57, 2004.

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 Agrocência**, v. 5, n. 3, p. 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. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.34, p.267-275, 1998.

NAIR, R. B; XIA, Q; KARTHA, C. J; KURYLO, E; HIRJI, R. N; DATLA, R; SELVARAJ, G. Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. **Plant Physiology**, V.130, p.210-20, 2002.

NEGREL, J., POLLET, B., LAPIERRE, C. Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. **Phytochemistry**, v.43, p.1195-1199, 1996.

NOSE. M., BERNARDS, M. A., FURLAN, M, ZAJICEK, J. EBERHARDT, T. L.; LEWIS, N.G. Towards the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. **Phytochemistry**, v.39, n.1, pp.71-79, 1995.

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). 2006.

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v.9, n.9, p.433-440, 2004.

OSAKABE, K; TSAO, C. C; LI, L; POPKO, J. L; UMEZAWA. T. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V.96, p.8955–60, 1999.

PANDA, A. K.; SAROJ, M.; BISARIA, V. S. Alkaloid production by plant cell suspension cultures of *Holarrhena antidysenterica*: I. Effect of major nutrients. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, p. 1043-1051, 1992.

PARVATHI, K; CHEN, F; GUO, D; BLOUNT, J. W; DIXON, R. A. Substrate preferences of *O*-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-*O*-methylation of monolignols. **Plant J.** 25:193–202, 2001.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ufla, 92p. 2001b.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p., 2001a.

PASQUAL, M.; CARVALHO, G.R.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Lavras, Brasil, 1998.

PEREIRA, J. E. S. & FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

PEREIRA, J. L. P. **Proteoma comparativo de xilema de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus globulus***. Dissertação de Mestrado, UCB., p.100, 2007.

PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O. ABREU, ABREU, H. S. ; F. A. **Formação de lignina não tradicional por dois caminhos (Técnica de transgenia e indução por oxigênio) para defesa de plantas**. In: Forest 2000 - Sexto Congresso e Exposição Internacional sobre Florestas, Porto Seguro. Anais do Congresso Forest, v. 1. p. 404-406, 2000.

PEREIRA, R. P. W. **Atenuação do Processo de Lignificação de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA3 BAP**. Dissertação de Mestrado , UFRRJ, Seropédica, p.90, 2005.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiology**, v.5, p. 53-63, 2002.

PIERIK, R. L. M. *In vitro culture of higher plants*. 4.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 348 p. 1997.

PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Boston:Martinus Nijhoff Publishers, 1987.

PETERSEN, R. Z. Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos. Tese de Doutorado.UFRS. 208p., 2006.

PINCON, G.; MAURY, S.; HOFFMANN, L.; GEOFFROY, P.; LAPIERRE, C.; POLLET, B.; LEGRAND, M. Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. **Phytochemistry**, V.57, p.1167–1176, 2001.

PIQUEMAL J., LAPIERRE C., MYTON K., O'CONNELL A., SCHUCH W., GRIMAPETTENATI J. AND BOUDET A.M., Down regulation of cinnamoyl CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. **Plant J.** V.13, p.71–83, 1998.

PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. C. Morphogenesis in micropagation. In:Soh, W.Y.; BHOJWANIN. S. S. (Eds.). **Morphogenesis in Plant Tissue Cultures**. London: Kluwer Academic Publishers. P. 443-462, 1999.

PRETSCH, E., AFFOLTER, C., BUHLMANN, P. , AFFOLTER, C. **Structure determination of organic compounds**: Tables of Spectral Data,3rd ed. Springer Verlag, pp. 421. 2000.

RAES, J; ROHDE, A; CHRISTENSEN, J. H; VAN DE PEER, Y; BOERJAN, W. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.133, n.3, p.1051-1071, 2003.

RAJENDRAN L, RAVISHANKAR GA, VENKATARAMAN LV, PRATHIBA KR. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. as influenced by nutrient stress and osmoticum. **Biotechnol Lett** , n.14, p.707–14. 1992

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; LU, F.; MARITA, J. M.; PILATE, G.; DOORSSELAERE, J. V.; BOERJAN, W.; E JOUANIN, L. NMR Evidence for Benzodioxane Structures Resulting from Incorporation of 5-Hydroxyconiferyl Alcohol into Lignins of *O*-Methyltransferase-Deficient Poplars. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.86-91, 2001

RALPH, J.; MACKAY, J. J.; HATFIELD, R. D.; O'MALLEY, D. M.; WHETTEN, R. W.; SEDEROFF, R. R. Abnormal Lignin in a Loblolly Pine Mutant. *Science*, v.277, p.235-239, 1997.

RANOCHA, P.; CHABANES, M., CHAMAYOU, S., JAUNEAU, A.; BOUDET, A. M., GOFFNER, D. Laccase Down-Regulation Causes Alterations in Phenolic Metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1 p 145-155, 2002.

REDENBAUGH, K.; PAASCH, B. D.; NICHOL, J. W.; KOSSLER, M. E.; VISS, P. R.; WALKER, K. A. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. **Bio/Technology**, v. 4, p. 797-801, 1986.

REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A. Regeneration of plants from callus tissue of *Aeschynomene* spp. (*Leguminosae*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, .v.45, n.3, p 185 - 190, June. 1996.

REY, H.Y.; MROGINSKI, L.A.; FERNANDEZ, A. Induction in vitro de callos y raices em explantos de seis cultivares de mandioca (*Manihot sculenta crantz*). **Phyton**, v.39, n. 1, 161-170, 1980.

ROCHA, S.C. & QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, v.14, n.1, p.91-101, 2004.

RODRIGUES, J.; GRAÇA, J.;PEREIRA, H. Determination of tree to tree variation in syringil/guaiacyl ratio in *Eucalyptus globulus* wood lignin assessed by analytical pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 48, p. 121-128, 1999.

RODRIGUES, J.; GRAÇA, J.;PEREIRA, H. Influence of tree eccentric growth on syringil/guaiacyl ratio in *Eucalyptus globulus* wood lignin assessed by analytical pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 58-59, p. 481-489, 2001.

ROS-BARCELÓ A., POMAR F., FERRER M.A., MARTÍNEZ P, BALLESTA MC, PEDRENO MA. In situ characterization of a NOsensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. **Physiol. Plant**.v.114, pp.33–40, 2002.

ROS-BARCELÓ A., POMAR F., LOPEZ-SERRANO M, MARTÍNEZ P, PEDRENO MA. Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. **Plant Physiol. Biochem.** v.40, p.325–32, 2002.

ROWELL, R. M.; PETTERSEN, R.; HAN, J.S.; ROWELL, J.S., TSHABALALA, M. A. Cell Wall Chemistry. Capítulo 3 – Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. Editado por ROWELL, R.M. Editora TAYLOR & Francis Group, 2005.

SAJC, L. GRUBISIC, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bioreactors of plant engineering: an outlook for further research. **Biochemical Engineering**, v. 4, p. 89-99, 2000

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology** 4th ed. Wadsworth Publishing Company: EUA, 682p., 1992.

SALMAN, M. N. Establishment of callus and suspension cultures from *Gypsophila paniculata* leaf segments and study of the attachment of host cells by *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophilae*. **Plant Cell, tissue and Organ Culture**, v. 69, pp.189-196, 2002.

SARKANEN, K. V.& LUDWIG C. H. **Lignins Ocurrence, Formation, Structure and Reactions**, Wiley-Interscience. New York, USA .867p. 1971.

SASAKI, S.; NONAKA, D.; WARIISHI, H.; TSUTSUMI, Y.; KONDO, R. Role of Tyr residues on the protein surface of cationic cell-wall-peroxidase (CWPO-C) from poplar - Potential oxidation sites for oxidative polymerization of lignin. **Phytochemistry**, v. 69, p.348–355, 2008.

SCHOCH, G; GOEPFERT, S; MORANT, M; HEHN, A; MEYER, D. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 30-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. **J. Biol. Chem**, V.276, p.36566–74, 2001.

SEITZ HU, HINDERER W. Anthocyanins. In: Constabel F, Vasil I, editors. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, vol. 5. San Diego: Academic Presspp. P.49–76. , 1988

SEWALT, V. J. H; NI, W; BLOUNT, J. W; JUNG, H. G; MASOUD, S. A. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonialyase or cinnamate 4-hydroxylase. **Plant Physiology.**, V.115, p.41–50, 1997.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins, **The plant cell**, n. 5, p.9-23. 1993.

SHOWALTER, A.M. 2001. Introduction: plant cell wall proteins. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, p.1361-1362, 2001.

SIQUEIRA, E.R. de; INOUE, M.T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 27, n. 4, p. 639 - 646, Abr. 1992.

SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. 2ª edição, Academic Press, Inc: San Diego, CA, 1992.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants, **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.22, p. 53–78, 2006.

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

SUGIYAMA, M. M.; MINOCHA, S. C. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. **International Review of Cytology**, n. 196, p.67-94, 1999.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

TEIXEIRA, S.L. Chemical sterilization of culture media. **Hort. Bras.** (Suppl.), v.23, p.668, 2005.

TERASHIMA, N., FUKUSHIMA, K., HE, L.-F., TAKABE, K. **Comprehensive model of the lignified plant cell wall**. In: Jung, H.G., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.), Forage Cell Wall Structure and Digestibility. American Society of Agronomy, Madison, pp. 247-270. , 1993.

TORRES, A.C. et al. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 19p. (Circular Técnica, 24), 2001.

ULISSES,C.; CAMARA, T.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE C. Induction of somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy pink and cv. Sexy scarlet from sections of ovaries. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.2, n.4, p.281-284, 2007.

VALLE R. C. S. C. **Estratégias de Cultivo de Células de Pimenta Longa (Piper hispidinervium) e Determinação de Parâmetros Cinéticos**. Tese de Doutorado, UFSC, 2003.

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

VANHOLME R, MORREEL K, RALPH J, BOERJAN W. Lignin engineering. **Current Opin Plant Biology**. V.11, n.3, p.278-85, 2008.

VARNER, J.E., e LIN, L.4. Plant cell wall architecture. Cell Whitmore, F.W. (1978). Lignin-protein complex catalyzed by peroxidase. **Plant Sci. Lett.** 13, 241-245. 1989.

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.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, v.34, n. 4, pp.507-511, 2004.

VERHAGEN, S. A. & WANN, S.R. Norway spruce somatic embryogenesis: high-frequency initiation from light-cultured mature embryos. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 16, pp.103-111, 1989.

VILLALOBOS, A. V. M. & THORPE, T. A. **Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura - Fundamentos y Aplicaciones**. Centro Internacional de Agricultura, 969 p. 1991.

von ADERKAR, P. & BONGA, J. M. Formation of haploid embryoids of *Larix deciduas*: early embryogenesis, **Am. Journal Botanic**, v. 75, pp. 690-700, 1988.

WADENBACK, J.; VON ARNOLD, S.; EGERTSDOTTER, U.; WALTER, M.H.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D.; GELLERSTEDT, G.; GULLION, T.; CLAPHAM, D. Lignin biosynthesis in transgenic Norway spruce plants harboring an antisense construct for cinnamoyl CoA reductase (CCR). **Transgenic Res**, v.17, p.379-392, 2008.

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.

WHITMORE, F. W. Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. **Phytochemistry**, v. 17, p.421-425. 1978.

WHITMORE, F. W. Lignin-Protein complex in cell walls of *Pinus elliotii*: Amino acid constituents., **Phytochemistry**, v. 21, p.315-318, 1982.

YE, Z. H; KNEUSEL, R. E; MATERN, U; VARNER, J. E. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. **Plant Cell**, V.6, p.1427-1439, 1994.

YE, Z-H. Vascular tissue Differentiation and Pattern Formation in Plants. **Annual Rev. Plant. Biol.** (53):183-202, 2002.

YEOMAN, M. M.; YEOMAN, C. L. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. **New Phytologist**, v. 134, p. 553-569, 1996.

YUAN, Y.; LI, C.; HU, Z. D.; WU, J. C.; ZENG, A. P. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. **Process Biochemistry**, v,38, p.193-198, 2002.

ZENK MH, EI-SHAGI H, SCHULTE U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. **Planta Med Supplement**, p.79–101, 1975.

ZHONG, R.; HERBERT, W. M.; NEGREL, J.; YE, Z. Dual Methylation Pathways in Lignin Biosynthesis, **Plant Cell**, V.10, p.2033-2046, 1998.

ZIV, M. Developmental and structural patterns of *in vitro* plants. In: Soh, W.Y.; BHOJWANIN. S. S. (Eds.). **Morphogenesis in Plant Tissue Cultures**. London: Kluwer Academic Publishers. P. 235-253, 1999.

8. ANEXOS

ANEXO I. Tabelas dos teores de lignina da parede celular e extracelular.

ANEXO II. Tabelas de Análises de Variância

ANEXO III. Peso dos produtos formados do meio extracelular com H₂O₂, peroxidase e H₂O₂ + peroxidase

ANEXO IV. Espectros do infravermelho dos filtrados da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*

ANEXO V. Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs

ANEXO VI. Ressonância Magnética Nuclear do ¹³C das DHPs

ANEXO VII. Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs dos subtratamentos dos filtrados da suspensão celular

ANEXO VIII. Ressonância Magnética Nuclear do ¹³C

ANEXO I. Tabelas dos teores de lignina da parede celular e extracelular

Tabela 16. Teores de lignina da parede celular de *Eucalyptus urophylla*.

Tratamentos	Absorbância	Teor de Lignina nas Células em Suspensão (ppm)
URO1c	0,594	291,92
URO1c	0,562	271,78
URO1c	0,583	285,00
URO2c	0,609	301,36
URO2c	0,612	303,25
URO2c	0,615	305,13
URO3c	0,714	367,44
URO3c	0,699	358,00
URO3c	0,703	360,51
URO4c	0,497	230,87
URO4c	0,513	240,94
URO4c	0,503	234,65

Tabela 17. Teores de lignina extracelular do meio em suspensão de *Eucalyptus urophylla*.

