

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

**TESE**

**Sistemas modelos de formação de lignina utilizando recursos sintéticos  
e celulares de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden)**

**REGINA PAULA WILLEMEN PEREIRA**

**2009**



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

**SISTEMAS MODELOS DE FORMAÇÃO DE LIGNINA**  
**UTILIZANDO RECURSOS SINTÉTICOS E CELULARES DE**  
*Eucalyptus grandis* (HILL ex MAIDEN)

**REGINA PAULA WILLEMEN PEREIRA**

*Sob a Orientação do Professor Dr.*

**Heber dos Santos Abreu**

*e Co-orientação da Pesquisadora Dra.*

**Ana Cristina Portugal P. 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**  
**Mai de 2009**

634.973766      Pereira, Regina Paula Willemen -  
P436s              Sistemas modelos de formação  
T                    de lignina utilizando recursos  
                     sintéticos e celulares de  
                     *Eucalyptus grandis* (Hill ex  
                     Maiden)/ Regina Paula Willemen  
                     Pereira. - 2009.  
                     156f. : 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. 116-123.

1. Eucalipto - Teses. 2.  
Lignina - Teses. *Eucalyptus*  
*grandis* - Teses. 4. Eucalipto -  
Propagação *in vitro* - 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**

**REGINA PAULA WILLEMEN PEREIRA**

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: 28/05/2009**

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

**Cláudia Franca Barros. Dr<sup>a</sup>. JBRJ**

**Fábio Akira Mori. Prof. Dr. UFLA**

**Roberto Carlos Costa Lelis. Prof. Dr. UFRRJ**

**Helena Regina Pinto Lima. Dr<sup>a</sup>. UFRRJ**

Dedico com amor e carinho todo meu esforço e crescimento à minha mãe Lucy.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Nossa Senhora Aparecida e os santos que tanto tenho fé pela proteção e doses extras e diárias de proteção e ânimo.

A minha mãe por sua imensa sabedoria de me incentivar nos estudos e na arte.

A minha amiga Beatriz de que tenho uma grande admiração pelo apoio incansável em todos os momentos e principalmente por ficar feliz com minhas alegrias e vitórias.

A D. Florinda pela amizade, pelas orações e pelas missas nos momentos de agradecimentos e por sempre me receber com carinho em sua casa que foi um dos meus espaços de estudo.

Ao Professor Heber pela orientação.

A Pesquisadora Ana Cristina pela fundamental co-orientação.

Ao Professores que de alguma forma me ajudaram no doutorado em especial ao Professor Maeda por sua ajuda na estatística.

Aos colegas do dia a dia de laboratório e da Rural.

Aos funcionários do Instituto de Florestas e do Departamento de Produtos Florestais, principalmente Mendes e Zé.

Aos colegas de Laboratório.

Ao técnico Maurício do Instituto de Química pelos espectros.

A Professora Inês Sabioni da UNB pelos espectros.

Ao Professor Lindoval, ao técnico Ormindio e as alunas de graduação Bianca e Fernanda do Laboratório de Polímeros do Instituto de Tecnologia pela contribuição e ensinamento em algumas análises.

A FAPERJ por contribuir com a montagem e manutenção do Laboratório de Biotecnologia da Madeira.

A Capes pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que contribuíram, ao longo da minha vida, pelo meu crescimento espiritual, pessoal e profissional.

## RESUMO GERAL

PEREIRA, Regina Paula Willemen. **Sistemas modelos de formação de lignina utilizando recursos sintéticos e celulares de *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden)**. 2009. 156p. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Florestais), Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

O objetivo principal desse trabalho foi a elaboração de modelos para o estudo da lignificação. Mudanças de *Eucalyptus grandis*, obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*, foram desenvolvidas visando à obtenção de explantes de segmentos caulinares. Para tal, foram testadas as auxinas TDZ, 2,4-D, ANA e AIA. Não foi constatada a formação de calos nos tratamentos contendo 50,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; 3,0  $\mu\text{M}$  de TDZ e na ausência de regulador de crescimento. Após 210 dias, foi selecionado um calo formado no tratamento contendo 2,5  $\mu\text{M}$  de TDZ. Este calo foi cultivado no mesmo tratamento, porém, em meio líquido e sob agitação por 60 dias a 25 °C no escuro, para indução da formação de lignina da parede celular e ligninas extracelulares. Após este período, as células em suspensão foram submetidas aos seguintes tratamentos: meio MS suplementado com sacarose, 2,4-D + cinetina, ácido *p*-cumárico e sem suplemento extra. As células permaneceram nestes tratamentos por 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo a parcela experimental constituída por um Erlenmeyer contendo 125 ml de cultura de células em suspensão. Para extração e determinação da lignina da parede celular, foi utilizada a técnica baseada na lignina tioglicolato. A concentração de lignina da parede das células e das ligninas extracelulares foi avaliada em UV. Para verificar a normalidade dos dados foi usado o teste Lilliefors. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A maior concentração de lignina na parede celular (371.4200 ppm) foi verificada no tratamento EG1pc 0,0584  $\mu\text{M}$  de sacarose. Ligninas extracelulares também foram analisadas com o reagente Wiesner, RMN H e RMN<sup>13</sup>C. A maior concentração (134.3167 ppm) de ligninas extracelulares foi constatada no tratamento EG3e (100 $\mu\text{M}$  ácido *p*-cumárico). Porém, os resultados de RMN H e RMN<sup>13</sup>C, não permitiram caracterizar a polimerização de lignina extracelular pura. No estudo da lignificação utilizou-se a técnica de polimerização desidrogenativa (DHP) *in vitro*. DHPs foram elaborados em meios obtidos a partir de filtrados das culturas de células em suspensão em diferentes tratamentos. Para cada tratamento, foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase. A produção de DHPs foi efetuada em meio MS (sem o prévio cultivo de células) como substrato no qual três soluções (álcool coniferílico ou sinapílico, peroxidase e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionadas por gotejamento. Os produtos das DHPs, juntamente com os filtrados, foram analisados por IV e RMN H. Nos tratamentos realizados em meio MS sem o prévio cultivo de células em suspensão, os DHPs produzidos foram analisados por RMN H e RMN<sup>13</sup>C. Os espectros de IV não apresentaram sinal na região de 1500 cm<sup>-1</sup>, bem como as análises em RMN H mostraram que não houve formação de DHPs. Porém, nas suspensões celulares tanto em RMN H quanto RMN<sup>13</sup>C apresentaram sinais de DHP, exceto no tratamento com DHP1c (MS + 0,0584  $\mu\text{M}$  sacarose). As análises em RMN H apresentaram: 3.86; 6.92 e 4.71 ppm e de RMN<sup>13</sup>C: 134,26; 88,21; 65,17; 55,90 e 20,75 ppm.

**Palavras chave:** calogênese, lignina, *Eucalyptus grandis*

## GENERAL ABSTRACT

PEREIRA, Regina Paula Willemen. **Systems models of lignin formation using synthetic and cellular resources of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden)**. 2009. 156p. Thesis (Doctor in Environmental and Forest Sciences), Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

The main objective of this research was to work out models for the study of the lignification. *Eucalyptus grandis* seedlings were produced *in vitro*, and the stem segments explants were used to obtain friable callus. For such, the auxins tested were TDZ, 2,4-D, NAA and IAA. The treatments with 50,0  $\mu\text{M}$  2,4-D; 3,0  $\mu\text{M}$  TDZ and in the absence of growth regulator didn't present callus formation. After 210 days, it was chosen a callus formed in the culture medium added with 2,5  $\mu\text{M}$  of TDZ. The selected callus was maintained in the same treatment, however, in liquid medium and under agitation for 60 days at 25 °C in the darkness, to induce cellular wall and extracellular lignin formation. After this period, the cells suspensions were treated in the following order: MS medium supplemented with sucrose, 2,4-D + kinetin, – coumaric acid and without extra supplement. The cells were maintained in these treatments for 30 days. It was used a completely randomized design with four replications. Each plot consisted of an Erlenmeyer with 125 ml of cells suspension culture. For cellular wall lignin extraction and determination, it was used the method of lignin thyoglycolate. The concentration of cellular wall and extracellular lignins were evaluated by UR. For data normality verification it was used the Lilliefors test. The results were statistically analyzed by variance analysis and by Tukey test at 5% level of significance. The highest lignin concentration in the cellular wall (371.4200 ppm) was verified in the treatment EG1pc 0,0584  $\mu\text{M}$  of sucrose. Extracellular lignins were also analyzed with Wiesner reagent, H NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR. The highest concentration (134.3167 ppm) of extracellular lignins was verified in the treatment EG3e of 100 $\mu\text{M}$  – coumaric acid). However, with the results obtained in H NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR analysis, it was not possible to characterize the polymerization of pure extracellular lignin. A very useful tool for lignification study is the dehydrogenized polymerization (DHP) *in vitro*. DHPs were produce in cells suspension filtered medium (substrate) at different treatments. For each treatment, it was added  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxidase or  $\text{H}_2\text{O}_2$  + peroxidase. The DHPs production was done in MS culture medium (without the prior cultivation of cells) as a substrate. It was added to MS medium three different solutions (coniferyl or sinapyl alcohol, peroxidase and the  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by dripping. The products of DHP and the filtered were analyzed by IR and H NMR. The DHPs produced in medium MS without the previous growth of the cells, were analyzed by H NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR. The IR spectra didn't present any sign in the zone of 1500  $\text{cm}^{-1}$ . H NMR also showed no formation of DHPs. Nevertheless, in the, cells suspensions both in H NMR and in  $^{13}\text{C}$ NMR analysis presented signs of DHPs, except the DHP1c (MS + 0,0584  $\mu\text{M}$  sucrose). H NMR presented: 3.86; 6.92; and 4.71 ppm and the  $^{13}\text{C}$ NMR: 134,26; 88,21; 65,17; 55,90; and 20,75 ppm.

**Key words:** calogenesis, lignin, *Eucalyptus grandis*



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Detalhe do segmento caulinar de <i>Eucalyptus grandis</i> usado como explante	15
<b>Figura 2.</b> (A) Visão lateral do calo do tratamento T 5 formado no meio MS contendo 10 µM de ANA e 2,0 µM de TDZ, 210 dias após o cultivo <i>in vitro</i> (B) visão superior do mesmo calo mostrando sua base com coloração bem escura.	17
<b>Figura 3.</b> Relação da combinação e concentração dos reguladores AIA e TDZ na textura dos calos.	18
<b>Figura 4.</b> Calo de textura semifriável (tratamento T 2).	18
<b>Figura 5.</b> Relação da combinação e concentração dos reguladores 2,4-D e TDZ na textura dos calos.	19
<b>Figura 6.</b> Relação da combinação e concentração dos reguladores ANA e TDZ na textura dos calos.	21
<b>Figura 7.</b> Calo de textura compacta (tratamento T 9).	22
<b>Figura 8.</b> Relação das concentrações do regulador TDZ na textura dos calos.	22
<b>Figura 9.</b> Calo de textura friável (tratamento T 10)	23
<b>Figura 10.</b> Relação das concentrações do regulador 2,4-D na textura dos calos.	24
<b>Figura 11.</b> Calo de <i>Eucalyptus grandis</i> do tratamento T 10 (2,5 µM de TDZ). Em meio sólido (A) e em meio líquido formando a suspensão com células livres e microcalos (pequenos aglomerados de células) (B).	52
<b>Figura 12.</b> Células isoladas e agregados celulares de diversos tamanhos cultivadas em meio MS com 0,0584 µM de sacarose (tratamento EG1). As setas mostram algumas células isoladas que se desprenderam dos aglomerados.	53
<b>Figura 13.</b> Aspecto dos meios MS filtrados, os quais foram cultivados as células.	57
<b>Figura 14.</b> Relação entre a concentração de lignina da parede celular com a lignina extracelular através dos dados estatísticos.	60
<b>Figura 15.</b> A, B, C e D Teste de cor com os reagentes Wiesner dos tratamentos EG1e, EG2e, EG3e e EG4e realizados com o meio de cultura das células em suspensão.	61
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN H do tratamento EG1e	63
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN H do tratamento EG2e	64
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN H do tratamento EG3e	65
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN H do tratamento EG4e	66
<b>Figura 20.</b> Montagem experimental para produção de DHP em meio MS fresco e filtrado do cultivo de células.	90
<b>Figura 21.</b> Espectro de IV do tratamento DEG1h.	95
<b>Figura 22.</b> Espectro de IV do tratamento DEG2p.	96
<b>Figura 23.</b> Espectro de IV do tratamento DEG3p.	97
<b>Figura 24.</b> Espectro de IV do tratamento EG4h.	98
<b>Figura 25.</b> Espectro da RMN H da DHP1c	101
<b>Figura 26.</b> Espectro da RMN H da DHP2c	102
<b>Figura 27.</b> Espectro da RMN H da DHP3c	103
<b>Figura 28.</b> Espectro da RMN H da DHP4c	104
<b>Figura 29.</b> Espectro da RMN H da DHP2s	106
<b>Figura 30.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP2c	110