Tratamentos	Absorbância	Teor de Lignina Extracelular (ppm)
URO1le	0,187	77,92
URO1le	0,191	80,17
URO1le	0,185	76,80
URO2le	0,200	85,29
URO2le	0,214	93,09
URO2le	0,209	90,29
URO3le	0,244	109,96
URO3le	0,239	107,15
URO3le	0,243	109,39
URO4le	0,174	70,61
URO4le	0,170	68,37
URO4le	0,173	70,05

ANEXO II. Análises de Variância

Tabela 18. Análise de Variância do teor de lignina da parede celular

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância	Coefficiente de Variação
Tratamentos	3	24719.25	8239.751	208.538	0.00000	2.124
Resíduo	8	316.0966	39.51207			

Tabela 19. Análise de Variância do teor de lignina extracelular

Fontes de Variação	Grau de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância	Coefficiente de Variação
Tratamentos	3	24719.25	8239.751	208.538	0.00000	2.124
Resíduo	8	316.0966	39.51207			

ANEXO III. Peso dos produtos formados do meio extracelular com H₂O₂, peroxidase e H₂O₂ + peroxidase

Tabela 20. Peso das DHPs dos filtrados

Tratamentos	Peso das DHPs total filtrados
URO1 H ₂ O ₂ + Peroxidase	0,0997
URO1 H ₂ O ₂	0,1289
URO1 Peroxidase	0,1164
URO2 H ₂ O ₂ + Peroxidase	0,1614
URO2 H ₂ O ₂	0,0854
URO2 Peroxidase	0,1237
URO3 H ₂ O ₂ + Peroxidase	0,0961
URO3 H ₂ O ₂	0,0849
URO3 Peroxidase	0,0968
URO4 H ₂ O ₂ + Peroxidase	0,1039
URO4 H ₂ O ₂	0,1856
URO4 Peroxidase	0,1023

ANEXO IV. Espectros do infravermelho dos filtrados da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*

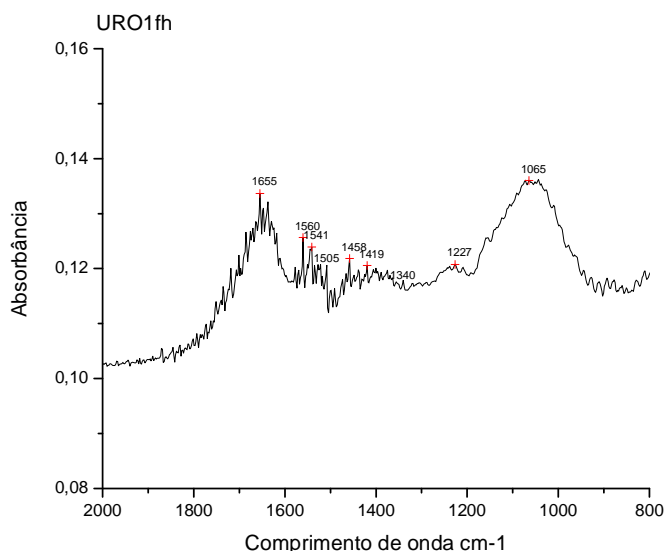


Figura 38. Infravermelho do tratamento URO1fp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

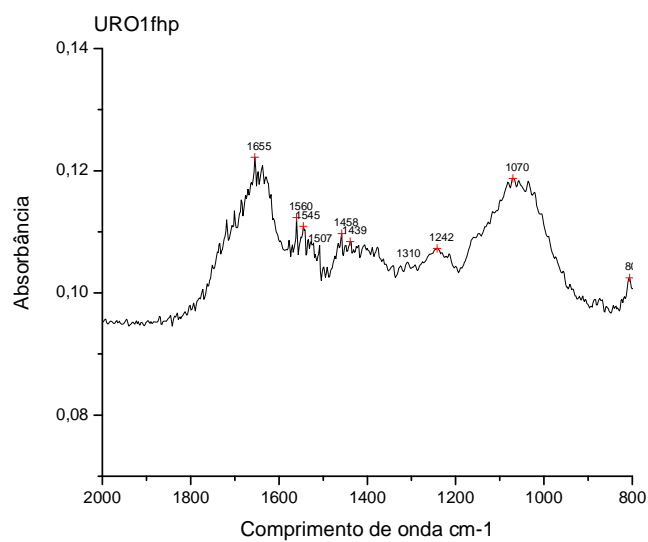


Figura 39. Infravermelho do tratamento URO1fhp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

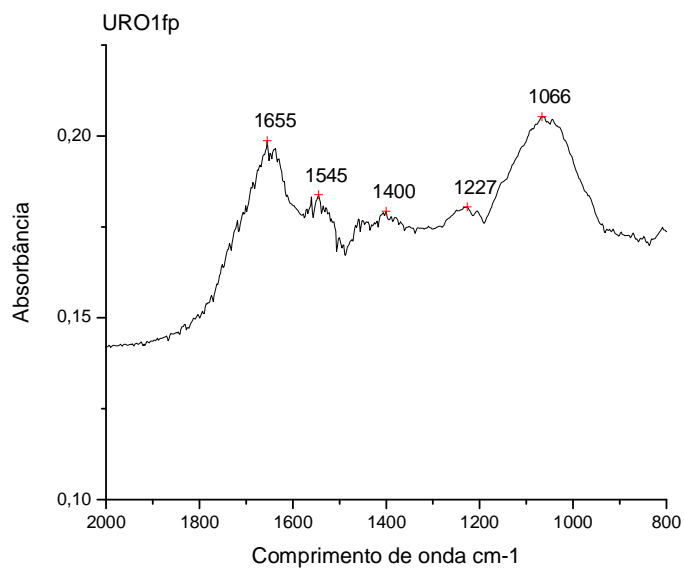


Figura 40. Infravermelho do tratamento URO1 Peroxidase do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

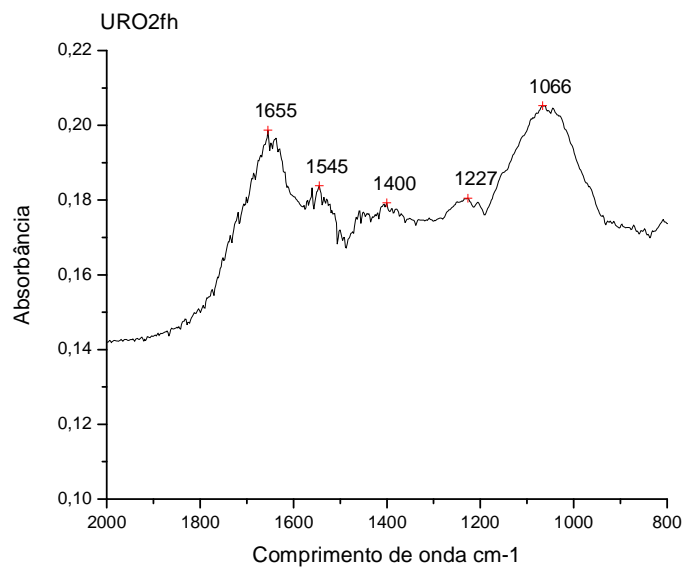


Figura 41. Infravermelho do tratamento URO2fh do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

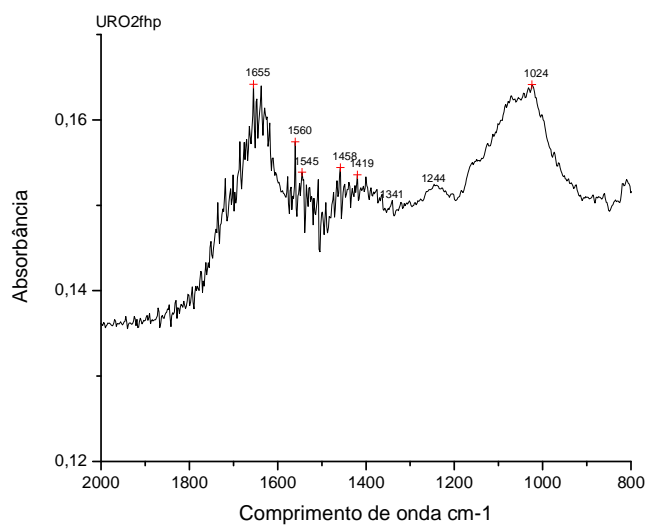


Figura 42. Infravermelho do tratamento URO2fhp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

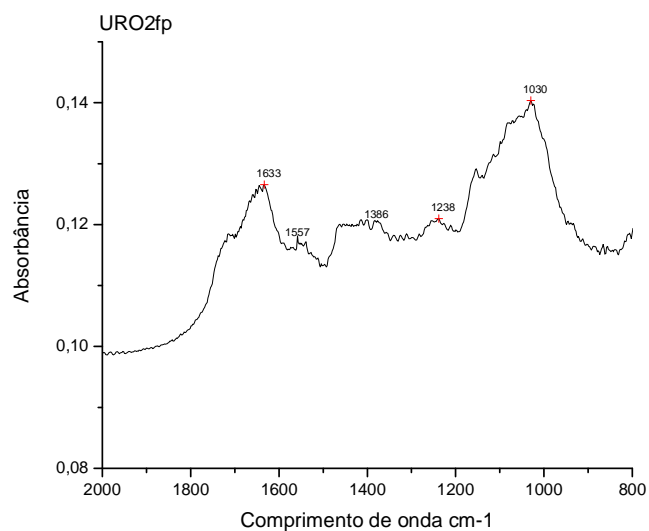


Figura 43. Infravermelho do tratamento URO2fp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

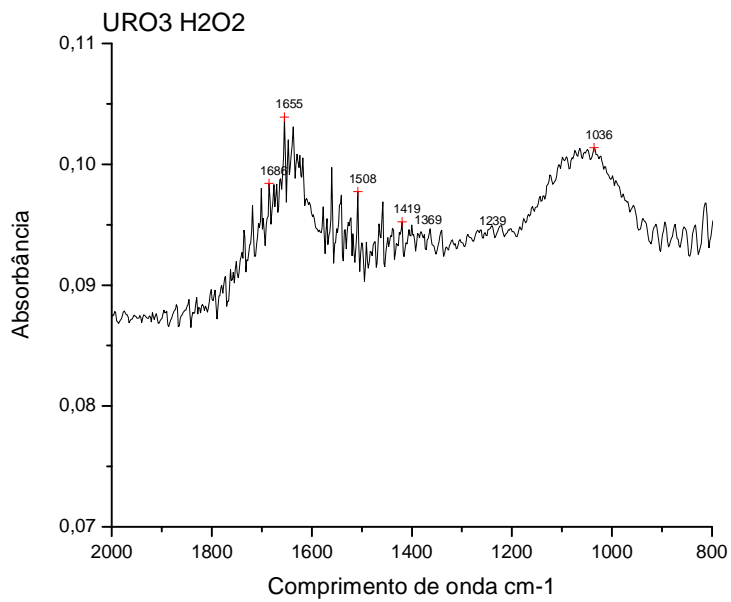


Figura 44. Infravermelho do tratamento URO3fh filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

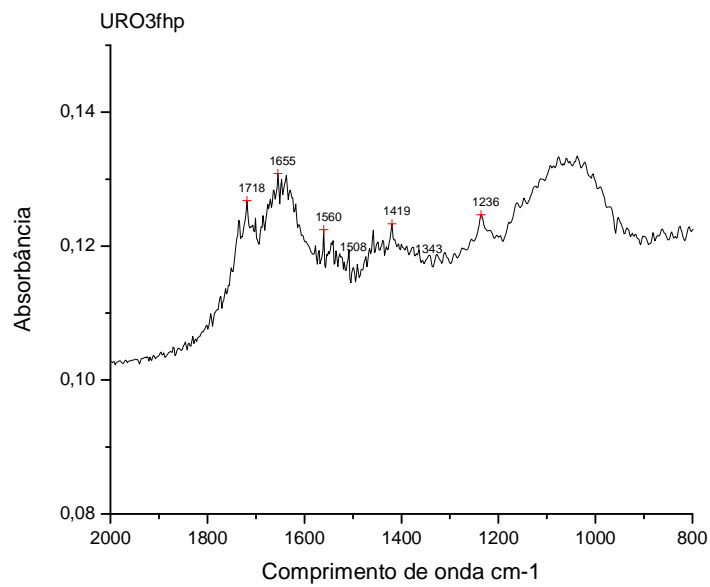


Figura 45. Infravermelho do tratamento URO3fhp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

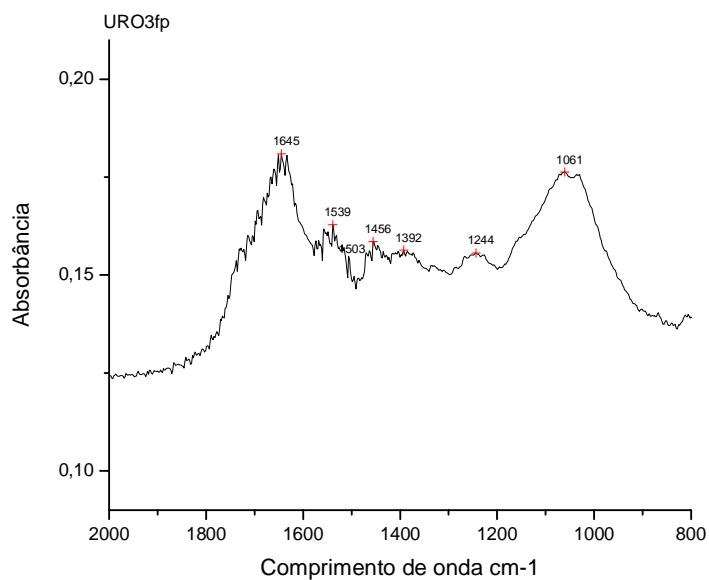


Figura 46. Infravermelho do tratamento URO3fp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

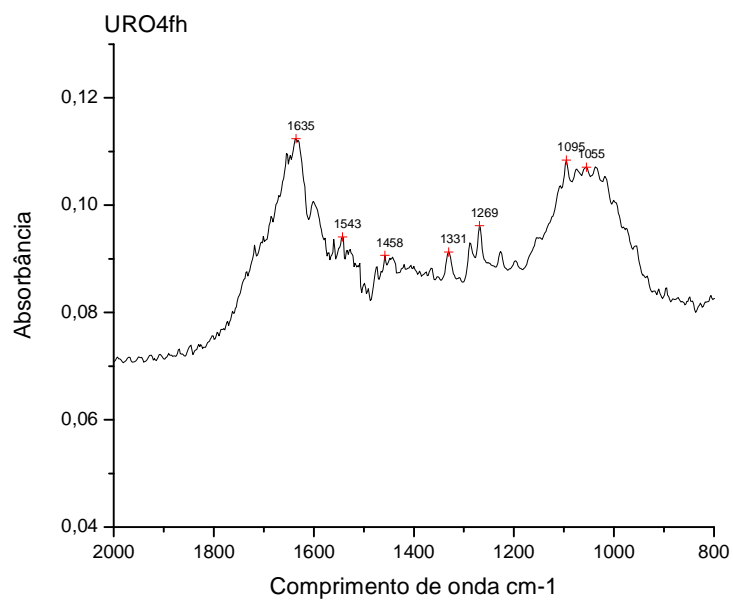


Figura 47. Infravermelho do tratamento URO4fh do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

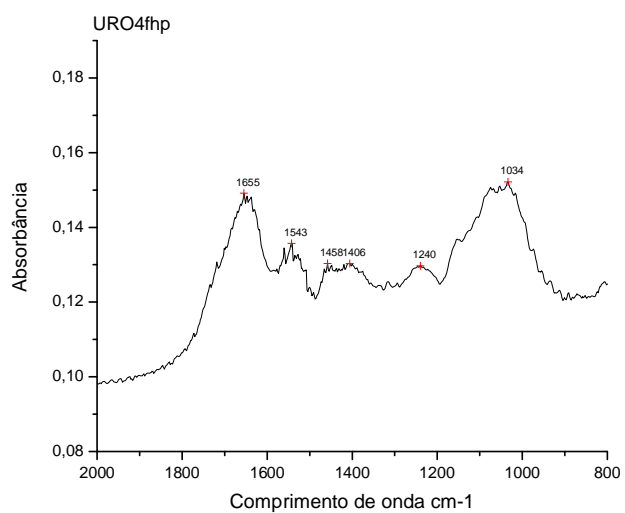


Figura 48. Infravermelho do tratamento URO4fhp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

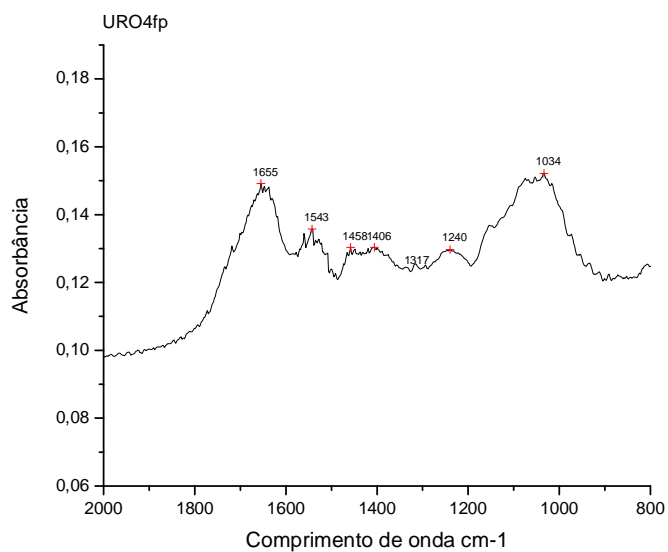


Figura 49. Infravermelho do tratamento URO4fp do filtrado da suspensão celular de *Eucalyptus urophylla*.