<b>Figura 31.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP3c	111
<b>Figura 32.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP4c	112
<b>Figura 33.</b> DHP2s centrifugada e lavada, obtida a partir de álcool sinapílico.	113
<b>Figura 34.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP2s	114
<b>Figura 35.</b> Infravermelho do tratamento DEG1hp do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	129
<b>Figura 36.</b> Infravermelho do tratamento DEG1p do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	129
<b>Figura 37.</b> Infravermelho do tratamento DEG2h do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	130
<b>Figura 38.</b> Infravermelho do tratamento DEG2hp do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	130
<b>Figura 39.</b> Infravermelho do tratamento DEG3h do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	131
<b>Figura 40.</b> Infravermelho do tratamento DEG3hp do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	131
<b>Figura 41.</b> Infravermelho do tratamento DEG4hp do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	132
<b>Figura 42.</b> Infravermelho do tratamento DEG4p do filtrado da suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	132
<b>Figura 43.</b> Espectro da RMN H da DHP1s	133
<b>Figura 44.</b> Espectro da RMN H da DHP3s	134
<b>Figura 45.</b> Espectro da RMN H da DHP4s	135
<b>Figura 46.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP2c	136
<b>Figura 47.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP3c	137
<b>Figura 48.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP4c	138
<b>Figura 49.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP2s	139
<b>Figura 50.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C da DHP3s	140
<b>Figura 51.</b> Espectro da RMN H do DEG1h	141
<b>Figura 52.</b> Espectro da RMN H do DEG1hp	142
<b>Figura 53.</b> Espectro da RMN H do DEG1p	143
<b>Figura 54.</b> Espectro da RMN H do DEG2h	144
<b>Figura 55.</b> Espectro da RMN H do DEG2hp	145
<b>Figura 56.</b> Espectro da RMN H do DEG2p	146
<b>Figura 57.</b> Espectro da RMN H do DEG3h	147
<b>Figura 58.</b> Espectro da RMN H do DEG3hp	148
<b>Figura 59.</b> Espectro da RMN H do DEG3p	149
<b>Figura 60.</b> Espectro da RMN H do DEG4h	150
<b>Figura 61.</b> Espectro da RMN H do DEG4hp	151
<b>Figura 62.</b> Espectro da RMN H do DEG4p	152
<b>Figura 63.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C do EG1da lignina extracelular	153
<b>Figura 64.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C do EG2 da lignina extracelular	154
<b>Figura 65.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C do EG3 da lignina extracelular	155
<b>Figura 66.</b> Espectro da RMN <sup>13</sup> C do EG4e da lignina extracelular	156

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tratamentos com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento para indução dos calos em explantes de segmentos caulinares em <i>Eucalyptus grandis</i> .	16
<b>Tabela 2.</b> Resultados dos tratamentos de textura dos calos após 210 dias.	25
<b>Tabela 3.</b> Tratamentos utilizados no cultivo de células em suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i> , para induzir a produção de lignina na parede celular e lignina extracelular em meio de cultura básico MS	48
<b>Tabela 4.</b> Comparações através do Teste Tukey em nível de 5% de significância das médias dos teores de lignina da parede das células em suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	57
<b>Tabela 5.</b> Comparações através do Teste Tukey em nível de 5% de significância das médias dos teores das ligninas extracelulares do meio de suspensão de <i>Eucalyptus grandis</i>	59
<b>Tabela 6.</b> Sinais, atribuições e estruturas da RMN H das amostras analisadas	62
<b>Tabela 7.</b> Tratamentos para formação de produtos nos filtrados dos meios de cultura MS líquido nos quais foram cultivadas células em suspensão de <i>E. grandis</i>	90
<b>Tabela 8.</b> Tratamentos utilizados para a formação dos DHPs de álcool coníferílico realizados em meio MS.	91
<b>Tabela 9.</b> Tratamentos utilizados para a obtenção dos DHPs de álcool sinapílico realizados em meio MS.	92
<b>Tabela 10.</b> Atribuições dos sinais dos espectros de RMN <sup>13</sup> C dos DHPs do álcool coníferílico	109
<b>Tabela 11.</b> Valores das medições de absorvância (280nm) e concentração de lignina da parede celular	126
<b>Tabela 12.</b> Valores das medições de absorvância (280nm) e concentração de lignina extracelular	126
<b>Tabela 13.</b> Análise de Variância do teor de lignina da parede celular	127
<b>Tabela 14.</b> Análise de Variância do teor de lignina extracelular	127
<b>Tabela 15.</b> Peso dos produtos formados com o meio extracelular suplementado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , peroxidase e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase após centrifugação e liofilização	128

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{13}\text{C}$	carbono-13
$\text{CDCl}_3$	clorofórmio
$\text{DMSO-d}_6$	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)
$\mu\text{M}$	Micromolar
pH	Potencial hidrogeniônico
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
$\mu\text{L}$	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)
$5\text{-5}$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
$\text{Ca}^{2+}$	íons cálcio
$\text{Mn (III)}$	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
$\text{Ca(OH)}_2$	Hidróxido de cálcio ou cal hidratada
$\beta\text{-1}$	tipo de ligação formadas por unidades fenilpropanóides (unidades estruturais)
N	normal (normalidade)
$^{18}\text{O}$	Oxigênio-18
T 1	tratamento para a formação de calo com AIA e TDZ em meio sólido
T 2	tratamento para a formação de calo com AIA e TDZ em meio sólido
T 3	tratamento para a formação de calo com 2,4-D e TDZ em meio

	sólido
T 4	tratamento para a formação de calo com 2,4-D e TDZ em meio sólido
T 5	tratamento para a formação de calo com ANA e TDZ em meio sólido
T 6	tratamento para a formação de calo com ANA e TDZ em meio sólido
T 7	tratamento para a formação de calo com TDZ em meio sólido
T 8	tratamento para a formação de calo com TDZ em meio sólido
T 9	tratamento para a formação de calo com TDZ em meio sólido
T 10	tratamento para a formação de calo com TDZ em meio sólido
T 11	tratamento para a formação de calo com TDZ em meio sólido
T 12	tratamento para a formação de calo com ANA e TDZ em meio sólido
T 13	tratamento para a formação de calo com ANA e TDZ em meio sólido
T 14	tratamento para a formação de calo com ANA e TDZ em meio sólido
T 15	tratamento para a formação de calo com 2,4-D em meio sólido
T 16	tratamento para a formação de calo com 2,4-D em meio sólido
T 17	tratamento para a formação de calo com 2,4-D em meio sólido
T 18	tratamento para a formação de calo com 2,4-D em meio sólido
T 19	tratamento para a formação de calo com 2,4-D em meio sólido
T 20	tratamento para a formação de calo com 2,4-D em meio sólido
T 21	tratamento para a formação de calo sem adição de regulador de crescimento em meio sólido
EG1pc	tratamento para indução e/ou alteração na lignificação da parede celular com sacarose em meio líquido
EG2pc	tratamento para indução e/ou alteração na lignificação da parede celular com 2,4-D + cinetina em meio líquido
EG3pc	tratamento para indução e/ou alteração na lignificação da parede celular com ácido <i>p</i> -cumárico em meio líquido
EG4pc	tratamento para indução e/ou alteração na lignificação da parede celular sem adição suplementar extra em meio líquido
EG1e	tratamento para indução de lignina extracelular com sacarose em meio líquido
EG2e	tratamento para indução de lignina extracelular com 2,4-D + cinetina em meio líquido
EG3e	tratamento para indução de lignina extracelular com ácido <i>p</i> -cumárico em meio líquido
EG4e	tratamento para indução de lignina extracelular sem adição suplementar extra em meio líquido
DEG1h	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com sacarose
DEG2h	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com 2,4-D + cinetina
DEG3h	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com ácido

	<i>p</i> -cumárico
DEG4h	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio sem suplemento extra
DEG1p	tratamento com peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com sacarose
DEG2p	tratamento com peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com 2,4-D + cinetina
DEG3p	tratamento com peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com ácido <i>p</i> -cumárico
DEG4p	tratamento com peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio sem suplemento extra
DEG1hp	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com sacarose
DEG2hp	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com 2,4-D + cinetina
DEG3hp	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio suplementado com ácido <i>p</i> -cumárico
DEG4hp	tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase para formação de produtos nos filtrados das células em suspensão cultivadas em meio sem suplemento extra
DHP1c	tratamento para a formação dos DHPs de álcool coniferílico em meio MS suplementado com sacarose
DHP2c	tratamento para a formação dos DHPs de álcool coniferílico em meio MS suplementado com 2,4-D + cinetina
DHP3c	tratamento para a formação dos DHPs de álcool coniferílico em meio MS suplementado com ácido <i>p</i> -cumárico
DHP4c	tratamento para a formação dos DHPs de álcool coniferílico em meio MS suplementado sem suplemento extra
DHP1s	tratamento para a formação dos DHPs de álcool sinapílico em meio MS suplementado com sacarose
DHP2s	tratamento para a formação dos DHPs de álcool sinapílico em meio MS suplementado com 2,4-D + cinetina
DHP3s	tratamento para a formação dos DHPs de álcool sinapílico em meio MS suplementado com ácido <i>p</i> -cumárico
DHP4s	tratamento para a formação dos DHPs de álcool sinapílico em meio MS sem suplemento extra

## LISTA DE ABREVIACOES

IV	infravermelho
DHP	polímero de oxidação desidrogenativa
MS	meio nutritivo Murashige & Skoog
TDZ	thidiazuron
AIA	cido 3 indol-acético
ANA	cido naftaleno-acético
2,4-D	cido 2,4-diclorofenoxiacético
BOD	câmara incubadora
UV	Ultravioleta
BA	6-benziladenina
PAL	Fenilalanina-amônia-liase
BAP	6-benzilaminopurina
RMN	ressonância magnética nuclear
ppm	parte por milhão

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	1
<b>CAPÍTULO I</b>	3
<b>RESUMO</b>	4
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	6
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	8
2.1 Biotecnologia Florestal	8
2.2 Atuação dos hormônios vegetais e/ou reguladores de crescimento na planta e na cultura <i>in vitro</i>	8
2.2.1 Auxina	11
2.2.2 Citocinina	12
2.3 Culturas de tecidos	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	14
3.1 Produção de mudas	14
3.1.1 Desinfestação das sementes	14
3.1.2 Germinação das sementes	14
3.2 Indução de calos	14
3.2.1 Tratamentos	15
3.3 Avaliação dos calos	16
<b>4. RESULTADOS e DISCUSSÃO</b>	17
4.1 Textura	17
<b>5. CONCLUSÕES</b>	26
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	27
<b>CAPÍTULO II</b>	38
<b>RESUMO</b>	39
<b>ABSTRACT</b>	40
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	41
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	43
2.1 Aspectos gerais	43
2.2 Sacarose	44
2.3 Estudos sobre lignina em cultura de células em suspensão	44
2.4 Bioquímica da lignificação	46
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	47
3.1 Seleção do calo	47
3.2 Preparo do meio de cultura para produção de células em suspensão	47
3.3 Tratamentos para a formação de lignina extracelular	47
3.3.1 Solução de ácido <i>p</i> -cumárico	48
3.4 Separação das células e aglomerados celulares dos meios de cultura líquidos	48
3.5 Teste de cor com o reagente Wiesner (Floroglucinol-HCl)	49
3.6 Extração e separação de lignina da parede celular	49
3.7 Quantificação de lignina por espectroscopia UV da parede celular e	



lignina extracelular	49
3.8 Espectroscopia de IV para as ligninas extracelulares	50
3.9 RMN H ligninas extracelulares	50
3.10 RMN <sup>13</sup> C ligninas extracelulares	51
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	52
4.1 Calo escolhido para início do cultivo das células em suspensão	52
4.2 Quantificação de lignina da parede celular por espectrofotometria de UV	52
4.2.1 Tratamento EG1pc	53
4.2.2 Tratamento EG2pc	54
4.2.3 Tratamento EG3pc	55
4.2.4 Tratamento EG4pc	55
4.3 Quantificação de ligninas extracelulares por espectrofotometria de UV	57
4.3.1 Tratamento EG1e	58
4.3.2 Tratamento EG2e	58
4.3.3 Tratamento EG3e	58
4.3.4 Tratamento EG4e	58
4.4 Relação entre as concentrações de lignina da parede celular com a lignina extracelular	59
4.5 Wiesner (Floroglucinol-HCl)	61
4.6 RMN H lignina extracelular	61
4.7 RMN <sup>13</sup> C lignina extracelular	67
<b>5. CONCLUSÕES</b>	68
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	69
<b>CAPÍTULO III</b>	77
<b>RESUMO</b>	78
<b>ABSTRACT</b>	79
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	80
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	82
2.1 Desidrogenação Polimérica de Monolignóis (DHP)	82
2.2 Estudos com DHPs	82
2.2.1 Biossíntese	83
2.2.2 Estrutura	84
2.2.3 Degradação	86
2.3 Proteínas na lignificação	87
2.4 Ligações no processo da lignificação	88
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	89
3.1 Experimento para obtenção de produtos extracelulares liberados pelas células	89
3.2 Experimento para formação de DHPs em meio de cultura MS	91
3.3 Acetilação	92
3.4 Infravermelho dos DHPs filtrados das células	92
3.5 RMN H dos DHPs dos filtrados das células e DHPs do meio MS	92
3.6 Análise dos deslocamentos químicos para os espectros de RMN <sup>1</sup> H	93
3.7 RMN <sup>13</sup> C DHPs do meio MS	93

3.8 Análise dos deslocamentos químicos para os espectros de RMN <sup>13</sup> C	93
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	94
4.1 IV dos produtos formados em meio extracelular com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , peroxidase e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase.	94
4.2 RMN H dos DHPs dos filtrados das células	98
4.3 RMN H dos DHPs do meio MS	99
4.3.1 DHPs de álcool coniferílico realizados em meio MS	99
4.3.1.1 DHP1c	99
4.3.1.2 DHP2c	99
4.3.1.3 DHP3c	100
4.3.1.4 DHP4c	100
4.3.2 DHPs de álcool sinapílico realizados em meio MS	105
4.4 RMN <sup>13</sup> C DHPs do meio MS	107
4.4.1 DHPs de álcool coniferílico realizados em meio MS	107
4.4.1.1 DHP1c	107
4.4.1.2 DHP2c	107
4.4.1.3 DHP3c	107
4.4.1.4 DHP4c	107
4.5 DHPs de álcool sinapílico realizados em meio MS	113
4.5.1 DHP2s	113
<b>5. CONCLUSÕES</b>	115
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	116
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS</b>	124
<b>8. ANEXOS</b>	125
ANEXO I. Tabelas absorvância e concentração dos teores de lignina da parede celular e lignina extracelular	126
ANEXO II. Tabelas da Análise de Variância	127
ANEXO III. Tabela de pesos dos produtos formados do meio extracelular com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , peroxidase e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase	128
ANEXO IV. Espectros do Infravermelho do meio extracelular com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + peroxidase e peroxidase	129
ANEXO V. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs do álcool sinapílico	133
ANEXO VI. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do <sup>13</sup> C das DHPs do álcool coniferílico e sinapílico	136
ANEXO VII. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs	141
ANEXO VIII. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do <sup>13</sup> C da Lignina Extracelular	153

## INTRODUÇÃO GERAL

A principal fonte de matéria-prima florestal atualmente, são as florestas plantadas para os diversos segmentos da indústria como, celulose e papel, painéis de madeira, carvão vegetal destinado à siderúrgica, produtos sólidos de madeira, móveis de madeira, entre outros (ABRAF, 2008). Como o maior recurso renovável, a madeira tem funções utilitárias na construção, indústria de papel e como fonte de combustível em países em desenvolvimento (MCDOUGALL et al., 1993).

Para o comércio mundial, a madeira é o quinto produto mais importante abastecendo o mercado como combustível, fibras, madeira serrada e produtos com várias finalidades (PLOMION et al., 2001). Os autores ressaltam ainda que a complexa composição química (celulose, hemicelulose, lignina, e pectinas) faz da madeira uma matéria-prima ideal para uma futura indústria “ligno-química” que poderia substituir a indústria petroquímica, não só fornecendo plásticos e diversos tipos de produtos químicos, bem como alimento e produtos têxteis. Além de sua utilização como biomassa (energia), adesivos naturais, entre outros.

Assim, o eucalipto que é uma planta lenhosa perene que exibe excelente produtividade, boa qualidade de fibra, e alto rendimento de polpa, tem sido extensivamente cultivado ao redor do mundo (TURNBULL, 1991; TRAVERT et al., 1997; PAUX et al., 2004). O gênero *Eucalyptus* contém muitas espécies de importância comercial (ELDRIDGE et al., 1994). O Brasil possui vantagens para o desenvolvimento do eucalipto; dessa forma, sua madeira desempenha importante papel na economia do país (SANTOS et al., 2007). O eucalipto é um recurso em matéria-prima determinante para as indústrias do setor florestal no Brasil e no mundo. Segundo BARBOSA et al. (2008), a composição química dos componentes macromoleculares da parede celular da madeira do *Eucalyptus grandis*, por exemplo, é de extrema importância para o desenvolvimento da biotecnologia e análise da qualidade dos produtos finais.

A madeira de eucalipto é fonte dominante de matéria-prima para a indústria de celulose e papel no Brasil e no mundo. O conhecimento da composição química específica dos componentes macromoleculares desta madeira é crucial para a avaliação de sua qualidade e otimização da tecnologia no controle de qualidade dos processos de produção da polpa de celulose e papel.

Na formação da madeira, vários processos bioquímicos ocorrem, e nestes insere-se a biossíntese de lignina e sua deposição na parede celular. A lignina é uma substância da parede celular que, com suas características químio-físicas, imprime aspectos relevantes como à designação do produto final. Os processos de formação da parede celular e da madeira, por serem ricos em detalhes, levam à realização de um grande número de trabalhos de pesquisa (MELLEROWICZ et al., 2001; SOMERVILLE et al., 2004; MELLEROWICZ & SUNDBERG, 2008). Como foco importante destas pesquisas está a manipulação da lignina, visando a obtenção de diversos produtos (BAUCHER et al., 2003). As ligninas são macromoléculas fenólicas complexas derivadas do metabolismo dos fenilpropanóides e representam 30% da biomassa lenhosa da Terra, porém, muitos aspectos concernentes a sua biossíntese e regulação ainda precisam ser elucidados (RANOCHA et al., 1999; DAVIN et al., 2008). A lignina tem sido foco de interesse e seu estudo é complexo e relevante para a indústria do setor florestal.

A lignina não é a única substância presente na parede das células. Na realidade, existe um sistema multi-molecular, formando ligações. Uma das substâncias que ocorre na parede celular formando ligações com a lignina são as proteínas estruturais. Sendo

assim, a lignina e as proteínas da parede celular permitem desvendar questões, tais como sua arquitetura molecular entre outras. Esse conhecimento ultrapassa a importância que a lignina exerce nas plantas, pois, os trabalhos de pesquisa que têm sido conduzidos, conjugam o potencial valor que a biotecnologia pode agregar ao estudo da lignificação, fomentando o conhecimento científico e tecnológico para a indústria de produtos florestais.

GRATTAPAGLIA et al. (2004) ressaltam a importância de se conhecer mais detalhadamente os processos metabólicos e fisiológicos da formação da madeira em *Eucalyptus*. Assim, esse trabalho é imprescindível como referência para o conhecimento dos processos concernentes à lignificação de angiosperma considerando que a literatura existente trata com ênfase do modelo de unidades estruturais em cultura de células tipicamente para lignina de gimnosperma.

É fundamental que o estudo da lignina acompanhe a evolução das ferramentas biotecnológicas. Dessa forma, os setores da indústria florestal podem se beneficiar muito mais da pesquisa sobre o processo de lignificação e o que este processo pode proporcionar aos diversos produtos finais da madeira, além da celulose e do papel, como, por exemplo, a bioenergia (biomassa).

Dessa forma, a elucidação da relação de diferentes tratamentos com possíveis elicitores para a formação da lignina faz desse trabalho um referencial de importância presente e futura. Para melhor compreender o desenvolvimento desse trabalho – por se tratar de um estudo com questões diversas e interdependentes – este foi dividido em capítulos.

O capítulo I trata do desenvolvimento de um protocolo para a indução de calos visando à obtenção de material vegetal para a condução dos vários tratamentos realizados, bem como objetiva o estabelecimento da cultura *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, gerando informações que possam mitigar as dificuldades frequentemente encontradas na cultura de tecidos de plantas lenhosas.

As particularidades que cerceiam a produção e o isolamento de lignina extracelular produzida no cultivo de células de *Eucalyptus grandis* em suspensão estão relatadas no capítulo II.

E o capítulo III através das análises de espectroscopias de RMN H e de infravermelho compara os DHPs formados a partir do meio de cultura líquido onde foram cultivadas as células com os DHPs formados a partir do meio de cultura líquido sem o prévio cultivo de células.

O presente trabalho tem como objetivo geral tratar de forma investigativa a formação da lignina extracelular em células cultivadas *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, bem como a caracterização e comparação da lignina extracelular produzida a partir de células de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* e a lignina sintética. mediante a utilização de possíveis elicitores, contribuindo para a elucidação do processo de lignificação, a formação de DHP em meio MS (meio nutritivo descrito por Murashige e Skoog) contendo células cultivadas e em meio MS sem o prévio cultivo de células. Dessa forma, constando se houve realmente formação de lignina extracelular. Assim, com o uso de ferramentas biotecnológicas, esse trabalho procurou investigar sobre a biossíntese da lignina, visando à formulação de um modelo de estudo da lignificação em circunstâncias laboratoriais.

## **CAPÍTULO I**

### **CALOGÊNESE DE *Eucalyptus grandis* (HILL ex MAIDEN)**

## RESUMO

Neste trabalho, a calogênese foi induzida utilizando-se reguladores de crescimento em diferentes concentrações, visando à obtenção de calos friáveis a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus grandis*. Para isso, as sementes foram desinfestadas superficialmente e colocadas em frascos de vidro (250 mL) contendo 25 mL de meio de cultura sólido. A composição deste meio foi sais minerais do meio MS, suplementado de 0,3% de fitagel e 3% de sacarose. Em cada frasco foram inoculadas aproximadamente de 5 a 10 sementes e as culturas mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 mmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, durante 30 dias para a germinação. Segmentos caulinares de aproximadamente 1 cm foram excisados de mudas de 30 dias para a indução de calogênese. Os explantes foram inoculados no meio MS contendo diferentes concentrações e combinações da citocinina TDZ e das auxinas AIA, ANA e 2,4-D totalizando 21 tratamentos, incluindo a testemunha. Os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo 40 mL de meio nutritivo sólido e mantidos em regime de escuridão a temperatura de 25°C por 210 dias em BOD. Os calos obtidos foram subcultivados a cada 30 dias, para o mesmo meio de cultura. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. A unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri contendo cinco explantes por placa. Os calos foram avaliados visualmente e por manipulação durante 210 dias de cultivo *in vitro* quanto à textura. Esta característica foi avaliada utilizado-se o seguinte critério: I (calo friável – células fracamente unidas, fáceis de serem separadas); II (calo compacto – células fortemente unidas, difíceis de serem separadas); III (calo semifriável - calo com características intermediárias entre o friável e o compacto, isto é, apresentando porções compactas e friáveis). Os explantes que não produziram calos foram aqueles cultivados nos tratamentos contendo 50,0 µM de 2,4-D; 3,0 µM de TDZ na ausência de regulador de crescimento (testemunha). Os melhores protocolos para manutenção de calos friáveis obtidos a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus grandis* foram os que continham apenas TDZ.

**Palavras-chave:** produção de lignina, segmentos caulinares, calos friáveis, *Eucalyptus grandis*

## ABSTRACT

In this work, the calogenesis was induced by growth regulators at different concentrations, to obtain crumbly callus from *Eucalyptus grandis* stem segments explants. For that, its seeds were surface disinfested, and inoculated in glass bottle containing 25 mL of solid medium culture composed by MS mineral salts supplemented with 0,3% of phytigel and 3% of sucrose. From 5 to 10 seeds were inoculated in each glass bottle. The cultures were maintained in a growth room, at 25°C, 16 hours photoperiod and 30 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> luminous intensity, for a period of 30 days to germinate. Stems segments explants with approximately 1 cm length were excised from 30 days old seedlings, to induce calogenesis. The explants were inoculated in the MS medium containing different concentrations and combinations of TDZ cytokinin and IAA, NAA and 2,4-D auxins, resulting in 21 treatments, including the control. . The explants were inoculated in Petri dishes containing 40 mL of solid medium culture and maintained at darkness and 25°C for 210 days, in BOD. The calluses obtained were sub-cultivated every 30 days, in the same medium. It was used a completely randomized design with five replications. Each plot consisted of a Petri dish with five explants. The calluses were evaluated visually and by manipulation, for 210 days of cultivation *in vitro* for the texture. This characteristic was evaluated at the following criterion: I (I crumbly callus - cells weakly attached, easy to be separated); II (compact callus - cells strongly united, difficult to be separated); III semifriable callus (callus with intermediate characteristics between friable and compact, that is, with compact and crumbly portions). Explants maintained in treatments with 50,0 µM 2,4-D; 3,0 µM of TDZ and in absence of growth regulator (control) didn't form callus. The best protocols for the maintenance of crumbly callus from *Eucalyptus grandis* stem segments, were the ones that TDZ was used alone.

**Key words:** lignin production, stems segments; friable callus, *Eucalyptus grandis*

## 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia de plantas surgiu com o propósito de tentar solucionar os problemas agrícolas sob uma nova ótica, empregando metodologia *in vitro*, quando necessária na produção vegetal, em termos de quantidade e de qualidade (BORGATTO & HAYASHI, 2002). Nesse contexto, o potencial genético das plantas pode ser explorado por meio de amplo conjunto de técnicas *in vitro* (BORGATTO & HAYASHI, 2002).