ANEXO V. Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs

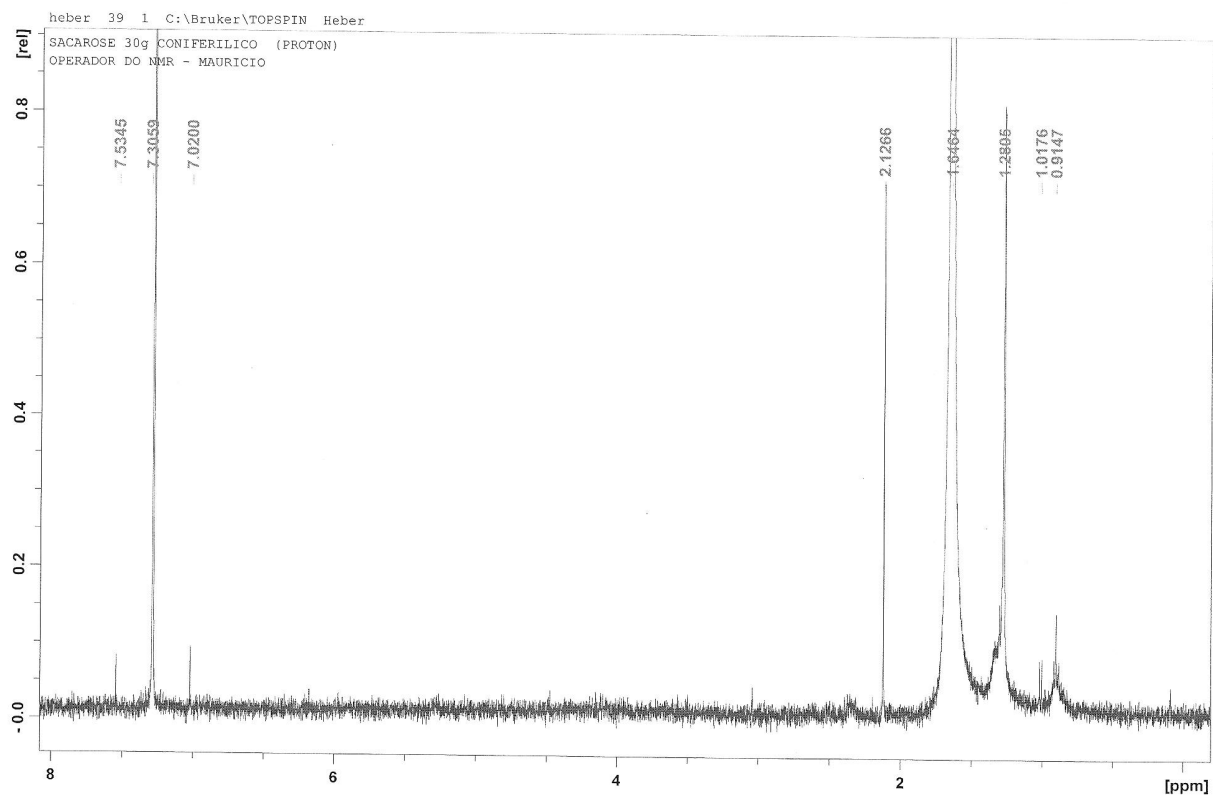


Figura 50. Espectro da RMN H da DHP3c.

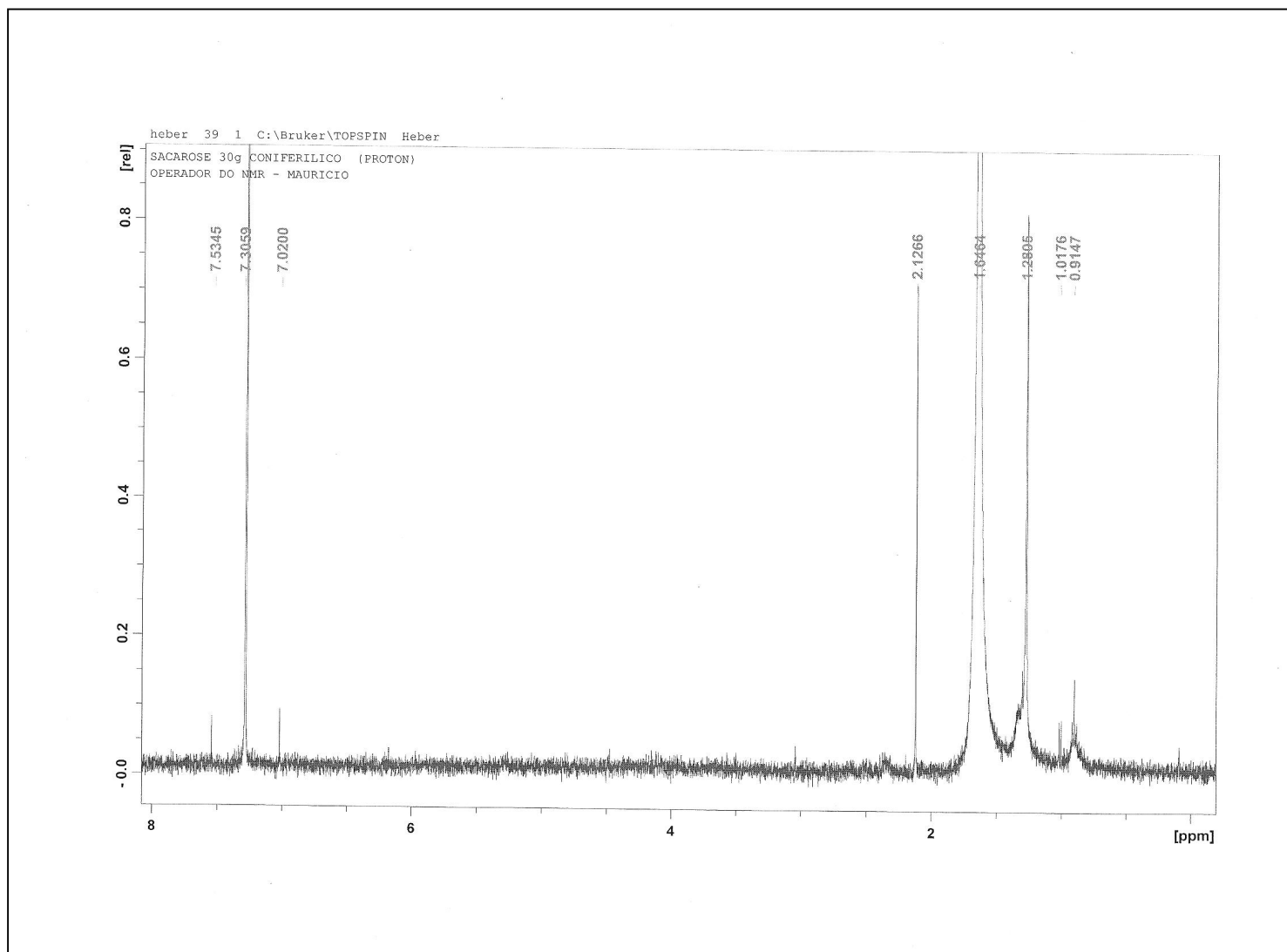


Figura 51. Espectro da RMN H da DHP1s.

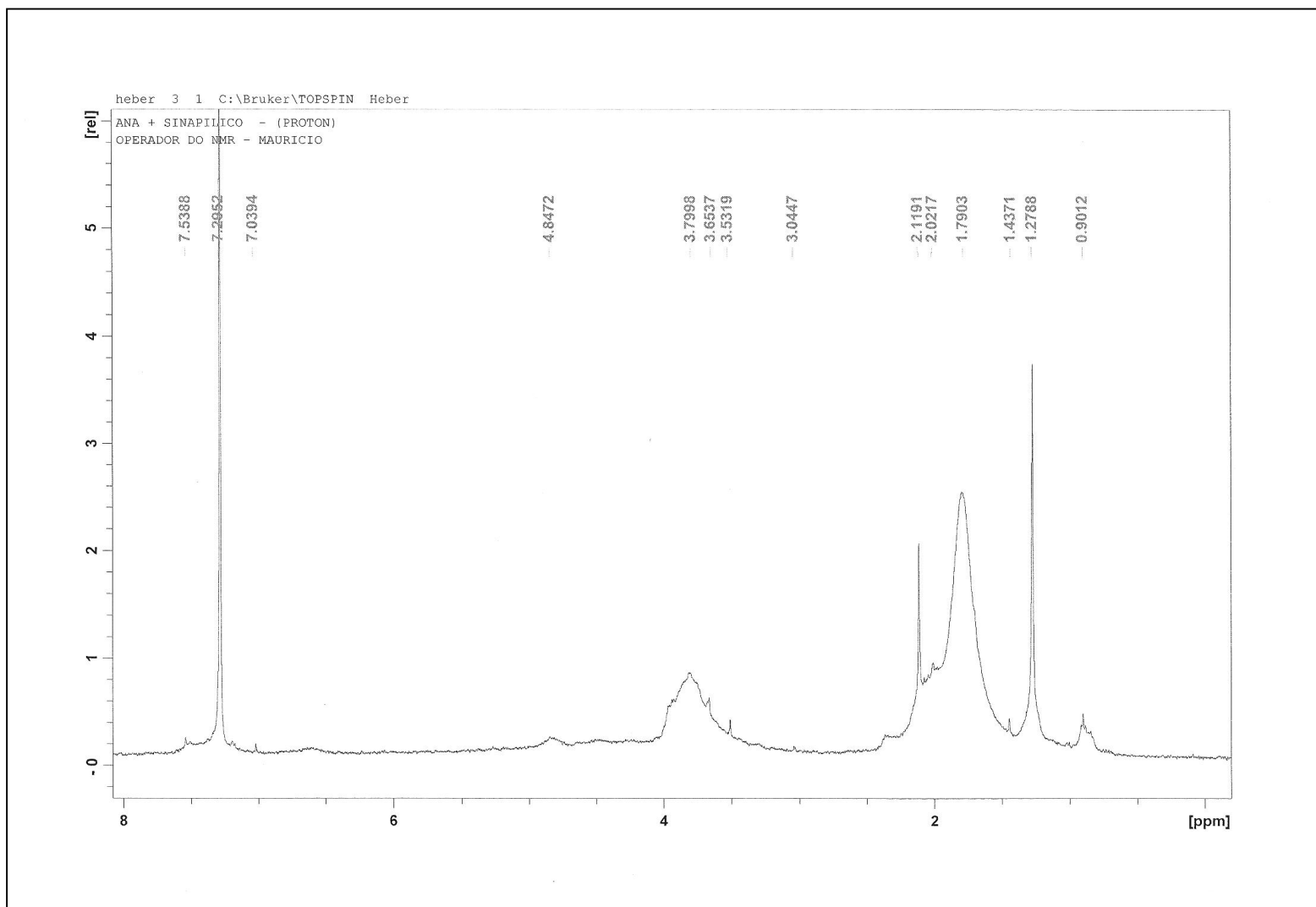


Figura 52. Espectro da RMN H da DHP2s.

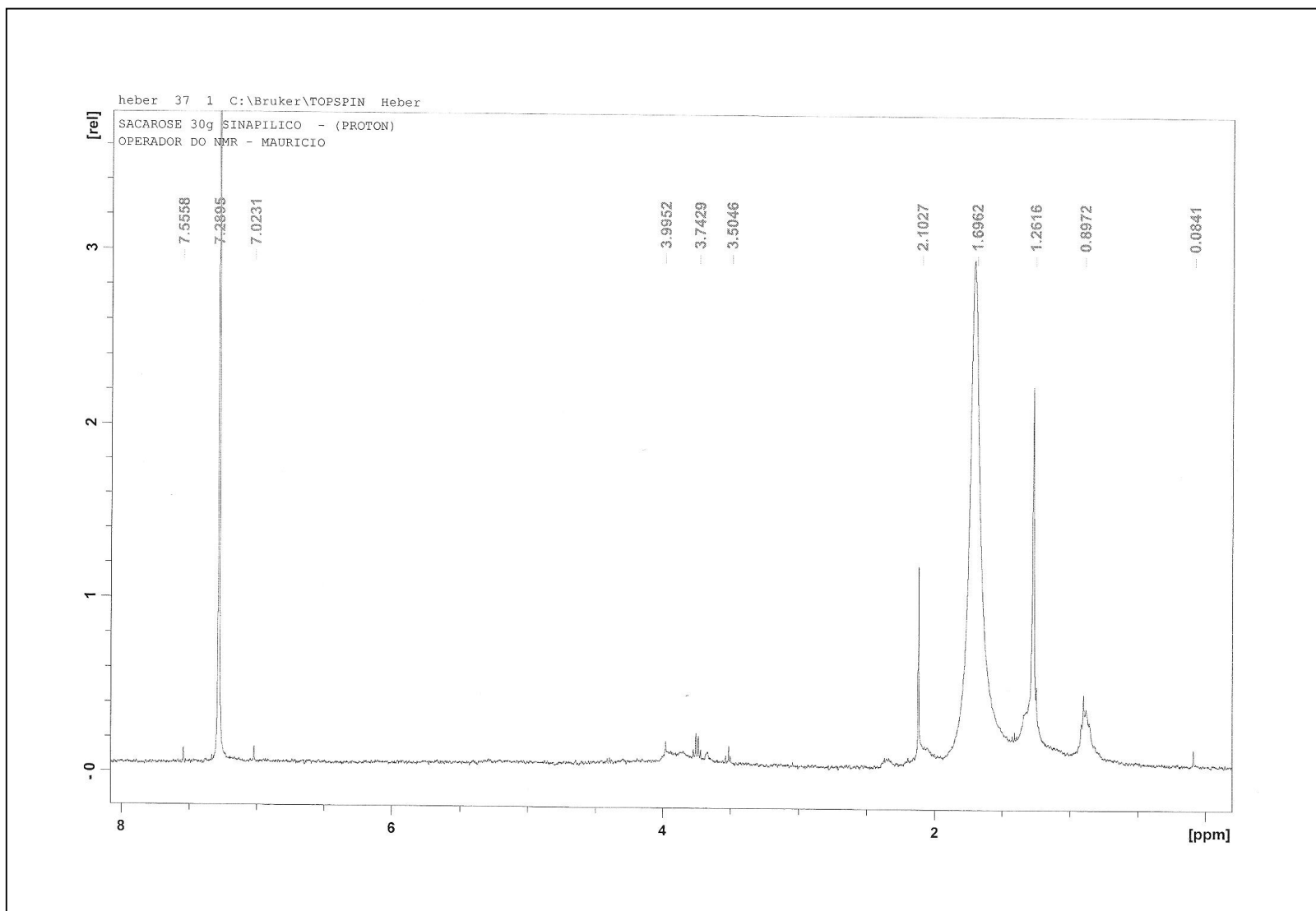


Figura 53. Espectro da RMN H da DHP3s.