Inserida nesse conjunto de técnicas, está a calogênese que é um processo indireto geralmente empregado para a produção de plantas. Nesse trabalho, foi utilizada para posterior cultivo de células em suspensão. Entretanto, a maioria dos estudos com a cultura de tecidos vegetais visa o desenvolvimento de protocolos para a regeneração de plantas inteiras a partir de células, calos e protoplastos (CHEN et al., 2000).

JANARTHANAM & SESHADRI (2008) visando desenvolver um protocolo de regeneração de baunilha (*Vanilla planifolia* Andr), testaram dois tipos de explantes, foliar e de segmento nodal, para indução de calos, e constataram que os melhores resultados foram registrados nos explantes de folha, sendo a produção máxima obtida quando o meio de cultura foi suplementado com 4,52 mM de 2,4-D e 2,22 mM de BAP, e que os explantes cultivados na ausência desses reguladores de crescimento não formaram calos em nenhum dos tipos de explantes utilizados.

Porém, um fato importante ressaltado por SMITH & KRİKORIAN (1990), é que há possibilidade de que na ocasião da indução de calo, o sistema de síntese hormonal endógeno do explante seja ativado, resultando, conseqüentemente, no aumento do nível desses hormônios, permitindo a proliferação e a diferenciação das células, mesmo sem a suplementação exógena com reguladores de crescimento.

Os reguladores de crescimento, substâncias sintéticas semelhantes aos hormônios encontrados nas plantas, têm sido de grande utilidade na cultura de tecidos vegetais, principalmente para a produção de calos e células utilizados para diversos estudos bioquímicos, inclusive em plantas lenhosas.

Segundo ROBERTS (1988), muitos, se não todos os processos fisiológicos parecem ser comandados por duas ou mais classes de hormônios (auxina, etileno, giberelina, citocinina) simultaneamente ou em alguma ordem sequencial. Duas classes de hormônios vegetais são as mais importantes na cultura de tecidos vegetais, as auxinas e as citocininas. Essas substâncias são os principais hormônios que controlam o crescimento e desenvolvimento de células vegetais cultivadas *in vitro* (KAMÍNEK, 1992). Para avaliar os efeitos de diferentes tipos de explantes, de reguladores de crescimento e regeneração sobre a indução de calos em alho (*Allium sativum* L.) LUCIANI et al., (2006) obtiveram a melhor resposta nos explantes de meristemas e com o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) que aumentou a produção e qualidade dos calos.

O 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)uréia (TDZ) é uma substância semelhante às citocininas, sendo considerada a mais ativa para a cultura de tecidos de plantas lenhosas (HUETTEMAN & PREECE, 1993).

Entretanto, em experimento realizado, VENTURIERI & VENTURIERI (2004) concluíram que o TDZ não produziu os efeitos esperados na indução de calos para organogênese ou embriogênese somática do híbrido de cacau (*Theobroma cacao*) – *Theobroma grandiflorum* x *Theobroma obovatum*.

A produção de calos, nesse trabalho, foi efetuada utilizando-se reguladores de crescimento em diferentes concentrações, para obtenção das melhores características em relação aos aspectos de textura dos calos, visando o posterior cultivo de células em suspensão de *Eucalyptus grandis*.



O objetivo geral desse trabalho foi produzir calos friáveis a partir de explantes caulinares de *Eucalyptus grandis*. Os objetivos específicos foram: testar diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos em *Eucalyptus grandis* em meio MS e desenvolver um protocolo adequado para indução de calos em *Eucalyptus grandis*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Biotecnologia Florestal**

As técnicas *in vitro*, sejam por meio da cultura de células, tecidos, órgãos e da engenharia genética, serão inseridas, em algum momento, ao longo da rota que leva o material vegetal original até a indústria e ao consumidor (BORGATTO & HAYASHI, 2002). A biotecnologia moderna é um acessório suplementar para as práticas tradicionais que utilizam descobertas fundamentais no campo da biologia molecular que provêm uma extensa plataforma para a melhoria de características que até pouco tempo eram consideradas impraticáveis pelos métodos tradicionais (DI CIERO & AMARAL, 2002; NERRA et al., 2005). Atualmente, é possível o desenvolvimento de árvores de qualidades superiores para atender a demanda futura por produtos florestais com características desejáveis, conseqüentemente, explorando-se menos as florestas naturais (NERRA et al., 2005).

É indiscutível a importância econômica e ambiental das florestas para a humanidade, principalmente como fonte de madeira e de diversos outros produtos (NERRA et al., 2005). Hoje, as madeiras das angiospermas representam aproximadamente 40% das florestas no mundo (FAO, 2000).

Entre as áreas relativamente recentes aplicadas à biologia molecular de plantas, a biotecnologia da madeira concentra seus estudos principalmente na manipulação do teor e da composição de lignina (KOPRIVA & RENNENBERG, 2000).

Vários artigos de revisão têm descrito o papel da biotecnologia florestal com resultados econômicos positivos (SEDJO, 2001; FENNING & GERSHANZON, 2002). Pesquisas recentes têm focado a regulação da biossíntese de metabólitos secundários, apontando as possibilidades da engenharia para essas substâncias (VERPOORTE et al., 2002). Isto pode ser usado para melhorar a produção de substâncias de interesse, tanto no cultivo de células *in vitro*, quanto na própria planta matriz (VERPOORTE et al., 2002).

### **2.2 Atuação dos hormônios vegetais e/ou reguladores de crescimento na planta e na cultura *in vitro***

Atualmente, as possibilidades da tecnologia *in vitro* se expandiram rapidamente de tal modo que é praticamente possível, ou pelo menos teoricamente, manipular qualquer aspecto de desempenho da planta (AGUADO-SANTACRUZ et al., 2007).

Há uma forte relação da atuação dos hormônios vegetais na formação do lenho (HIGUCHI, 1997).

O controle de crescimento em altura nas plantas lenhosas está relacionado com o controle de divisão e alongamento celular (ZIMMERMANN & BROWN, 1971). As respostas morfogênicas também podem ser modificadas de acordo com as condições de cultivo, quando, por exemplo, são utilizadas diferentes concentrações de sacarose e de reguladores de crescimento no meio de cultura (CHARRIÈRE & HAHNE, 1998).

A expressiva interferência hormonal na xilogênese, atuando diretamente nos eventos bioquímicos e estruturais do lenho, pode ser controlada de acordo com o objetivo a que se destina a utilização da madeira. A natureza do processo de desenvolvimento em alguns sistemas pode ser controlada por reguladores de crescimento adicionados externamente (ZDRAVKOVIC-KORAC et al., 2008).

Alterações na composição dos meios de cultura para a indução de calos têm sido investigadas, inclusive os reguladores de crescimento (AL-KHARY et al., 1996). A diferenciação do calo e o desenvolvimento da planta são determinados por meio de reguladores de crescimento (LUCIANI et al., 2006).

Com intensidade variada de especificação, células, tecidos ou órgãos podem adquirir novas competências por meio da ação de determinados sinais químicos que podem ser comandados pelos reguladores de crescimento (MICHELUZZI, 2007).

O crescimento e desenvolvimento de plantas lenhosas são resultados de uma combinação de eventos genéticos e de estímulos internos (GUO et al., 2005).

A atuação dos hormônios sobre a diferenciação celular altera intrinsecamente o processo de lignificação. A lignina ocorre como um componente incrustante em uma matriz constituída por hemicelulose e celulose (KAWAMURA & HIGUCHI, 1964). A biossíntese da lignina é composta de síntese e polimerização de monolignol (SASAKI et al., 2006). A diferenciação celular envolve quatro fases: expansão celular; seguida pela deposição ordenada de uma parede celular secundária espessa; lignificação e morte da célula (PLOMION et al., 2001).

Nestes termos, os passos inerentes à formação da lignina são afetados, de modo que as plantas podem produzir certas quantidades e tipos diferentes de lignina, se o ciclo dos hormônios for alterado (FUKUDA, 1992).

Em experimento com erva-daninha (*Arabidopsis thaliana*) transgênica, o efeito do aumento endógeno de citocinina e a adição exógena de sacarose em meio de cultura MS foram similares, isto é, ambos induziram a síntese de lignina (GUO et al., 2005).

Há possibilidade de que com tratamentos hormonais haja uma interferência no sistema genômico gerando expressões enzimáticas que medeiam à formação da lignina dentro da parede celular (HIGUCHI, 1997).

O conhecimento da distribuição de lignina é importante na produção de pasta química de polpa de madeira, onde a lignina é extraída e a madeira é dissociada em seus elementos celulares (WHETTEN & SEDEROFF, 1995).

A lignina, componente participativo do final da xilogênese, possui papel importante e ao mesmo tempo antagônico com relação às suas propriedades finais desejáveis, sendo necessária para o desenvolvimento saudável da planta; porém, rejeitada pela indústria de polpa celulósica e de outros setores de produção (PEREIRA, 2003).

Além disso, a xilogênese é importante para biotecnologia porque os biomateriais, como a celulose e a lignina, representam as partes predominantes da biomassa terrestre, tendo um importante papel no ciclo do carbono (BOUDET et al., 1995).

Segundo BOSÍLIO (1996) é provável que a participação da lignina na fisiologia dos vegetais superiores tenha iniciado a partir das pteridófitas, perpetuando-se até hoje entre as mesmas, gimnospermas e angiospermas.

As substâncias derivadas da rota do ácido chiquímico, principalmente as ligninas, se tornam mais exigentes, evidenciadas pelo diferencial de oxidação ocorrido durante milhões de anos atrás sobre as plantas primitivas (GOTTLIEB, 1989; GOTTLIEB et al., 1995). Através de um processo de oxi-redução forma-se os radicais fenóxidos (estruturas de ressonância estabilizadas) que em seguida sofrem reações de acoplamento, cujo processo dirigente ainda não está claramente definido (LEWIS & SARKANEN, 1998; HOLMGREN et al., 2009).

Atualmente, a principal aplicação da engenharia genética de árvores, cuja utilidade principal é a qualidade da madeira, tem focado sobre a alteração da biossíntese

de lignina, resultando em plantas com menor teor desta substância, ou com modificações em sua composição (VAN DOORSSELAERE, 1995; HU et al., 1999).

A relação de unidades guaiacila e siringila foi modificada nas células do xilema e do floema do coléus ou falso boldo (*Coleus blumei* Benth) por auxina e ácido giberélico aplicados diretamente no entrenó adicionados a uma pasta de lanolina onde um tratamento foi com uma baixa concentração de auxina isolada e os outros dois tratamentos foram a combinação dos reguladores (ALONI et al., 1990).

A constituição e a arquitetura molecular das ligninas são definidas por um sistema enzimático complexo responsável pela biossíntese dos precursores intermediários e finais, enquanto as peroxidases pela fase determinante da polimerização na parede celular (LAUVERGEAT et al., 1995). A formação dos precursores da síntese de lignina durante a xilogênese é iniciada pela indução de fenilalanina amônia-liase, concomitantemente com a de outras enzimas da via metabólica dos fenilpropanóides (KUBOI & YAMADA, 1978).

As plantas têm um grande número de isoenzimas de peroxidase que diferem em mais de 50% na sequência de aminoácidos (WELINDER, 1992). Uma das isoenzimas de peroxidase purificada, a partir da cultura de células em suspensão de morango, apresentou grande instabilidade à temperatura da sala de crescimento, contrastando com a termo-estabilidade descrita para uma isoenzima similar presente em frutas de morango (*Fragaria* × *ananassa* cv. Chandler) em conserva (ARNALDOS et al., 2002).

A atividade das peroxidases foi estudada sob diferentes condições hormonais, em culturas de células em suspensão de vinca ou maria-sem-vergonha (*Catharanthus roseus*) onde a adição da auxina 2,4-D reduziu a atividade da peroxidase no meio de cultura e compartimentos celulares e aumentou a ligação ionicamente da peroxidase com a parede celular (LIMAM et al., 1998).

Nesse aspecto, DE KLERK et al. (1999) constataram que o sinergismo auxina-fenol pode resultar na supressão da atividade das peroxidases nas culturas, evitando que a auxina endógena seja oxidada por estas enzimas. Compartilhando do mesmo princípio GONZÁLEZ et al. (1999) verificaram diminuição de 35-60% da atividade das peroxidases, no compartimento da parede celular, quando os coleótilos de aveia foram incubados em meio de cultura contendo 40 mM de AIA.

Estudos recentes da diferenciação do xilema, realizados em experimentos *in vitro*, têm permitido elucidar o processo de diferenciação (FUKUDA, 1992). Estes experimentos têm sugerido que alguns hormônios estão envolvidos na formação do lenho, e consequentemente no processo de lignificação (SAVIDGE & WAREING, 1981; LITTLE & SAVIDGE, 1987). Partindo desta constatação, os efeitos dos hormônios vegetais sobre o crescimento e a diferenciação de tecidos de plantas em nível molecular parecem ser de importância vital no desenvolvimento do xilema (ROBERTS et al., 1988).