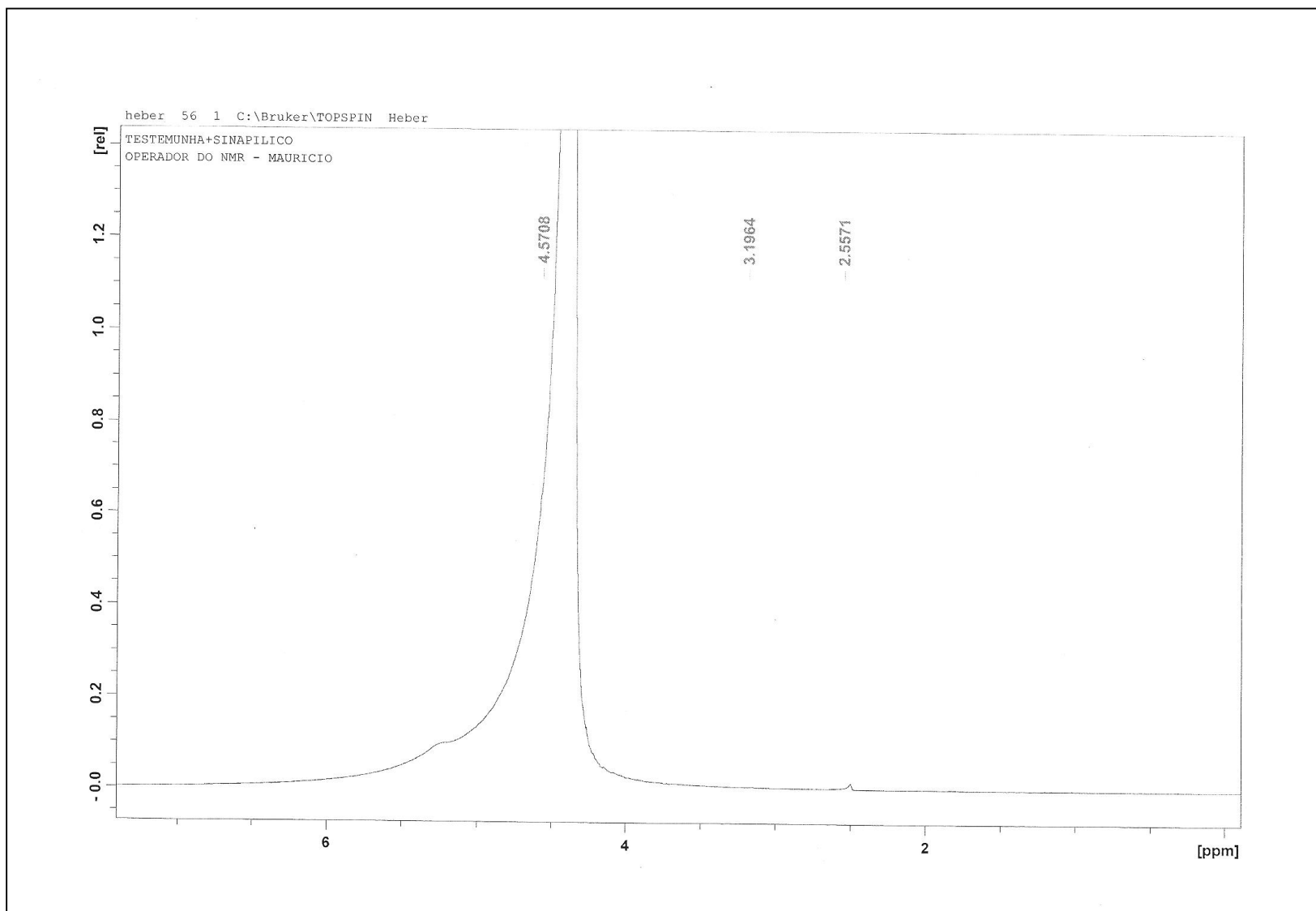


Figura 54. Espectro da RMN H da DHP4s.

ANEXO VI. Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C das DHPs

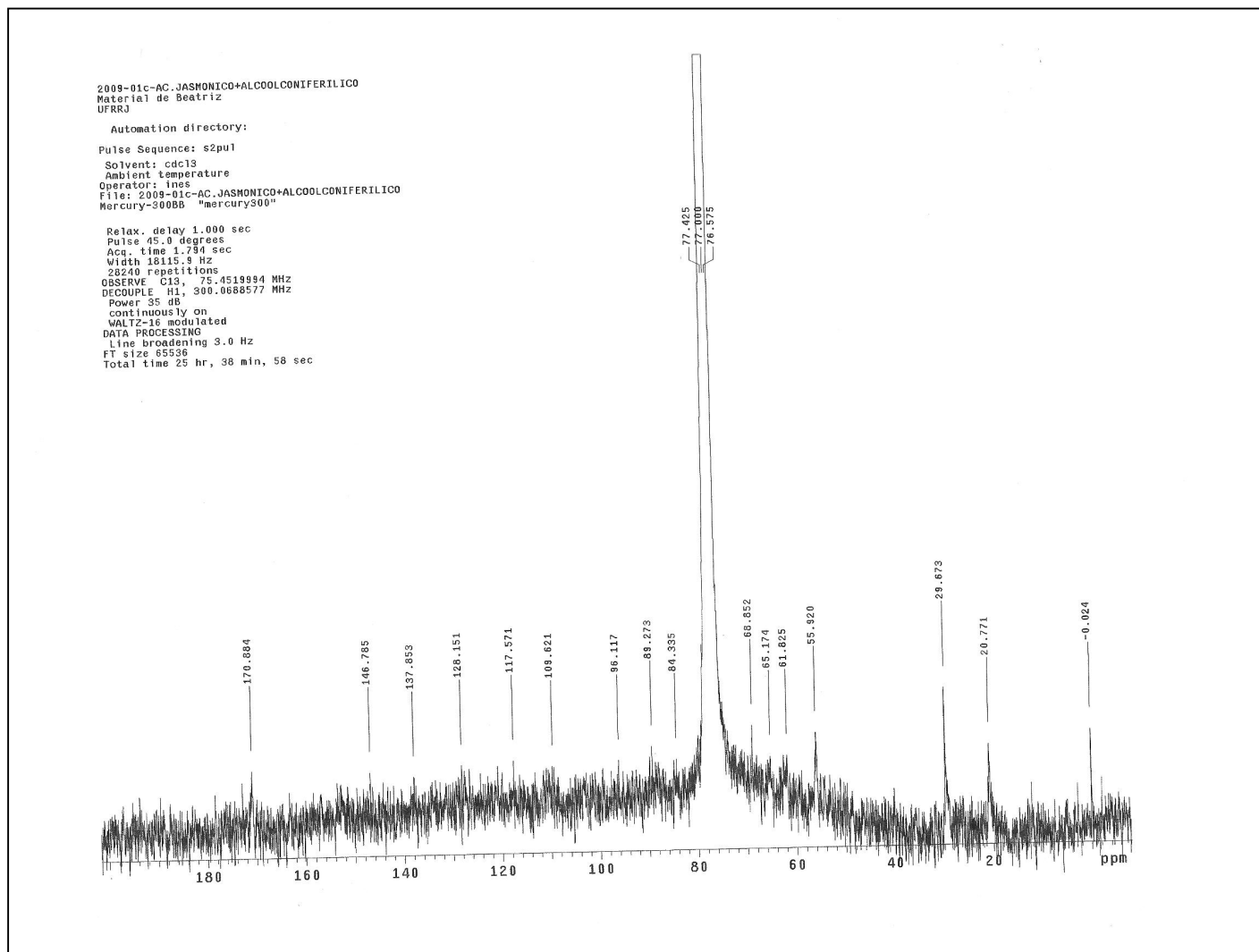


Figura 55. Espectro da RMN ^{13}C da DHP1c.

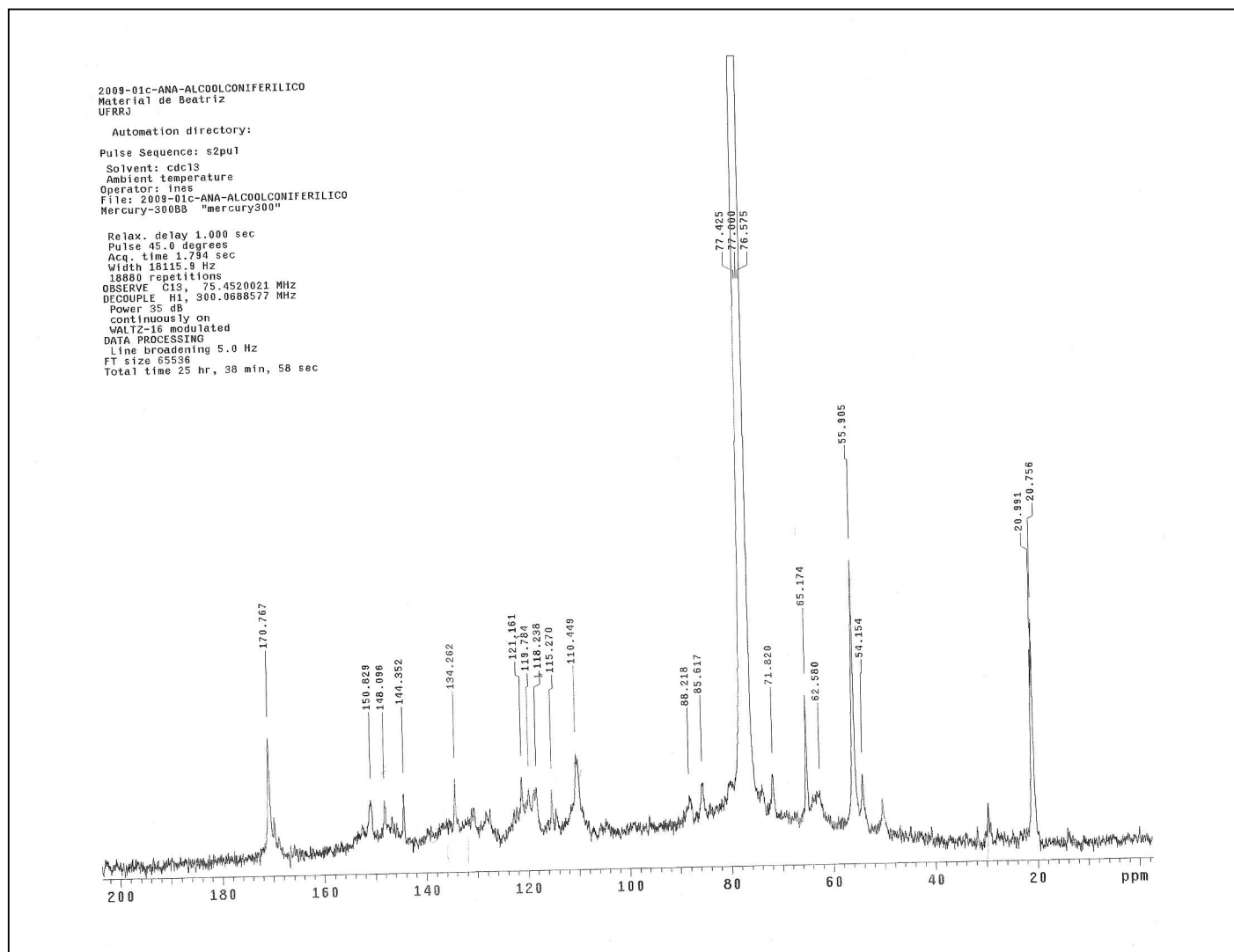


Figura 56. Espectro da RMN ^{13}C da DHP2c.

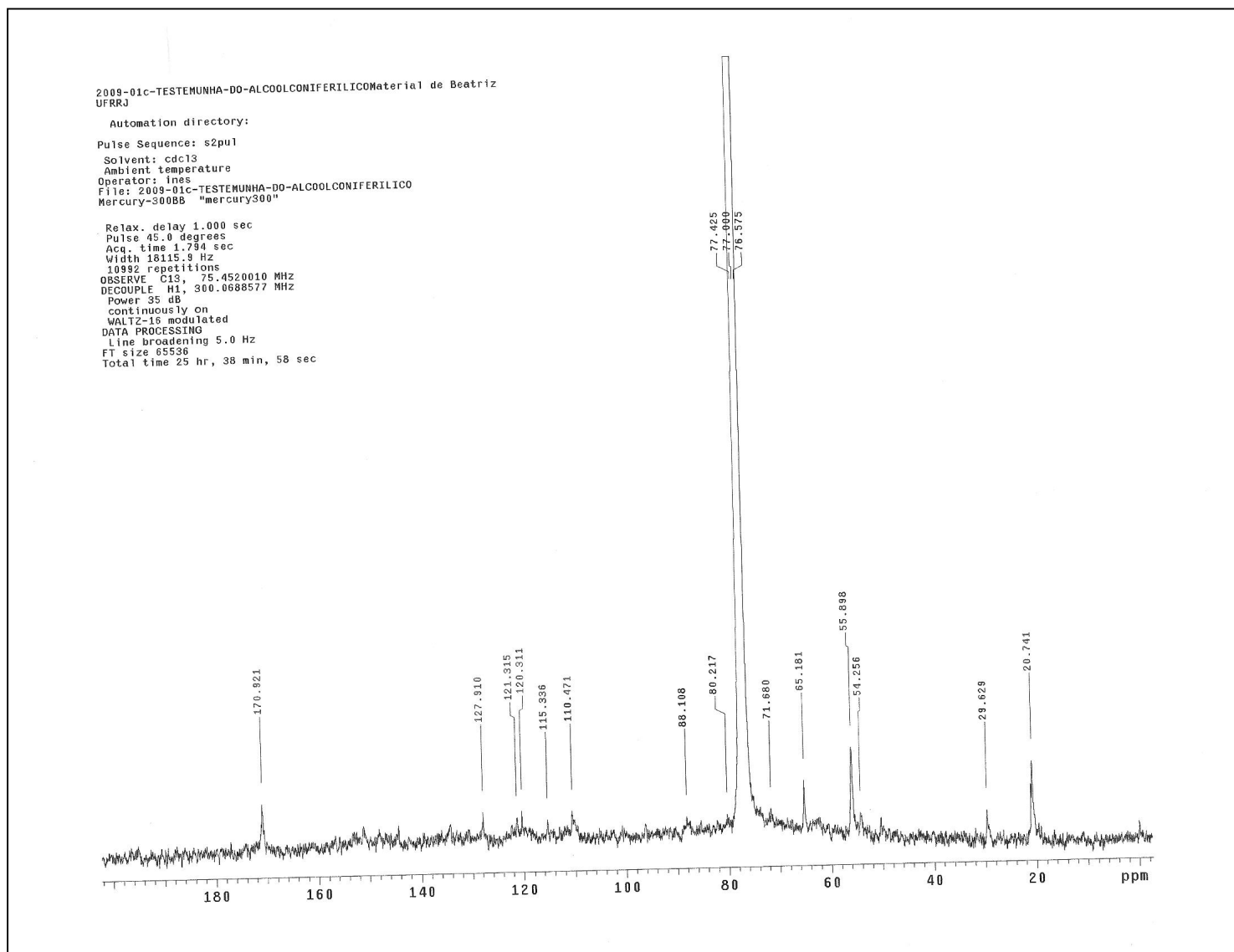


Figura 57. Espectro da RMN ¹³C da DHP4c.