### 2.2.1 Auxina

Entre os hormônios, a auxina é indubitavelmente a principal classe de hormônio que atua na diferenciação do floema e do xilema (THOMPSON & JACOBS, 1966; ALONI, 1980; SACHS, 1984; WARREN & WARREN, 1984), regulando o crescimento e estimulando o alongamento das células dos tecidos jovens (DAVIES, 1995).

Além disso, as auxinas atuam na regulação da expressão do RNA e na síntese de proteínas, entre 24 e 60 horas, após o cultivo *in vitro*, principalmente na síntese de enzimas e de tubulinas (FUKUDA & KOMAMINE 1980, 1983), de peroxidases (MASSUDA & FUKUDA, 1983) e de outras enzimas ligadas à lignificação (FUKUDA & KOMAMINE, 1982), durante a citodiferenciação.

Dependendo do tecido envolvido, a auxina pode estimular a divisão, o alongamento e a diferenciação das células (BANDURSKI & NONHEBEL, 1984).

Concentrações altas de AIA (ácido 3-indolacético) promovem a formação de xilema, enquanto baixas concentrações desta auxina induzem a formação de floema (FUKUDA, 1989; 1992).

A atividade das auxinas também está associada ao meristema cambial em plantas lenhosas, promovendo a divisão celular e garantindo a diferenciação e o espessamento da parede celular (WAREING, 1958; BRUCK & PAOLILLO, 1984).

Em experimentos com raízes isoladas de rabanete (*Raphanus sativus*), o AIA exógeno apresentou importante papel na iniciação e no crescimento cambial (TORREY & LOOMIS, 1967).

Em pinheiro silvestre (*Pinus sylvestris* L.), o AIA é encontrado principalmente na zona cambial (SUNDBERG et al., 1990). Estudos com pinheiro (*Pinus contorta* Douglas) mostraram atuação desse hormônio durante a diferenciação do xilema (SAVIDGE et al., 1982).

A diminuição de AIA endógena ocorre na região do câmbio, quando os brotos são retirados ou desfolhados, ou pela aplicação de um inibidor de AIA (LITTLE & SAVIDGE, 1987; SUNDBERG et al., 1990).

A aplicação exógena do ácido abscísico reduz também o transporte de auxinas (WODZICKI et al., 1979). De acordo com WODZICKI & WODZICKI (1980) ocorre um acúmulo gradual do ácido abscísico na zona cambial e no floema nas regiões basais mais jovens do caule de pinheiro silvestre (*Pinus silvestre* L.), ao final de uma estação de crescimento. O aumento da concentração de ácido abscísico pode até mesmo inibir o fluxo polar das auxinas e como resultado, retardar o processo de autólise dos protoplastos durante a fase final de diferenciação dos traqueóides, assim como induzir o aumento da espessura da parede celular de traqueóides durante a formação de lenho tardio em coníferas (ROBERTS, 1988).

JENKINS (1974) demonstrou que o ácido abscísico injetado no caule de muda de pinheiro radiata (*Pinus radiata* D. Don), durante formação do lenho juvenil, causa uma redução no diâmetro dos traqueóides e na atividade mitótica das células do câmbio vascular.

### 2.2.2 Citocinina

As citocininas podem ser divididas em dois grupos principais, os derivados de adeninas (de ocorrência natural), como a cinetina e o 6-benzilaminopurina (BAP) e derivados de fenilurêia (sintéticas) TDZ (NANDI et al., 1989).

As citocininas estimulam o desenvolvimento do sistema vascular e promovem maior translocação de nutrientes (ALONI, 2001).

Segundo ARGITA et al. (2005) as citocininas são importantes no contexto do controle hormonal, pois, estão frequentemente associadas ao desenvolvimento do sistema fotossintético da planta.

Células isoladas do mesófilo de zínia (*Zinnia spp*) apresentaram sinais de espessamento da parede secundária, após 77 horas de cultivo *in vitro* em meio de cultura contendo 6-furfurilaminopurina (cinetina).

O efeito sinérgico da cinetina com as auxinas foi constatado sobre a xilogênese de segmentos excisados do talo de ervilha (SOROKIN et al., 1962; SOROKIN & THIMANN, 1964) e em culturas de tecidos de fumo (BERGMANN, 1964).

Já para VOGEL et al. (1998) a citocinina pode ser frequentemente mascarada através da interação com outros hormônios. Por exemplo, as citocininas podem interagir com auxinas sinérgicamente ou antagonisticamente e podem induzir a produção de etileno; dessa forma, ocorrem mudanças fenotípicas que não são facilmente identificáveis como diretamente relacionados às citocininas.

Em experimento com a aplicação de citocinina em caule de coléus ou falso boldo (*Coleus*), FUKUDA (1989; 1992) relatou que este hormônio parece estimular a produção de auxina; o autor relatou também que uma quantidade pequena de auxina induziu a formação de vasos.

Calos foram induzidos na superfície cortada de explantes de broto apical de sálvia (*Salvia officinalis* L.) cultivados em meio MS adicionado com 4,5; 13,5 e 22,5  $\mu\text{M}$  de TDZ (Thidiazuron), incubados no escuro por uma semana, e depois transferidos para a luz por quatro semanas; alta percentagem de explantes desenvolveu calos nos meios suplementados com 4,5 ou 13,5  $\mu\text{M}$  de TDZ (TAWFIK & MOHAMED, 2007).

TOTEVA-KAPCHINA & YAKIMOVA (1997) trabalhando com a cultura de tecidos de roseira (*Rosa hybrida* L.), utilizando como citocinina, BAP, na concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ , verificaram aumento da atividade da peroxidase.

A aplicação exógena de citocinina estimulou a atividade cambial e a indução de auxina em feijão (*Phaseolus* sp.) (MOK & MOK, 2001).

Entretanto, a presença de cinetina pode bloquear a xilogênese durante a cultura de células de segmentos caulinares excisados de coléus (*Coleus* sp) (FOSKET & ROBERTS, 1964).

Em experimentos com cultura de tecido utilizando explantes de alface (*Lactuca sativa* Linn. var. Romãna) incubados em meio MS no escuro, - contendo auxinas (AIA, ANA ou 2,4-D), citocininas (zeatina, cinetina ou benziladenina), sacarose e agar - após quatro dias apresentaram xilogênese (DALESSANDRO & ROBERTS, 1971).

## 2.3 Culturas de tecidos

A cultura de tecidos vegetais tornou-se um sistema *in vitro* extremamente útil para o estudo dos efeitos da diferenciação da parede celular, uma vez que as culturas de células vegetais são frequentemente homogêneas, permitindo, dessa forma, identificar alterações na composição química e estrutural da parede celular (BLEE et al., 2001).

De acordo com STAFFORD & WARREN (1991), o estabelecimento da cultura de calos a partir do cultivo de diversos tipos de explantes (raiz, caule, folha, flor, etc.) é dividido em três etapas: (1) indução (ativação do metabolismo para a desdiferenciação e divisão celular); (2) divisão (as células dividem-se ativamente em células de tamanho menor); e (3) diferenciação (as células tornam-se maiores, vacuolizadas e a taxa de divisão diminui), ocorrendo, então, o equilíbrio entre a divisão e a expansão celular.

Segmentos foliares de plantas jovens de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) foram submetidos a diferentes concentrações da auxina ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético) e da citocinina BAP e a maior frequência de indução de calos foi verificada nos explantes cultivados no meio contendo 10, 74  $\mu\text{M}$  de ANA e 2,22  $\mu\text{M}$  e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP, na ausência de luz (LANDA et al., 2000).

Com o objetivo de desenvolver técnicas de regeneração *in vitro*, BRUNETTA et al., (2006) observaram que a intensidade de formação de calos nos segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) variou em função da combinação dos reguladores de crescimento (ANA e BAP), com elevada formação de calo nos tratamentos contendo as combinações de 0,25  $\text{mg.L}^{-1}$  de ANA e 1,00  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP e 1,00  $\text{mg.L}^{-1}$  de ANA e 2,00  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP.

Cultura de células e tecidos induz diversas respostas celulares sob diferentes condições ambientais (POPIELARSKA-KONIECZNA et al., 2008). Em cultura de tecidos, algumas auxinas e compostos semelhantes à auxina podem induzir a proliferação de células desdiferenciadas formando calos (TAWFIK & MOHAMED, 2007). Em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana* Willd) inoculados em meio com diferentes concentrações de 2,4-D e combinações entre ANA e BAP, foi demonstrado que em ausência de reguladores de crescimento não houve formação de calos e que 90% da produção de calo foi obtida quando utilizado 6,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; o uso isolado de ANA também induziu a formação de calos em 70% dos explantes; já o uso isolado do BAP inibiu a formação de calo (SANTOS et al., 2005).

Foi verificado em diversos estudos que o TDZ induz embriogênese somática e organogênese em cultura de tecido de várias espécies vegetais, e que também modula o metabolismo endógeno de auxinas e citocininas (MURCH & SAXENA, 2001).

A diferenciação de traqueóides e de esclereídeos foi induzida em culturas de calos de pinheiro radiata (*Pinus radiata* D. Don) mantidas um meio basal contendo carvão ativado, mas, sem a adição de hormônio; esclereídeos foram diferenciados em calos derivados de faixas de xilema, mas, não em calos formados a partir de segmentos de hipocótilos (MÖLLER et al., 2003). Os resultados mostraram que a diferenciação de esclereídeos ocorreu após a transferência dos calos do meio contendo 4,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 2,6 ou 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP para o meio descrito anteriormente (MÖLLER et al., 2003).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 PRODUÇÃO DE MUDAS**

##### **3.1.1 Desinfestação das sementes**

Sementes de *Eucalyptus grandis* adquiridas do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) tiveram a superfície desinfestadas, na bancada do laboratório, por imersão em 100 mL de solução de hipoclorito 1% contendo duas gotas de Tween 20 por 20 minutos, sob agitação. Em seguida, já na câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas cinco vezes em água destilada, bideionizada e autoclavada por cinco minutos em lavagem.

##### **3.1.2 Germinação das sementes**

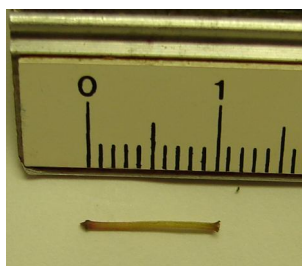
As sementes desinfestadas foram colocadas em frascos de vidro (com capacidade para 250 mL) contendo 25 mL de meio nutritivo sólido composto pelos sais minerais do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 0,3% de fitagel e 3% de sacarose. Estes frascos contendo o meio de cultura foram, antes da inoculação das sementes, autoclavados a 121°C por um período de 20 minutos e expostos em radiação UV por 20 minutos, sendo o pH do meio ajustado para 5,8 antes da adição do fitagel. Em cada frasco foram inoculadas aproximadamente de 5 a 10 sementes, sendo as culturas mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 mmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, durante 30 dias para a germinação.

#### **3.2 Indução de calos**

Segmentos caulinares de 1 cm (Figura 1) foram excisados de mudas 30 dias após a germinação *in vitro* das sementes. Os explantes foram inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações e combinações da citocinina TDZ e das auxinas AIA, ANA e 2,4-D, visando à indução de calos.

Os tratamentos foram elaborados tendo como base o meio MS adicionado de TDZ isolado ou combinado com AIA, 2,4-D, ANA (Tabela 1). Para minimizar as possíveis contaminações, foi adicionado a todos os tratamentos Benomil (100mg/L) e Rifampicina (150mg/L) após a autoclavagem do meio de cultura. Os explantes foram inoculados em placas de Petri de vidro com 90 mm de diâmetro e 15 mm de altura contendo 40 mL de meio nutritivo sólido em BOD em regime de escuridão a temperatura de 25°C por 210 dias, sendo subcultivados a cada 30 dias. Cada tratamento constou cinco repetições (isto é, cinco placas por tratamento) com cinco explantes por placa.





**Figura 1.** Detalhe do segmento caulinar de *Eucalyptus grandis* usado como explante.

### **3.2.1 Tratamentos**

Os tratamentos contendo diferentes concentrações da citocinina TDZ empregada isoladamente ou em combinação com as auxinas AIA, 2,4-D e ANA, e diferentes concentrações da auxina 2,4-D empregada isoladamente, para obtenção de calos em explantes de segmentos caulinares em *Eucalyptus grandis* são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Tratamentos com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento para indução dos calos em explantes de segmentos caulinares em *Eucalyptus grandis*.

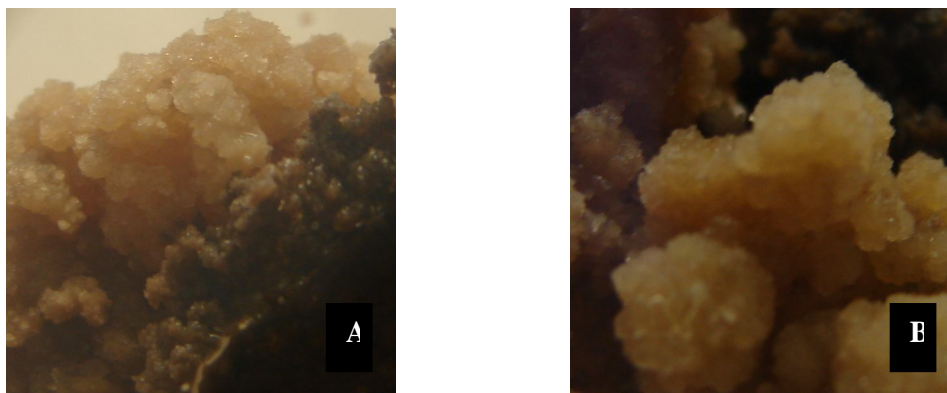
Tratamentos	Auxinas ( $\mu\text{M}$ )	Citocininas ( $\mu\text{M}$ )
T 1	AIA 15,0	TDZ 2,0
T 2	AIA 30,0	TDZ 2,0
T 3	2,4-D 25,0	TDZ 2,0
T 4	2,4-D 50,0	TDZ 2,0
T 5	ANA 10,0	TDZ 2,0
T 6	ANA 20,0	TDZ 2,0
T 7	-	TDZ 2,0
T 8	-	TDZ 1,0
T 9	-	TDZ 1,5
T 10	-	TDZ 2,5
T 11	-	TDZ 3,0
T 12	ANA 0,11	TDZ 4,4
T 13	ANA 0,7	TDZ 0,7
T 14	ANA 2,69	TDZ 2,27
T 15	2,4-D 4,53	-
T 16	2,4-D 9,06	-
T 17	2,4-D 18,12	-
T 18	2,4-D 0,23	-
T 19	2,4-D 0,45	-
T 20	2,4-D 0,68	-
T 21	-	-

### 3.3 Avaliação dos calos

Os calos foram avaliados, após 210 dias de cultivo *in vitro* quanto à textura. Para a textura foi utilizado o seguinte critério: I (calo friável – células fracamente unidas); II (calo compacto – células fortemente unidas); III calo semifriável (calos com características intermediárias entre o friável e o compacto, isto é, apresentando porções compactas e friáveis).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

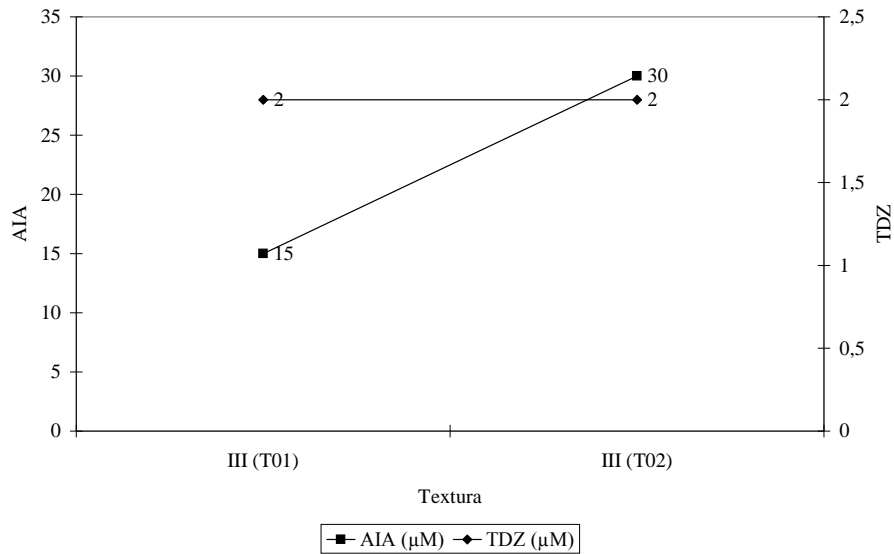
Ao longo da produção e manutenção dos calos (210 dias), não foi utilizado nenhum antioxidante. A não adição ao meio de cultura de antioxidante não dificultou a produção inicial de calos, mas sim, a manutenção dos mesmos. Entretanto, foi possível verificar que alguns calos de coloração escura e textura compacta, com a realização dos subcultivos, recuperaram o aspecto de cor e textura (Figura 2). Dos vinte e um tratamentos a calogênese só não ocorreu em três (Tabela 2).



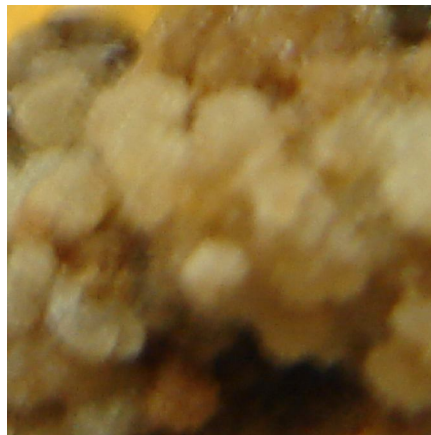
**Figura 2.** (A) Visão lateral do calo do tratamento T 5 formado no meio MS contendo 10  $\mu\text{M}$  de ANA e 2,0  $\mu\text{M}$  de TDZ, 210 dias após o cultivo *in vitro* (B) visão superior do mesmo calo mostrando sua base com coloração bem escura.

##### 4.1 Textura

Os calos tratados com AIA em duas concentrações diferentes (15 e 30  $\mu\text{M}$ ) e a mesma concentração de TDZ (2  $\mu\text{M}$ ) não alteraram a textura, ambos os tratamentos (T 1 e T 2) proporcionaram calos de textura semifriável (III) (Figuras 3 e 4). Já na indução de calos em explante foliar de sálvia grega (*Salvia fruticosa* Mill.) foi completamente inibida na ausência de AIA e TDZ e o maior calo foi obtido com uma combinação de 3  $\mu\text{M}$  AIA e 6,9  $\mu\text{M}$  TDZ (KARAM et al., 2003).



**Figura 3.** Relação da combinação e concentração dos reguladores AIA e TDZ na textura dos calos.



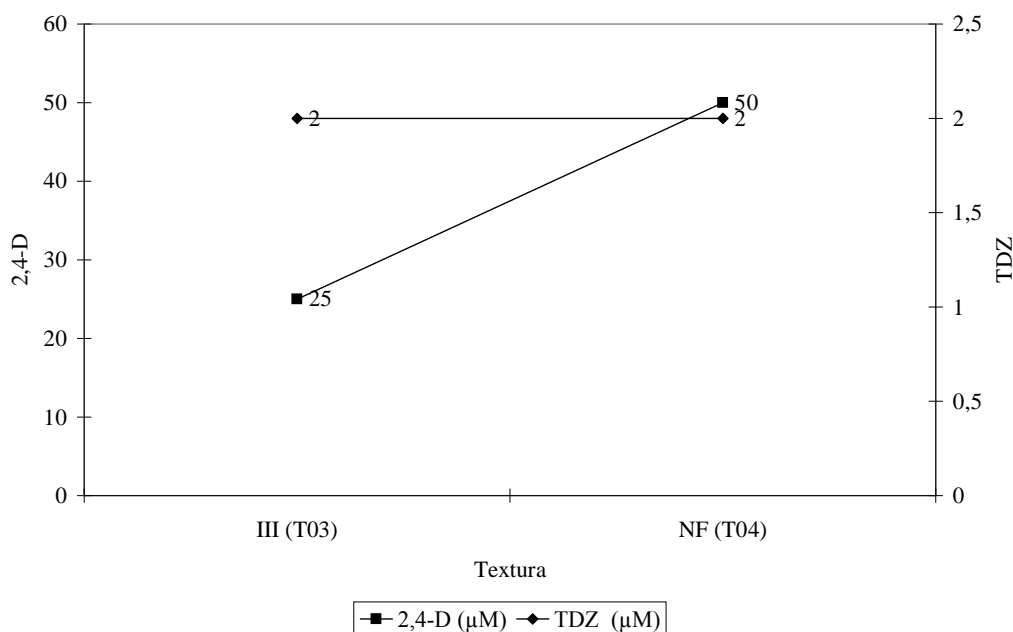
**Figura 4.** Calo de textura semifriável (tratamento T 2).

Nos tratamentos T 3 e T 4 (Tabela 1), onde foi utilizada uma combinação de 2,4-D nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  com a mesma concentração de TDZ (2,0  $\mu\text{M}$ ), ocorreu que na primeira combinação (25  $\mu\text{M}$  2,4-D com 2,0  $\mu\text{M}$  TDZ) os calos obtiveram textura III e quando foi utilizada a combinação com uma concentração maior de 2,4-D (50  $\mu\text{M}$ ), não formou calo (Figura 5). No caso dos calos obtidos de explantes caulinares de onze-horas (*Portulaca grandiflora* Hook), ROSSI-HASSANI & ZRYD (1995) obtiveram calos friáveis com cinetina (5 $\mu\text{M}$ ) combinada com 2,4-D (3  $\mu\text{M}$ ).

Então a concentração muito alta (50  $\mu\text{M}$ ) em explantes caulinares de *Eucalyptus grandis* pode ter sido tóxica impedindo a formação de calos. Possivelmente a

concentração de TDZ não foi suficiente para minimizar o efeito tóxico da altíssima concentração de 2,4-D no tratamento T 4. Em explantes foliares de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) em meio composto com 5,0 mg L<sup>-1</sup> (22,65 µM) de 2,4-D e 10,2 mg L<sup>-1</sup> (45,28 µM) de BAP proporcionou a melhor formação de calos friáveis e esses resultados foram, possivelmente, em virtude da alta concentração de citocinina usada em combinação com o 2,4-D, fato que pode ter anulado o efeito tóxico do 2,4-D (COSTA et al., 2008).

Em segmentos nodais e raízes de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken houve uma maior proliferação de calos friáveis quando os segmentos nodais foram tratados com 1mM de BAP e 10 mM de 2,4-D (FLORES et al., 2006). Em gimnosperma, HÄGGMAN et al. (1999) trabalharam com *Pinus sylvestris* L. e concluíram que o melhor resultado de indução de calo foi com o uso do 2,4-D nas concentrações de 13,6 µM ou 9,1 µM combinado com BAP na concentração de 2,2 µM. Em dicotiledôneas, o 2,4-D também tem tido êxito (LEE et al., 2001).



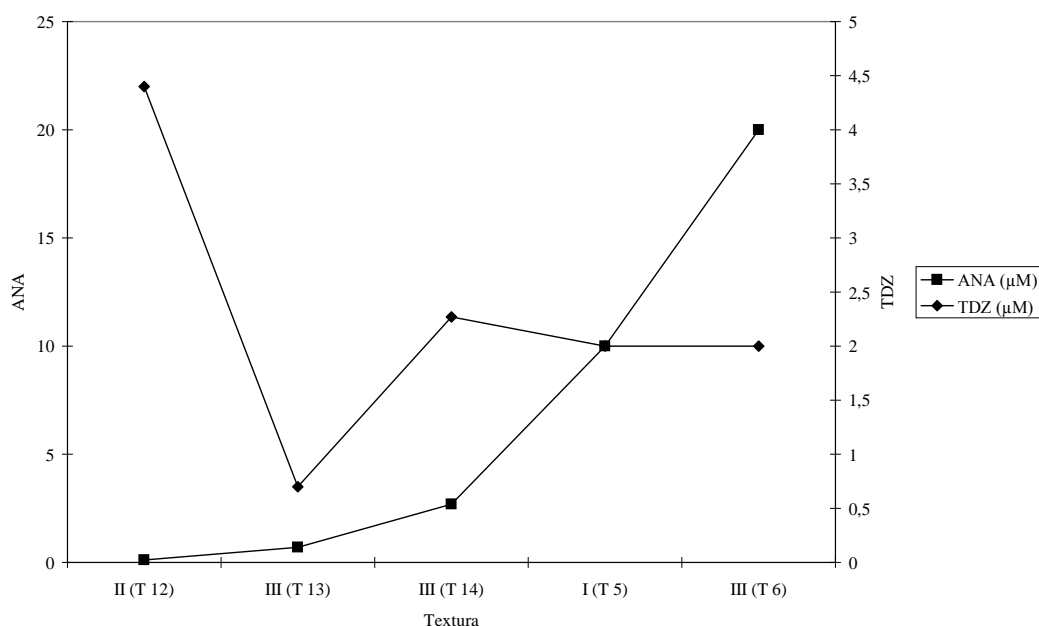
**Figura 5.** Relação da combinação e concentração dos reguladores 2,4-D e TDZ na textura dos calos.

Com a combinação dos reguladores de crescimento ANA e TDZ foi possível observar as três texturas nos calos formados a partir de explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus grandis* após 210 dias (Figura 6). Os tratamentos T 6, T 13 e T 14 apresentaram calos com textura III. Já os calos tratados com uma concentração de ANA bem inferior a de TDZ (T 12), apresentou textura compacta (II). E o calo T 5 apresentou textura I, onde os explantes foram expostos a 10 µM de ANA combinado com 2 µM de TDZ. A mesma reação foi observada em calos derivados de explantes de hipocótilos de quiabo (*Abelmoschus esculents* L. Moench.) inoculados em meio MS

suplementado com  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $10,74 \text{ }\mu\text{M}$ ) de ANA combinado com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $2,27 \text{ }\mu\text{M}$ ) de TDZ apresentaram textura friável (ANISUZZAMAN et al., 2008).