ANEXO VII. Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs dos subtratamentos dos filtrados da suspensão celular

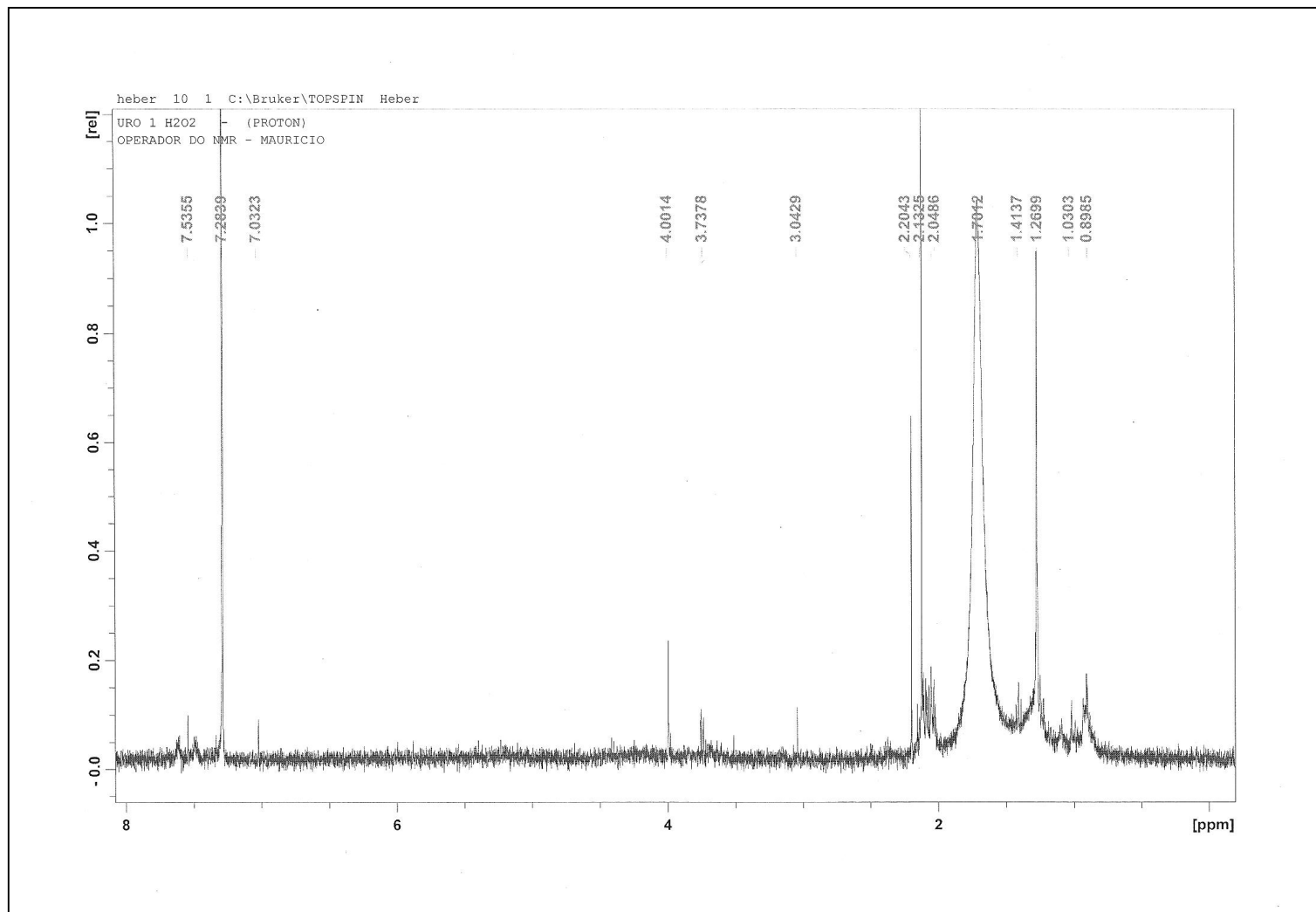


Figura 58. Espectro da RMN H do URO1fh.

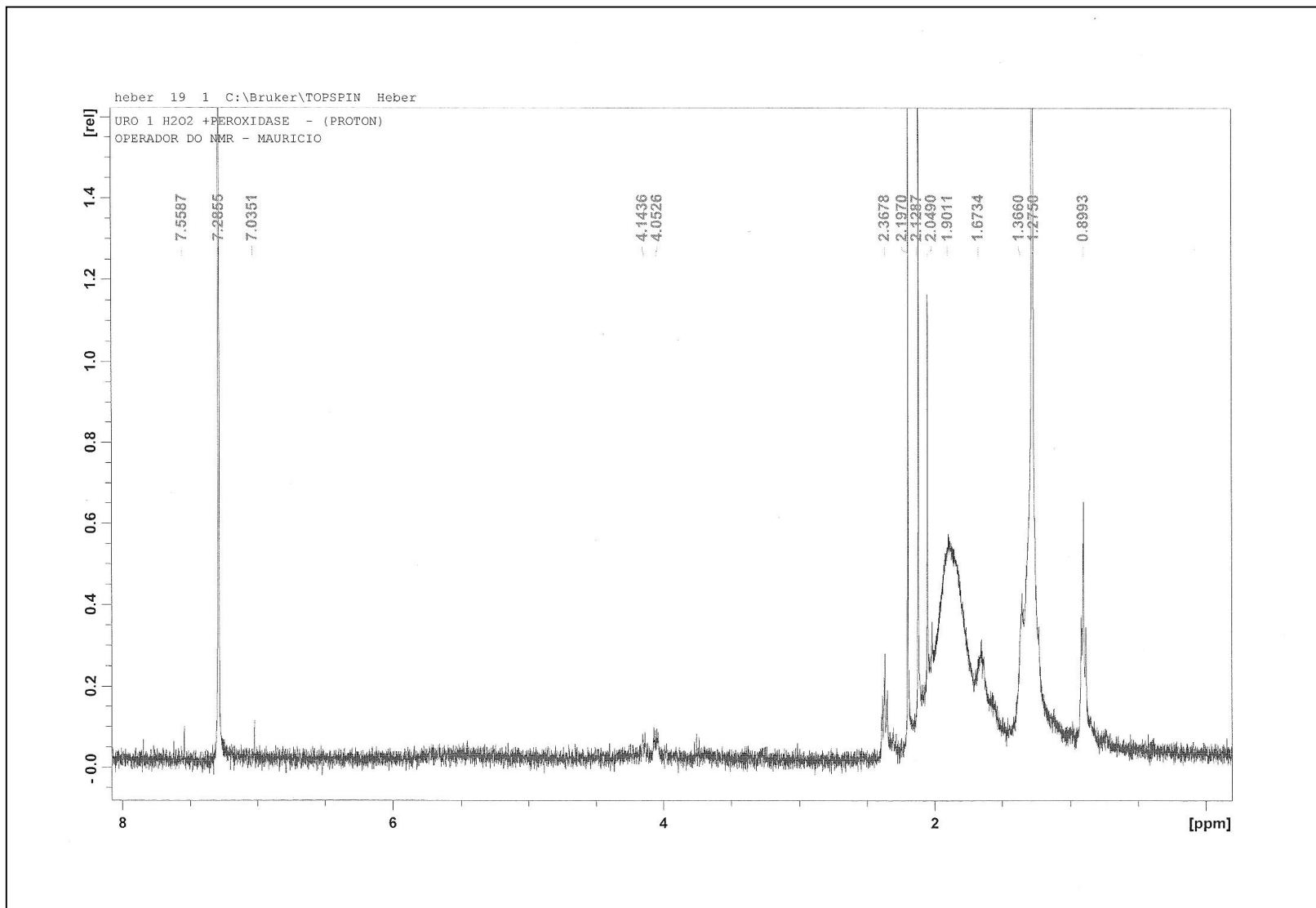


Figura 59. Espectro da RMN H do URO1fhp.

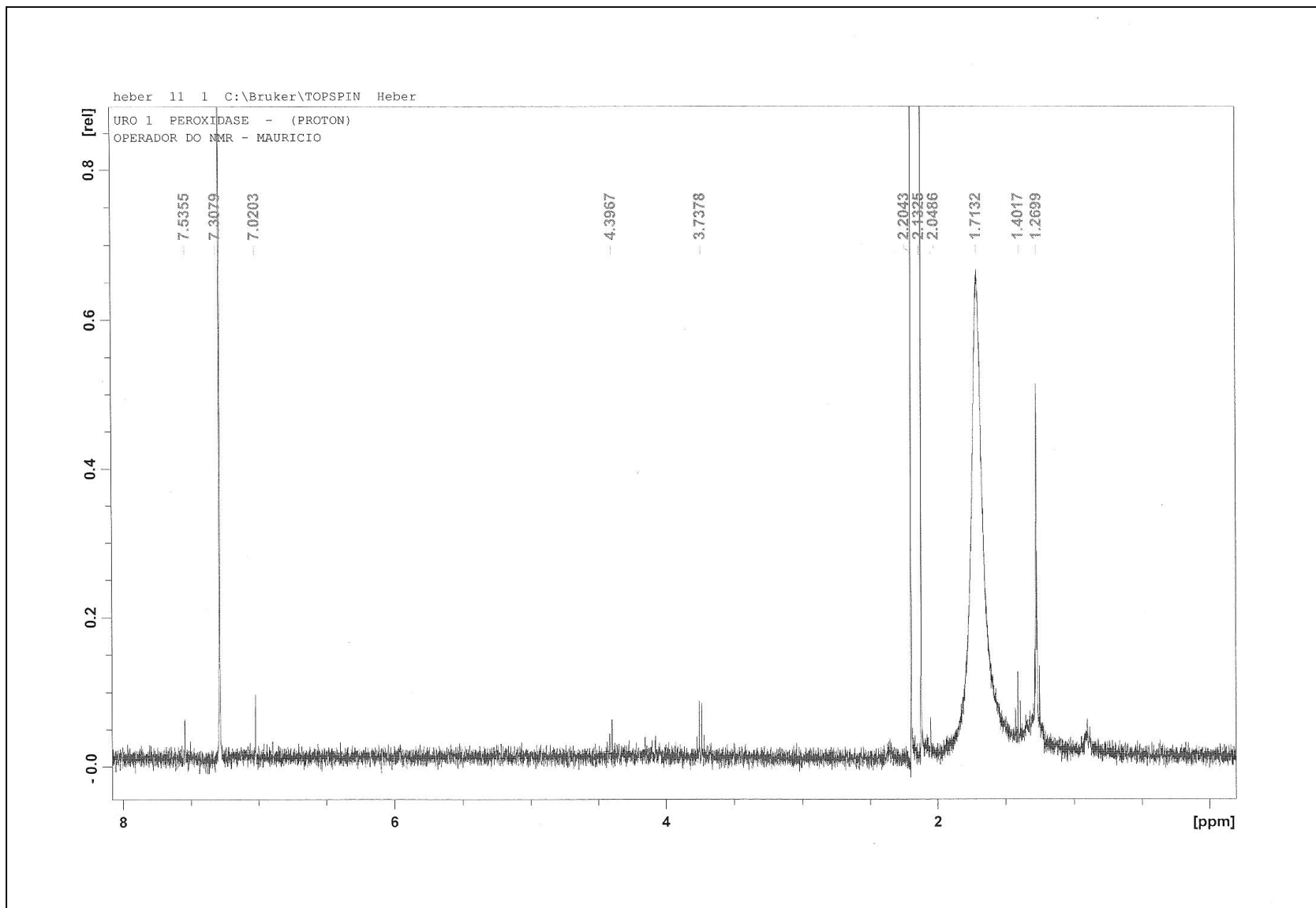


Figura 60. Espectro da RMN H do URO1fp.

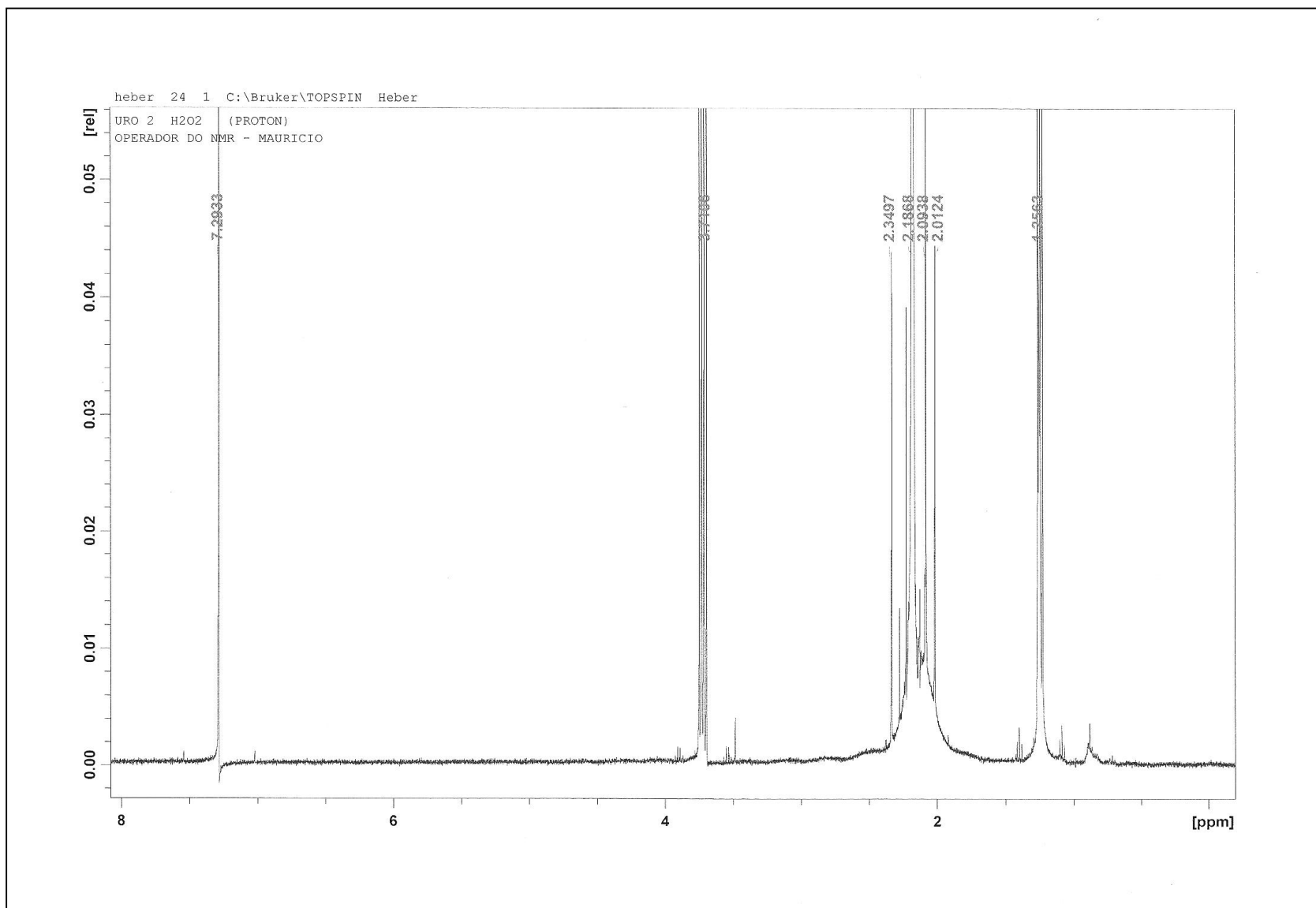


Figura 61. Espectro da RMN H do URO2fh.

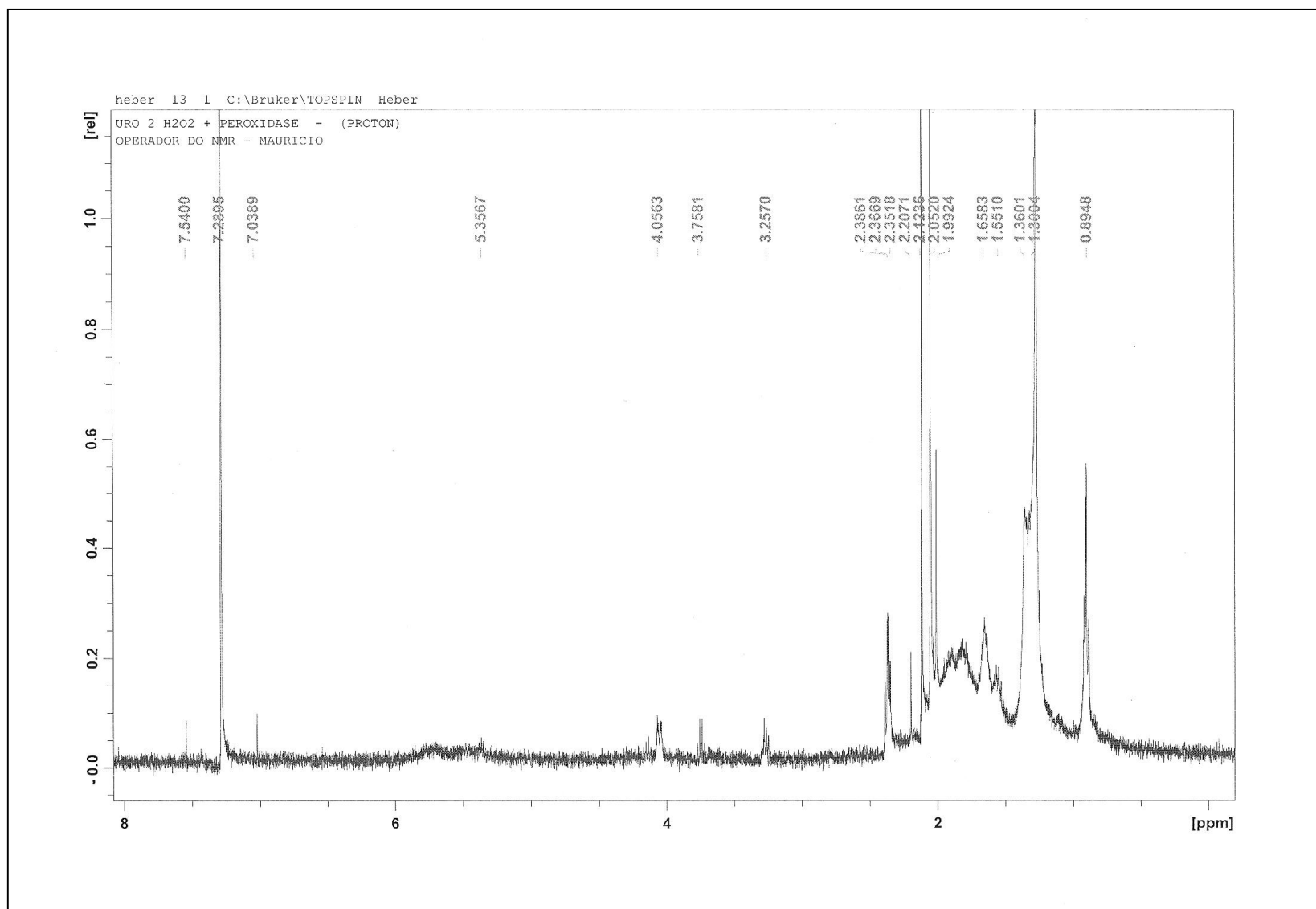


Figura 62. Espectro da RMN H do URO2fhp.

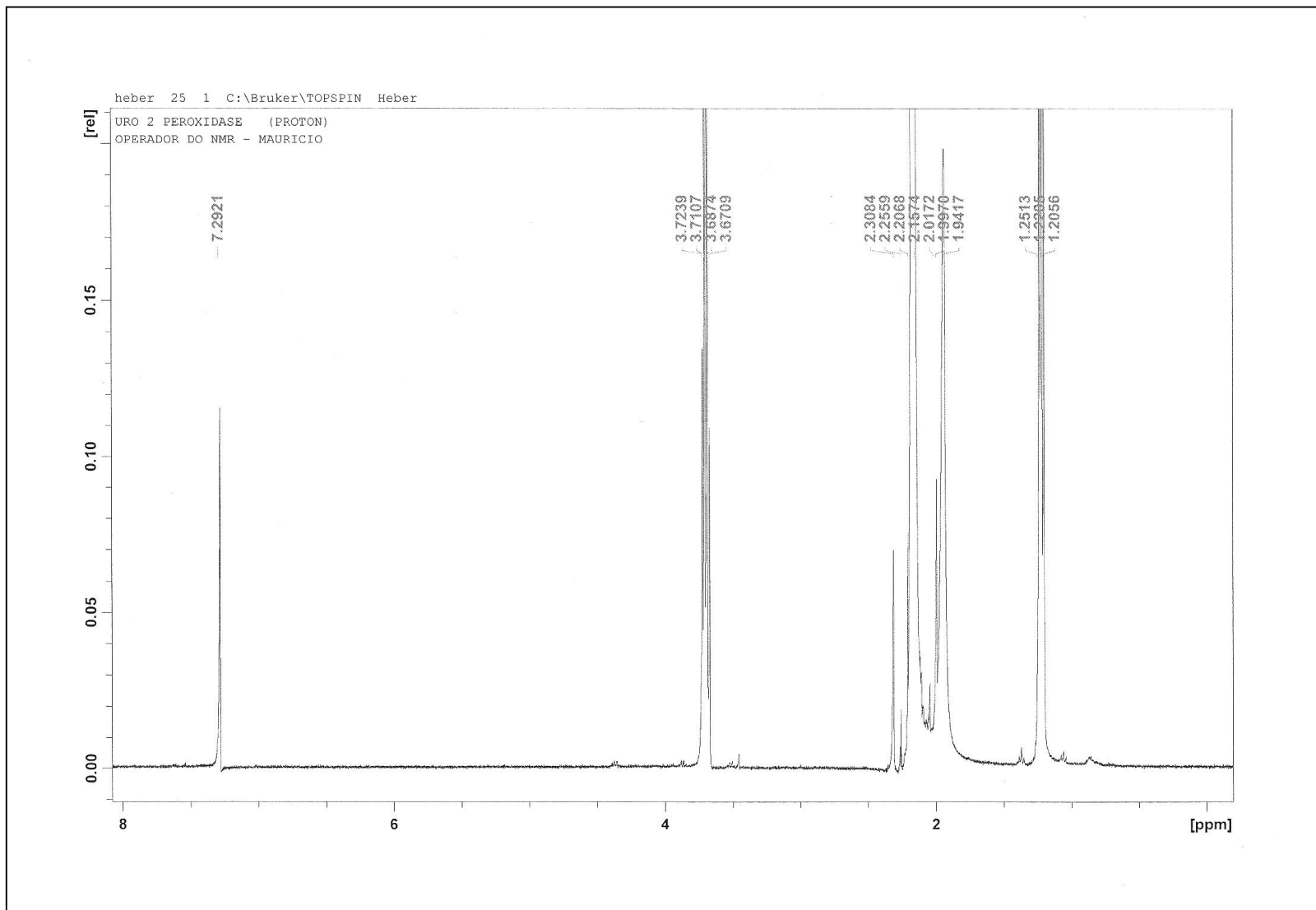


Figura 63. Espectro da RMN H do URO2p.

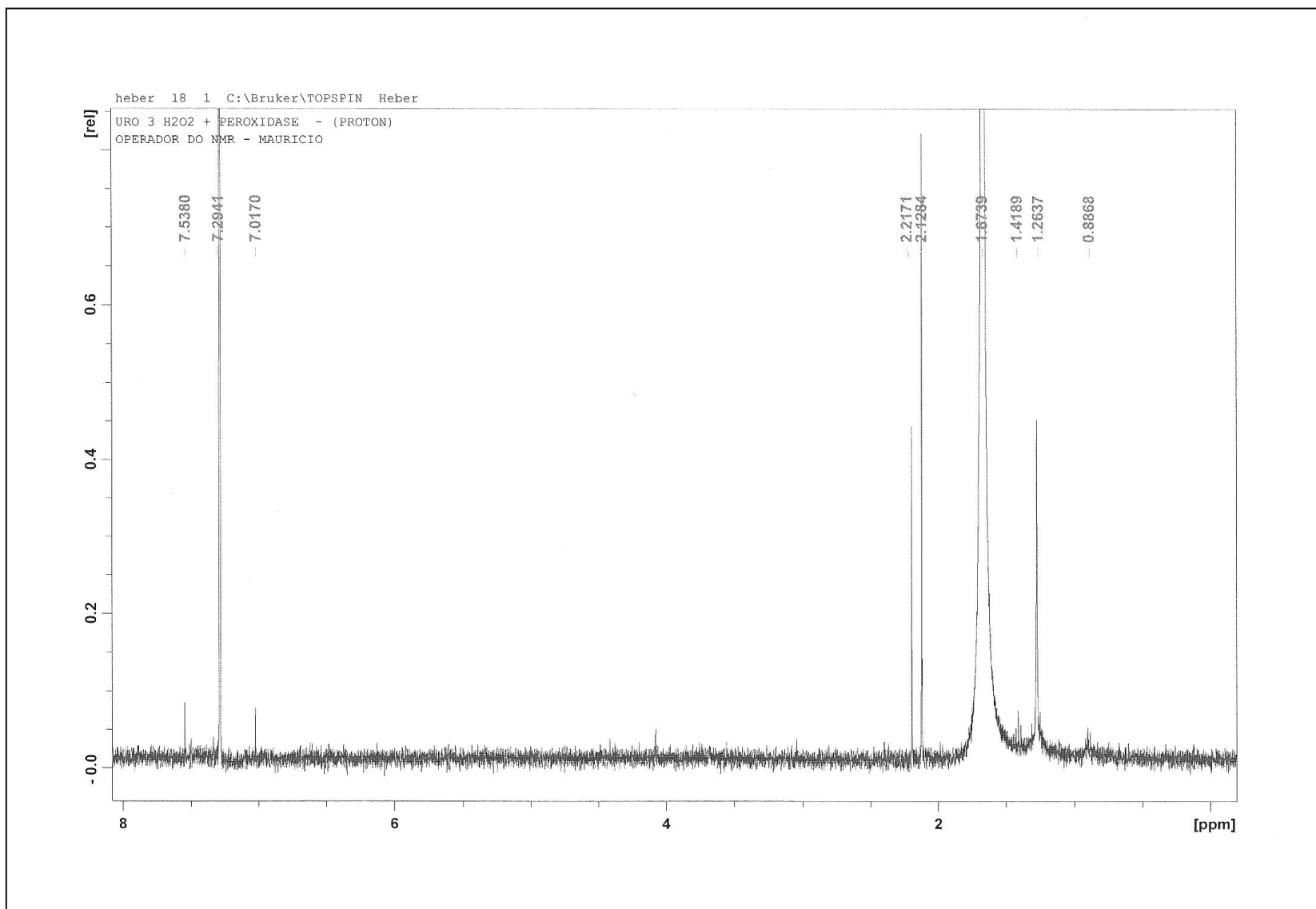


Figura 64. Espectro da RMN H do URO3hp.

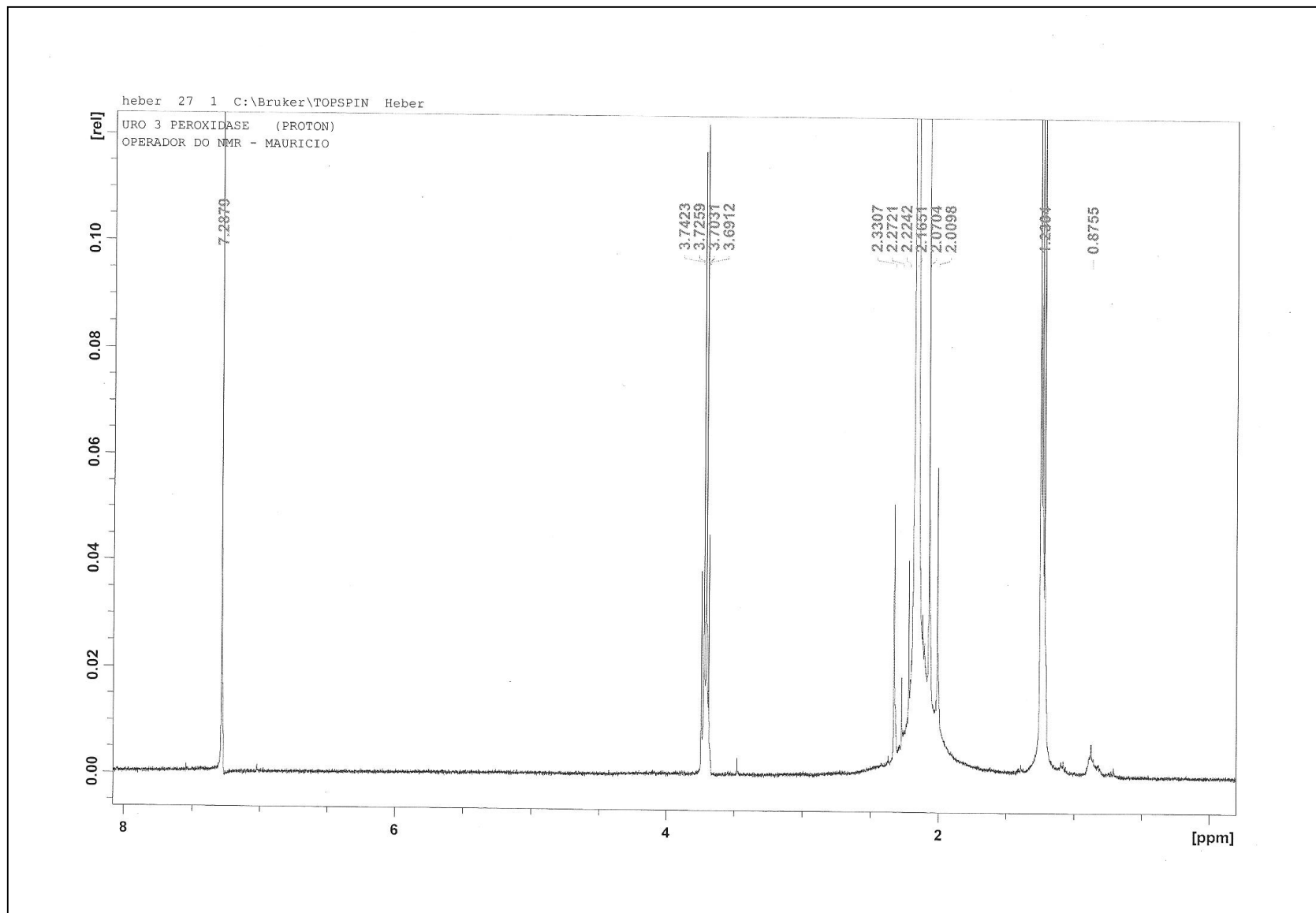


Figura 65. Espectro da RMN H do URO3p.

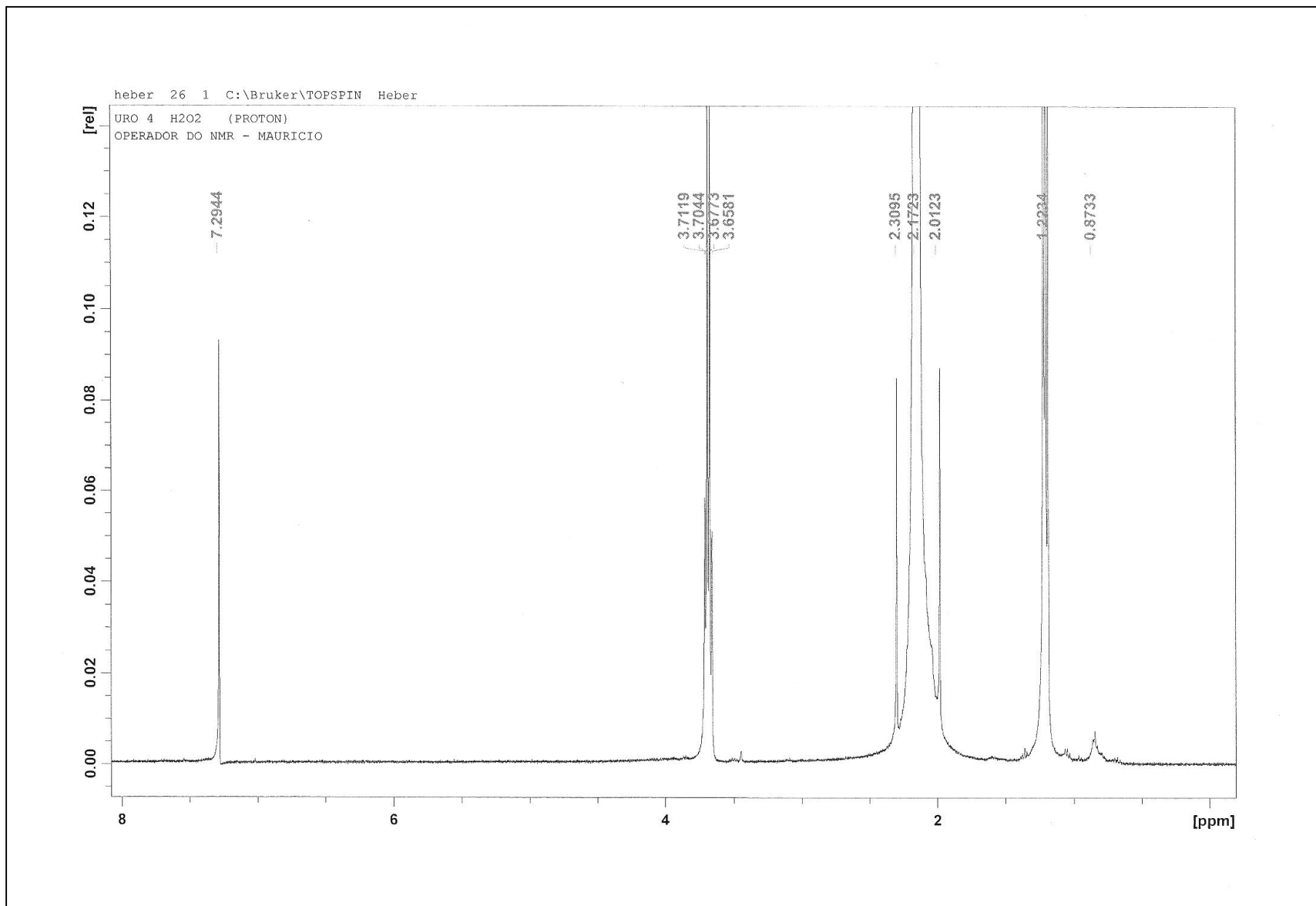


Figura 66. Espectro da RMN H do URO4h.

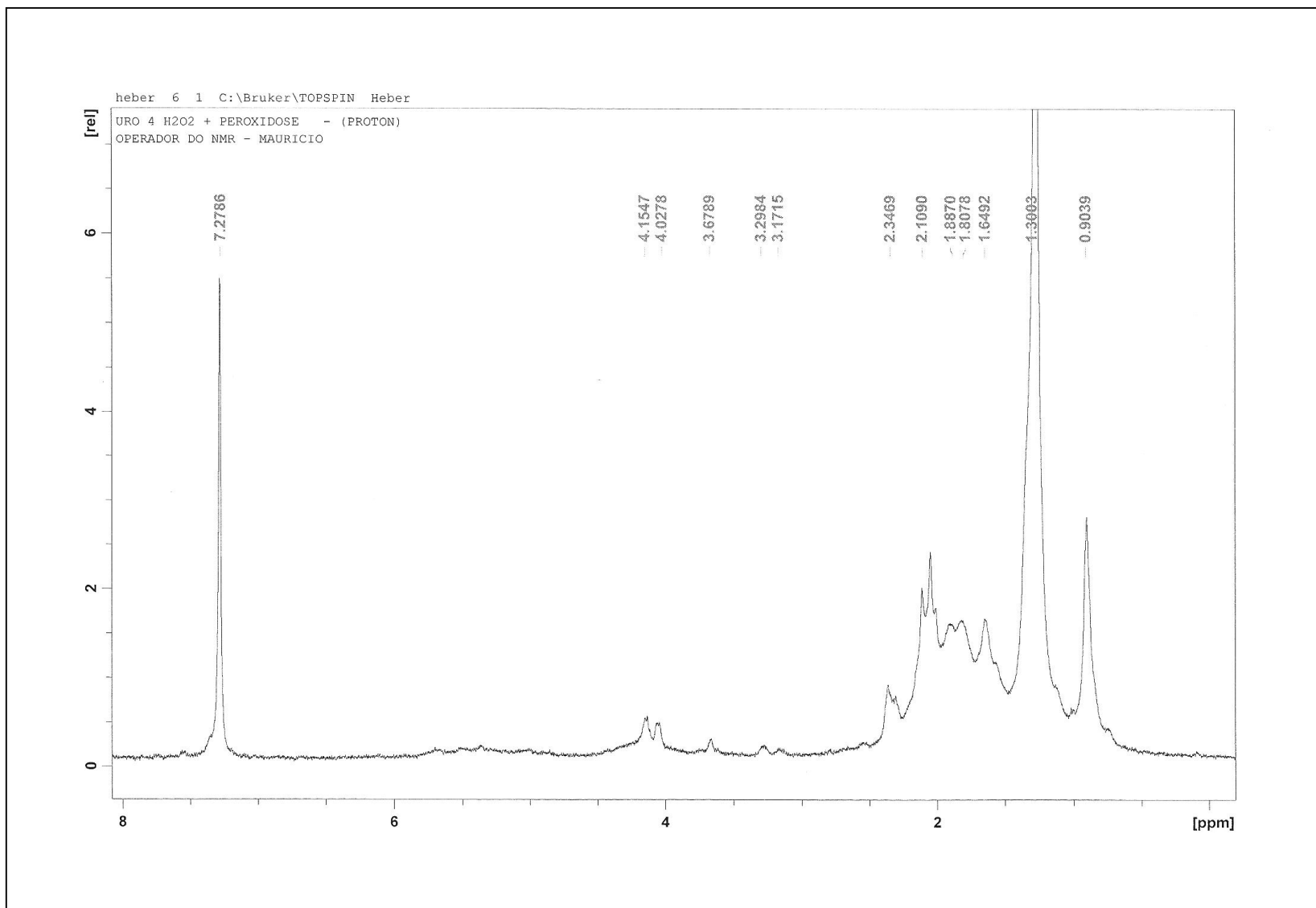


Figura 67. Espectro da RMN H do URO4hp.

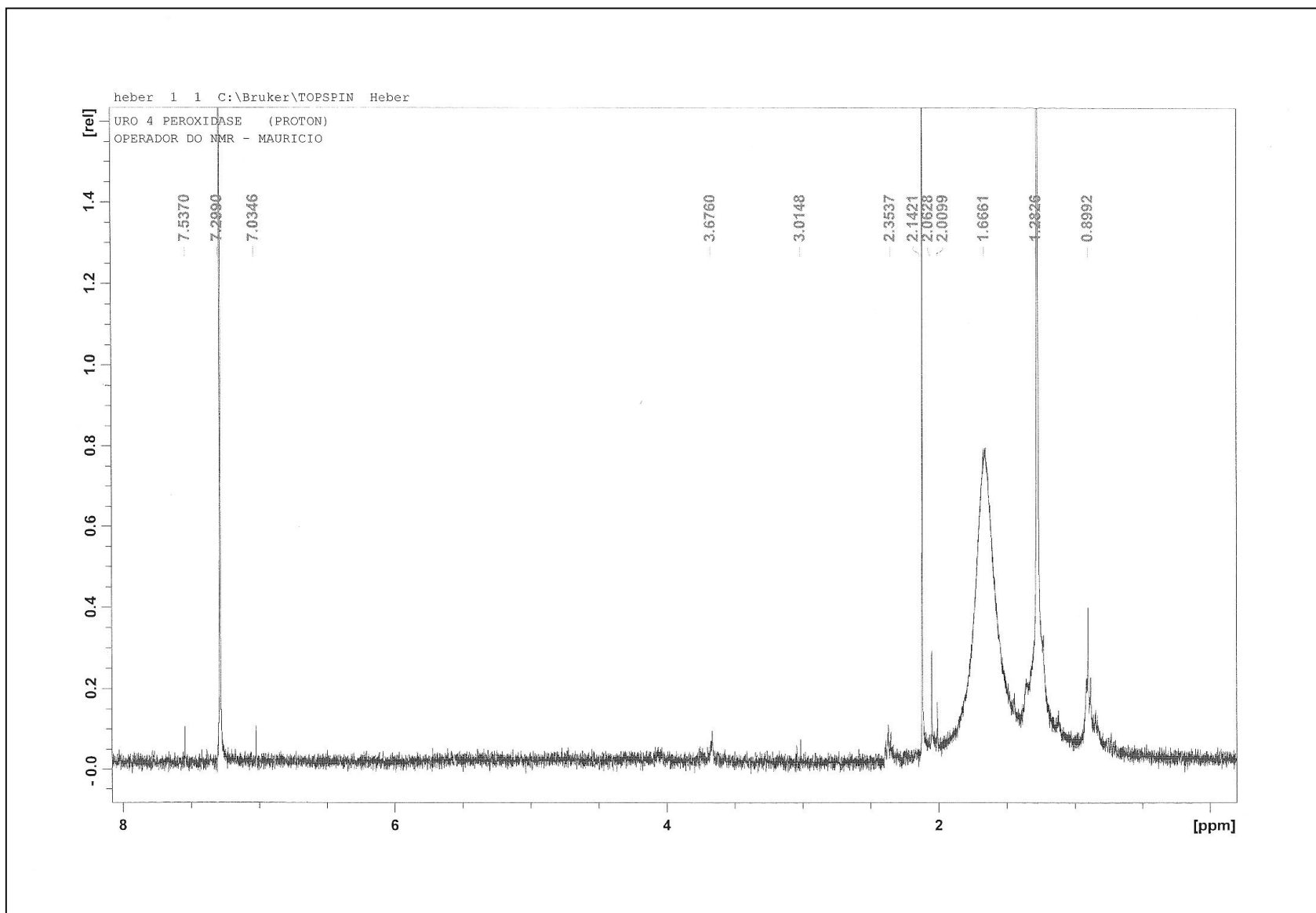


Figura 68. Espectro da RMN H do DEG4p.

ANEXO VIII. Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C

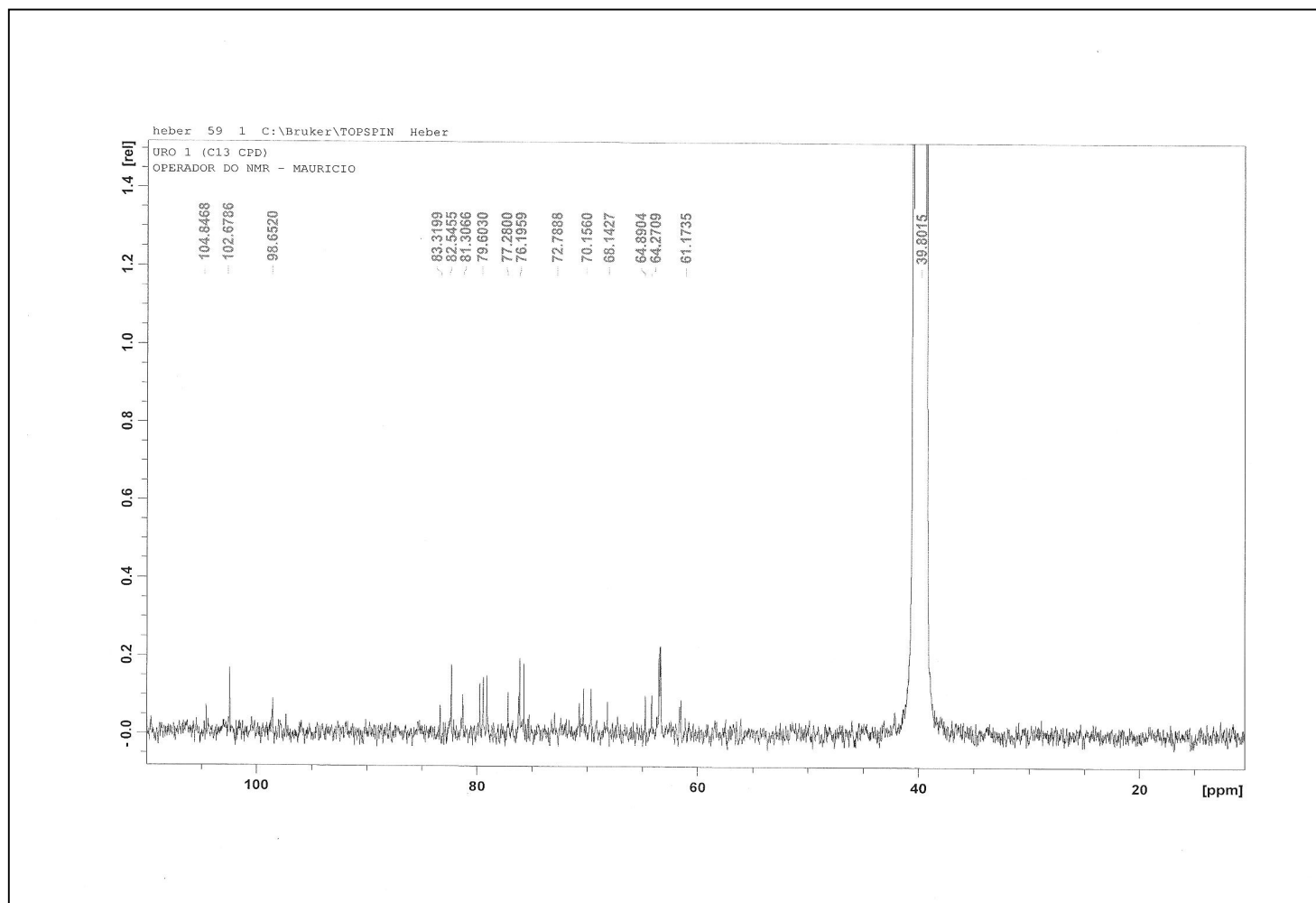


Figura 69. Espectro da RMN ^{13}C do URO1 da lignina extracelular.

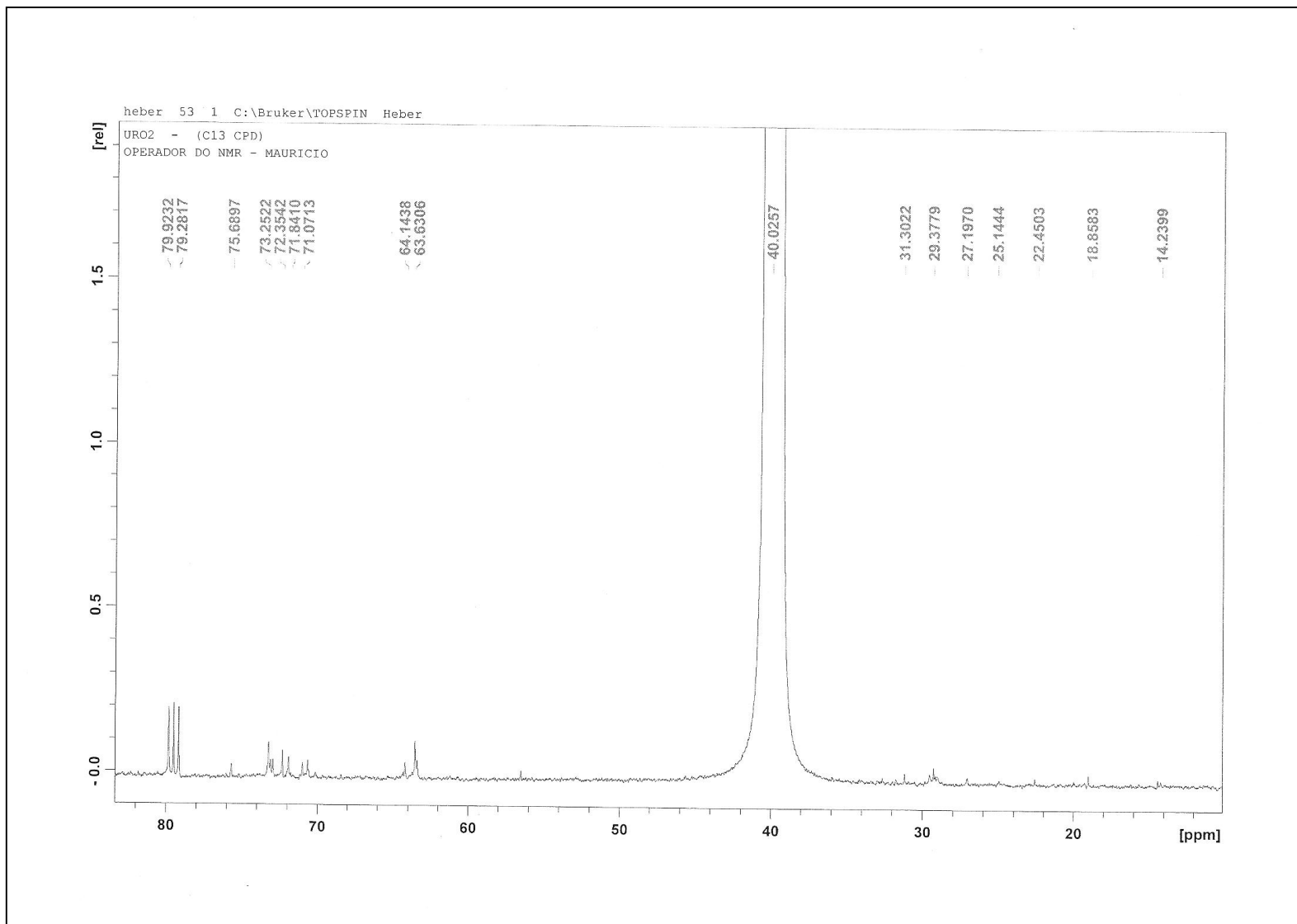


Figura 70. Espectro da RMN ¹³C do URO2 da lignina extracelular.

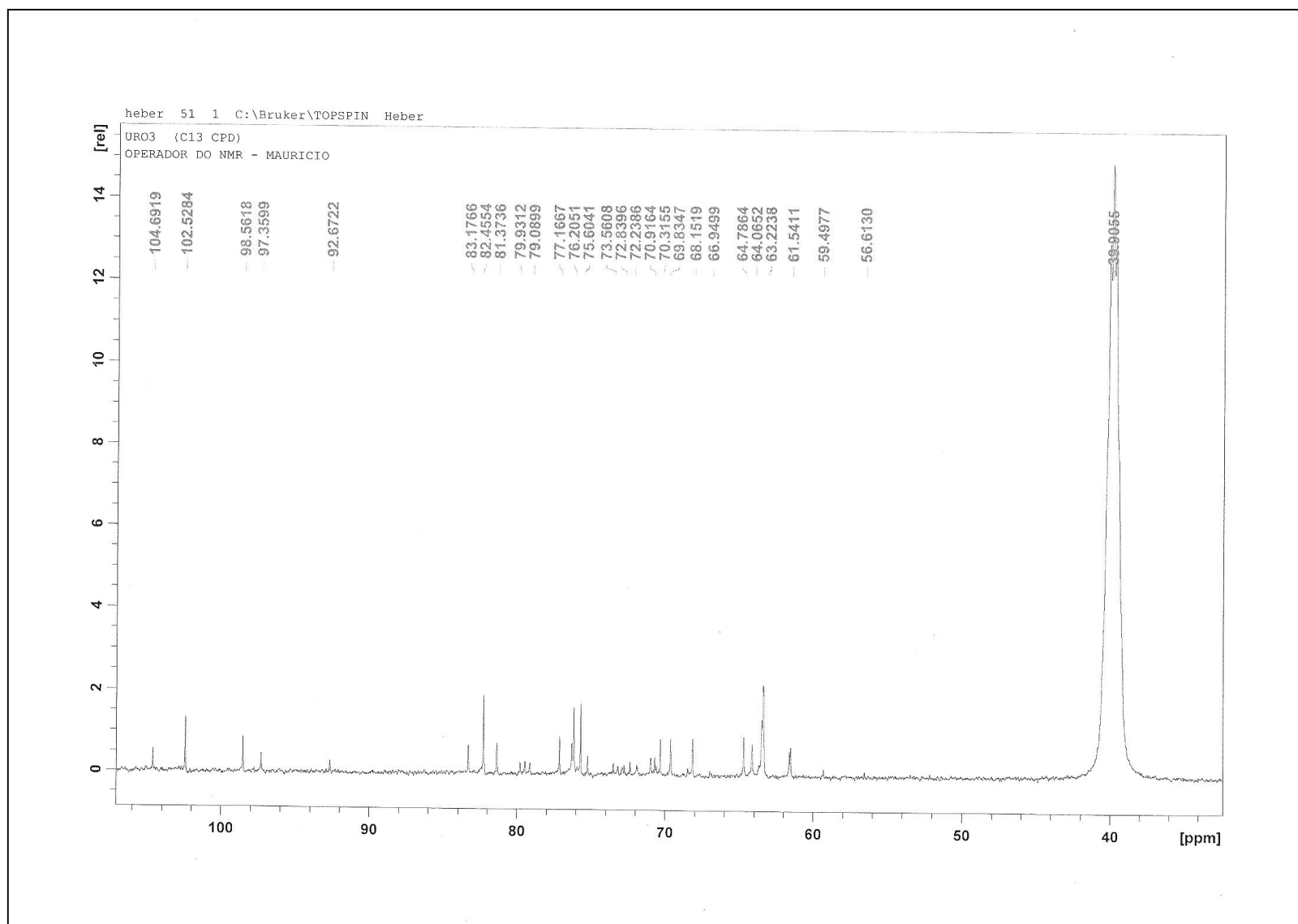


Figura 71. Espectro da RMN ^{13}C do URO3 da lignina extracelular.

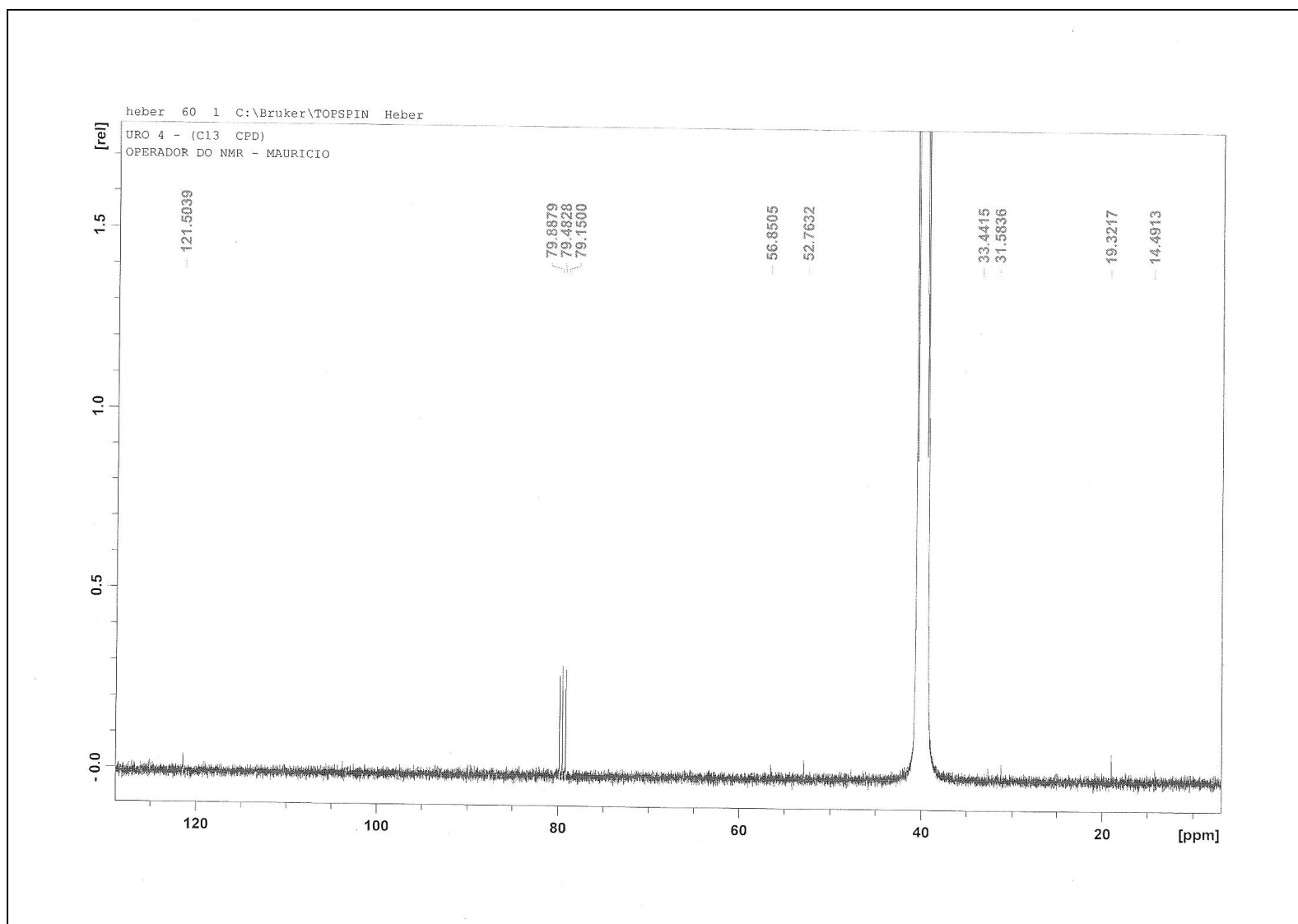


Figura 72. Espectro da RMN ^{13}C do URO4 da lignina extracelular.