Em experimento realizado com explantes foliares de híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* inoculados em TDZ e ANA respectivamente nas seguintes concentrações ( $0,5 + 0,5$ ;  $0,5 + 0,1$ ;  $0,05 + 0,01$ ;  $1,0 + 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) o que corresponde a ( $2,27 + 2,69$ ;  $2,27 + 0,54$ ;  $0,23 + 0,054$ ;  $4,54 + 0,54 \text{ }\mu\text{M}$ ) resultaram, em sua maioria, em calos semifriáveis, enquanto que nas mesmas condições (explante e concentração dos reguladores em clones do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, os calos apresentaram textura compacta (ALVES et al., 2004). As concentrações de TDZ e ANA  $0,5 + 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $2,27 + 2,69 \text{ }\mu\text{M}$ ) respectivamente utilizadas em explantes foliares do híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* foram as mesmas utilizadas neste trabalho com explantes caulinares de *Eucalyptus grandis* no tratamento T 14. Além do tratamento T 14, a mesma textura ocorreu também nos tratamentos T 06 ( $20,0 \text{ }\mu\text{M}$  de ANA com  $2,0 \text{ }\mu\text{M}$  de TDZ) e T 13 ( $0,7 \text{ }\mu\text{M}$  de ANA com  $0,7 \text{ }\mu\text{M}$  de TDZ). O que mostra, neste caso, a maior influência dos reguladores (combinação e concentrações) do que o tipo de explante. Dessa forma, a atuação dos reguladores ANA e TDZ na textura semifriável em explantes caulinares de *Eucalyptus grandis* deu-se com concentrações equilibradas (T 13) ou quando a relação ANA/TDZ foi bem mais alta, caso ocorrido com o tratamento T 06.

A combinação de ANA também é muito utilizada com outras citocininas não só objetivando a produção de calos, mas, também a textura. Por exemplo, com explantes foliares de mogno (*Swietenia macrophylla* King) ROCHA & QUOIRIN (2004) concluíram que a maior quantidade de calos foi obtida na presença de combinações de citocinina e auxina: BA ( $4,4 \text{ }\mu\text{M}$ ) com ANA ( $0,11 \text{ }\mu\text{M}$ ) e BA ( $8,9 \text{ }\mu\text{M}$ ) com ANA ( $0,11 \text{ }\mu\text{M}$  ou  $0,54 \text{ }\mu\text{M}$ ).



**Figura 6.** Relação da combinação e concentração dos reguladores ANA e TDZ na textura dos calos.

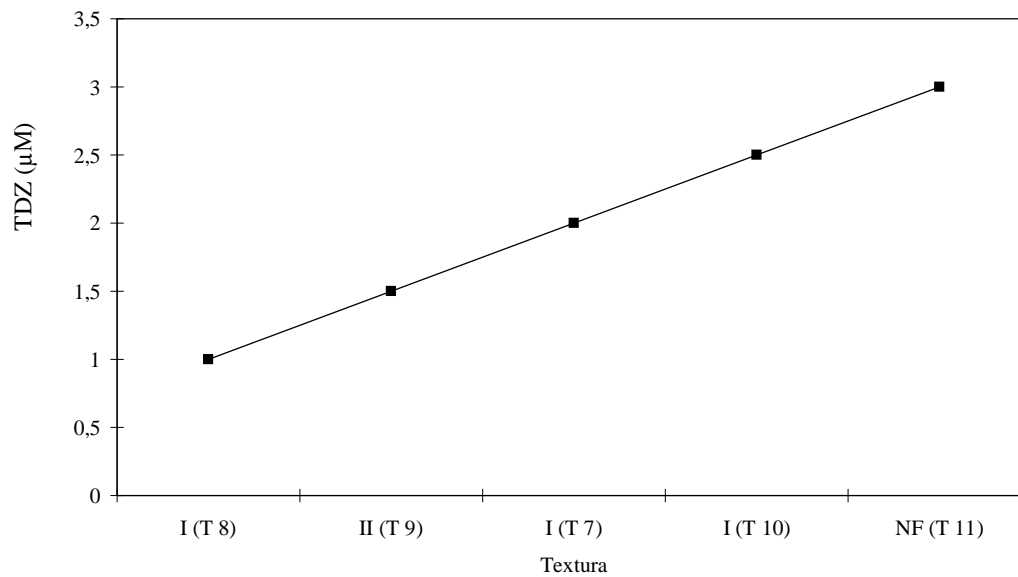
Para os tratamentos com TDZ houve dois destaques, T 9 (Figura 7) e T 11, onde, o primeiro resultou em textura compacta e o segundo não formou calo (Figura 8). Já os tratamentos T 7, T 8 e T 10 (Figura 9), que também utilizaram somente TDZ, resultaram em textura friável. Explantes de cotilédones e hipocótilos de mudas de 15 a 20 dias de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* foram inoculados em meio SP (composto de metade dos sais minerais e um ¼ de FeEDTA do meio MS) suplementado com 2,0 µM de TDZ para indução de calos e o resultado obtido após 30 dias de incubação no escuro foi que além de 95 à 100% de formação de calos nos explantes, todos os calos formados apresentaram textura compacta e homogeneidade, apesar dos diferentes genótipos das mudas utilizadas como fontes de explantes (BARRUETO CID et al., 1999). Como no tratamento T 7 (2,0 µM de TDZ), que apresentou textura friável, foi usado a mesma concentração e o mesmo regulador de crescimento utilizados pelo autor acima citado, e que obteve textura compacta, é possível que a friabilidade atingida com o tratamento T 7 em *Eucalyptus grandis*, tenha sido devido ao longo período de cultivo (210 dias com 7 subcultivos). As concentrações mais altas que 1 µM de TDZ podem estimular a formação de calo em explantes lenhosos (HUETTEMAN & PREECE, 1993). No entanto, a concentração de 3,0 µM de TDZ do tratamento T 11 em explantes de segmentos caulinares de *Eucalyptus grandis* pode ter causado algum efeito fitotóxico, impedindo a formação de calos. Já em clones do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a concentração de 4,5 µM de TDZ favoreceu a formação de calo (LIMA & GONÇALVES, 1998).

A alta atividade da citocinina e resposta positiva de espécies lenhosas à TDZ têm colocado esse regulador entre as citocininas mais ativas na manipulação de muitas espécies lenhosas (HUETTEMAN & PREECE, 1993). Em algumas espécies, o TDZ estimula a divisão celular com bastante influência na formação de calos que dependem

de citocinina (LU, 1993). Entretanto, MORALES et al. (1999) concluíram que os entrenós de macieira (*Malus spp*) são excelentes explantes na indução de calos e o BAP foi superior ao TDZ na calogênese dessa frutífera.



**Figura 7.** Calo de textura compacta (tratamento T 9).



**Figura 8.** Relação das concentrações do regulador TDZ na textura dos calos.



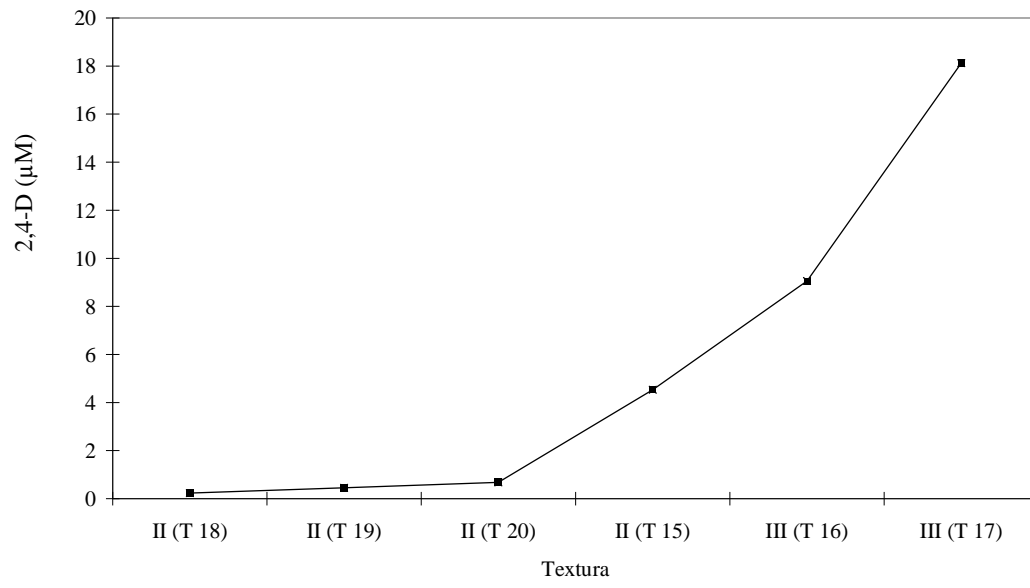


**Figura 9.** Calo de textura friável (tratamento T 10).

Os calos de *Gymnema sylvestris* R.Br. aos 25 dias que receberam somente 2,4-D (4,53-9,06 $\mu$ M) em experimento realizado por ROY et al. (2008), apresentaram textura friável. Diferentemente ocorreu com os tratamentos (T 15 e T 16) dos calos formados com explantes caulinares de *Eucalyptus grandis* que utilizaram as mesmas concentrações e apresentaram respectivamente textura compacta e semifriável (Tabela 2): T 15 (4,53  $\mu$ M) e T 16 (9,06 $\mu$ M); e com as concentrações menores dos tratamentos T 18 (0,23  $\mu$ M), T 19 (0,45  $\mu$ M) e T 20 (0,68  $\mu$ M) que também obtiveram textura compacta.

No tratamento T 17 (18,12  $\mu$ M), assim como no tratamento T 16, obteve-se textura semifriável (Figura 10). Já em lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.), uma concentração alta de 2,4-D (8 mg.L<sup>-1</sup>) (36,24  $\mu$ M) inibiu a formação de calos (MESQUITA, 1999). A inibição da calogênese ocorreu também em explantes intercotiledonares de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) inoculados em meio MS suplementado com 6 mg.L<sup>-1</sup> (27,18  $\mu$ M) de 2,4-D (REIS et al., 2007).

A maior quantidade de calo em explantes caulinares de *Stevia rebaudiana* Bert ocorreu quando os mesmos foram inoculados em meio MS com 3,0 mg/L (13,59  $\mu$ M) 2,4-D. No entanto, o meio com 50 mg/L (226,5  $\mu$ M) do mesmo regulador de crescimento proporcionou uma quantidade inferior de calos (UDDIN et al., 2006).



**Figura 10.** Relação das concentrações do regulador 2,4-D na textura dos calos.

**Tabela 2.** Resultados dos tratamentos de textura dos calos após 210 dias.

	<b>Tratamentos</b>	<b>Textura</b>	
	T 01	III	
	T 02	III	
	T 03	III	
	T 04	NF	
	T 05	I	
	T 06	III	
	T 07	I	
	T 08	I	
	T 09	II	
I=Calo	T 10	I	friável;
II=	T 11	NF	calo
	T 12	II	
	T 13	III	
	T 14	III	
	T 15	II	
	T 16	III	
	T 17	III	
	T 18	II	
	T 19	II	
	T 20	II	
	T 21	NF	

compacto; III= calo semifriável

## 5. CONCLUSÕES

- Os explantes que não produziram calos foram os expostos a tratamentos com 50,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D; 3,0  $\mu\text{M}$  de TDZ e em ausência de regulador de crescimento (controle);
- Os calos que apresentaram textura friável foram produzidos em meio MS suplementado apenas com TDZ ou uma combinação de 10,0  $\mu\text{M}$  de ANA com 2,0  $\mu\text{M}$  de TDZ;
- As auxinas AIA, 2,4-D e ANA contribuíram de modo geral para uma textura semifriável;
- Os melhores protocolos para manutenção de calos friáveis a partir de explantes caulinares de *Eucalyptus grandis* nas condições realizadas neste trabalho foram os que utilizaram apenas TDZ.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF - Anuário Estatístico da ABRAF: ano base 2007. **Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas**. Brasília, 2008.

AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; GARCÍA-MOYA, E.; AGUILAR-ACUÑA, J. L.; MORENO-GÓMEZ, B.; SOLÍS-MOYA, E.; PRECIADO-ORTIZ, E. R.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F.; RASCÓN-CRUZ, Q. In vitro plant regeneration from quality protein maize (OPM). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, p. 215-224, 2007.

AL-KHARY, J. M.; SHAMBLIM, C. E.; McNEW, R. W. et al. Callus induction and plant regeneration of U.S. rice genotypes as affected by medium constituents. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 32, p. 227-232, 1996.

ALONI, R., Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. **Planta**, V.150, p.255-263, 1980.

ALONI, R.; TOLLIER, M.T.; MONTIES, B. The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. **Plant Physiology**, v.94, p. 1743-1747, 1990.

ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 201, p. 22–34, 2001.

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.5 Brasília, 2004b.

ANISUZZAMAN, M.; KABIR; A. H.; SARKER, K. K; JARIN, S.; ALAM, M. F. Micropropagation of *Abelmoschus esculentus* L. (Moench.) for disease free plantlets through meristem culture. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 2008.

ARGITA L.; FERNÁNDEZ A. G.; GONZÁLEZ A.; TAMÉS R. S. Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatization and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 432, p. 161–167; 2005.

BANDURSKI, R.S.; NONHEBEL, H.M. **Auxins**. In: WILKINS, M.B. (ed.) Advanced plant physiology. Pitman, London, p. 1-20, 1984.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (pi-cg/em). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.2035-2041, 2008.

BARRUETO CID, L. P.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus*

*grandis* × *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.56, n.1, p.17-23, 1999.

BAUCHER, M. HALPIN, C.; PETIT-CONIL, M.; BOERJAN, W. Lignin: genetic engineering and impact on pulp. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.305-350, 2003.

BERGMANN, L. Der Einflu von Kinetin auf die Ligninbildung und Differenzierung Gewebekulturen von *Nicotiana tabacum*. **Planta**, v.62, p. 221-254, 1964.

BLEE, K.A.; WHEATLEY, E. R.; BONHAM, V. A.; MITCHELL, G. P.; ROBERTSON, D.; SLABAS, A.R.; BURRELL, M. M.; WOJTASZEK, P.; BOLWELL, G. P. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesizes secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. **Planta**, v. 212, p. 404-415, 2001.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CAMARGO E CASTRO, P. R.; SENA, J. O. A. (Organizadores) **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Eduem: Maringá, p.227-254, 2002.

BOSISIO, B.M. **Avaliação de Tendências Evolutivas Vegetais via Quantificação Lignínica**. 1996. 0 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Rio de Janeiro.

BOUDET, A.M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI J. Tansley review No. 80: biochemistry and molecular biology of lignification. **New Phytologist**, v. 129, p. 203-236, 1995.

BRUCK, D. K.; PAOLILLO, D. J. Jr. Anatomy of nodes vs. internodes in *Coleus*: The longitudinal course of xylem differentiation. **American Journal Botany**, V.71, p.151-157, 1984.

BRUNETTA, J. M. F. C.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n. 71, p. 19-24, 2006.

CHARRIÈRE, F.; HAHNE, G. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. **Plant Science**, v. 137, p. 63-71, 1998.

CHEN, Y-C.; CHANG, C.; CHANG, W-C. Areliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, p. 120-123, 2000.

COSTA, F. H. S.; LOUREIRO, T. S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC1 **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 02, p. 269-274, 2008.

- DALESSANDRO, G.; ROBERTS, L. W. Induction of xylogenesis in pith parenchyma explants of *Lactuca*. **American Journal Botany**, v.58, p.378-385, 1971.
- DAVIES, P. J. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. USA, Kluwer Academic Publishers, 1995, p.1-12.
- DAVIN, L. B.; JOURDES, M.; PATTEN, A. M.; KIM, K-W.; DANIEL G. VASSAO, D. G.; LEWIS, N. G. Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: Comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. **Natural Product Reports**, v.25, p.1015 – 1090, 2008.
- DE KLERK, G. J.; VANDER KREIKEN, W.; DE JONG, J. C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.35, p.189–199, 1999.
- DI CIERO, L.; AMARAL, W. A. N. Árvores geneticamente modificadas na silvicultura intensiva. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.29, p. 92-98, 2002.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; VanWYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, p. 228-246, 1994.
- FAO. **Biotechnology and the forestry sector**, *Unasylva*, v.51, n. 203, 2000.
- FENNING, T. M. & GERSHENZON, J. Where will the wood come from? Plantation forests and the role of biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.20, p.291-296, 2002.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.845-851, 2006.
- FOSKET, D. E. & ROBERTS, L. W. Induction of wound-xylem differentiation in isolated *Coleus* stem segments in vitro. **American Journal Botany**, v.51, p.19-25, 1964.
- FUKUDA H.; KOMAMINE A. Establishment of an experimental system for the tracheary elements differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. **Plant Physiology**, v.52, p.57-60, 1980.
- FUKUDA, H. & KOMAMINE, A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cells isolated from mesophyll of *Zinnia elegans*. **Planta**, v.155, p.423-430, 1982.
- FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Changes in the synthesis of RNA and protein during tracheary element differentiation in single cells isolated from the mesophyll *Zinnia elegans*. **Plant Cell Physiology**, v. 24, p.603-614, 1983.

FUKUDA, H. Cytodifferentiation in isolated single cells. **Botanical Magazine Tokyo.**, v. 192, p.491-501, 1989.

FUKUDA, H. Tracheary element formation as a model system of cell differentiation., v. **International Review of Cytology**, 136, p. 289-332, 1992.

GONZÁLEZ, L. F.; PEREZ, F.; ROJAS, M. C. Indole-3-Acetic Acid Control on Acidic Oat Cell Wall Peroxidases. **Journal Plant Growth Regulation**, v.18, p.25–31, 1999.

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

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.D.M.B. & KAPLAN, M.A .C. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms. **Phytochemistry**, v.40, p. 99-113, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; RIBEIRO, V. J.; REZENDE, G. D. S. P. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.109, n.1, 2004.

GUO, J.; HU, X.; DUAN, R. Interactive effects of cytokinins, light, and sucrose on the phenotypes and the syntheses of anthocyanins and lignins in cytokinin overproducing transgenic. *Arabidopsis*. **Journal Plant Growth Regulation** , v. 24, p. 93–101, 2005.

HÄGGMAN, H.; JOKELA, A.; KRAJNAKOVA, J.; KAUPPI, A.; NIEMI, K; ARONEN, T. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.1769-1778, 1999.

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

HOLMGREN, A.; NORNGREN, M ZHANG, L.; HENRIKSSON, G. On the role of the monolignol  $\gamma$ -carbon functionality in lignin biopolymerization. **Phytochemistry**, v.70, p.147-155, 2009.

HU, W. J. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. **Nature Biotechnology**, v.17, pp. 808-812, 1999.

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

JANARTHANAM, B.; SESHADRI, S. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 44, p. 84-89, 2008.

JENKINS, P. A. **Influence of applied indoleacetic acid and on xylem cell dimensions**



in *Pinus radiata* D. Don. In: BIELESKI, R. L.; FERGUSON, A. R.; CRESSWELL, M. M. (Eds.) Mechanisms of regulation of plant growth. R Soc NZ, Wellington, 1974. p. 737-742.

KAMÍNEK M. Progress in cytokinin research. **Trends Biotechnology**, v.10, p. 159–164, 1992.

KARAM, N. S.; JAWAD, F. M.; ARIKAT, N. A.; SHIBL, R. A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.73, n. 2, 2003.

KAWAMURA, I.; HIGUCHI, T. **Comparative studies of milled wood lignins from different taxonomical origins by IR spectrometry. Chimie Biochimie de la Lignin, Cellulose, Hemicelluloses.** Actes du Symp Int de Grenoble Juillet. Les Imprimeries Reunies de Chambéry, France, p. 439-456, 1964.

KOPRIVA, S.; RENNENBERG, H. Forest biotechnology and environment. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz, v.43, n.2, p.121-125 2000.

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

LAUVERGEAT, V.; KENEDY, K.; FEUILLET, C.; McKIE, J. H.; GORRICHON, L.; BALTAS, M.; BOUDET, A. M.; GRIMA-PETTENATI, J.; DOUGLAS, K. T. Site-Directed Mutagenesis of a Serine Residue in Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, a Plant NADPH-Dependent Dehydrogenase, Affects the specificity for Coenzyme. **Biochemistry**, v. 34, p. 12426-12434, 1995.

LEE, E-K.; CHO, D-Y.; SOH, W-Y. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. **Plant Cell Reports**, v.20, n.5, p. 408-415, 2001.

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

LIMA, M. M.; GONÇALVES, A. N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Florestalis**, n.53, p.49-56, 1998.

LIMAM, F.; CHAHED, K.; OUELHAZI, N.; GHRIR, R.; OUELHAZI, L. Phytohormone regulation of isoperoxidases in *Catharanthus roseus* suspension cultures. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1219-1225, 1998.

LITTLE, C.H.A.; SAVIDGE, B. The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth. **Plant Growth Regulation**, v.6, p. 137-169, 1987.

- LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.29, p.92-96, 1993.
- LUCIANI, G. F.; MARY, A. K.; PELLEGRINI, C.; CURVETTO, N. R. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. **Plant Cell ,Tissue Organ and Culture**, v. 87, p. 139-143, 2006.
- McDOUGALL, G.J.; MORRISON, I.M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.; HILLMAN, J.R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal Science Food Agriculture**. Londres, v.62, n.1, p.1-20, 1993.
- MASSUDA, H.; FUKUDA, H. K. Changes in peroxidase isoenzyme patterns during tracheary element differentiation in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. **Pflanzenphysiologie**, v.112, p.417-426, 1983.
- MELLEROWICZ, E. J.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unraveling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, v.47, p.239–274, 2001.
- MELLEROWICZ, E. J.; SUNDBERG, B. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. **Current Opinion in Plant Biology** v.11, p.293–300, 2008.
- MESQUITA, A.C. 1999. **Estabelecimento in vitro de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn.) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), UFLA, Lavras, 67p.
- MICHELUZZI, F. C. **Estudo da organogênese in vitro de explantes foliares de macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv. Galaxy**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, 78p, 2007.
- MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.89-118, 2001.
- MÖLLER, F.; McDONALD, A. G.; WALTER, C.; HARRIS, P. J. Cell differentiation, secondary cell-wall formation and transformation of callus tissue of *Pinus radiata* D. Don. **Planta**, v. 217, p. 736-747, 2003.
- MORALES, C.F.G. LOMBARDI, S. R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, n.3, p.174-7, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.
- MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. **Plant Growth Regul.**, v. 35, p. 269-275, 2001.

NANDI, S. K.; LETHAM, D. S.; PALNI, L. M. S.; WONG, O. C.; SUMMONS, R. E. 6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. **Plant Science** v. 61, p. 189–196, 1989.

NERRA, N. S.; BECWAR, M. R.; ROTTMANN, W. H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H. D.; KODRZYCKI, R. J.; ZHANG, C.; GAUSE, K. C.; PARKS, D. W.; HUNCHEE, M. A. Invited review: forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, p.701-717, 2005.

PAUX, E.; TAMASLOUKHT, M'B.; LADOUCE, N.; SIVADON, P.; GRIMAPETTENATI, J. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus*. **Plant Molecular Biology**, v. 55, n.2, 2004.

PEREIRA, R. P. W. A atuação hormonal no lenho. 2003, (Monografia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 35p.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Update on wood formation in trees: wood formation in trees. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1513-1523, 2001.

POPIELARSKA-KONIECZNA, M.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; SWIERCZYNSKA, J.; GÓRALSKI, G.; SLESIAK, H.; BOHDANOWICZ, J. Ultrastructure and histochemical analysis of extracellular matrix surface network in kiwifruit endosperm-derived callus culture. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1137-1145, 2008.

RANOCHA, P.; McDOUGALL, G.; HAWKINS, S.; STERJIJADES, R.; BORDERIES, G.; STEWART, D.; CABENES-MACHETEAU, M.; BOUDET, A. M.; GOFFNEC, D. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar. **European Journal Biochemistry**, v. 259, p.485-495, 1999.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na Indução de Calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 498-500, 2007.

ROBERTS, L. W. , GAHAN, P. B., ALONI, R. **Vascular differentiation and plant growth regulators**. Springer, Berlim Heidelberg New York, 154p., 1988.

ROBERTS, L. W. Hormonal Aspects of Vascular Differentiation. In: ROBERTS, L. W., GAHAN, P. B., ALONI, R. **Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators (Springer series in wood science)**. USA, Springer-Verlag, , 1988, p. 22-38.

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

ROSSI-HASSANI, B-D.; ZRYD, J-P. Evidence of transposition in *Portulaca grandiflora* (HOOK). **Annales de Genetique**, v.38, p.90-6, 1995.

ROY, A.; GHOSH, S.; CHAUDHURI, M.; SAHA, P. K Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R.Br. (Asclepiadaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.13, p.2209-2211, 2008.

SACHS, T. Axiality and polarity in vascular plants. In: Barlow P W, Carr D J (Eds.) **Positional controls in plant development**. Cambridge University Press, Cambridge, 1984, p.193-224.

SANTOS, B.R.; PAIVA,R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 510-514, 2005.

SANTOS, P. E. T.; LAVORANTI, O. J.; SALANTE, L. Amostragem de toras de árvores de *Eucalyptus grandis* selecionadas para finalidades de serraria e energia. Pesquisa **Florestal Brasileira**, Colombo, n.54, p.53-61, 2007.

SASAKI, S.; BABA, K.; NISHIDA, T.; TSUTSUMI, Y.; KONDO, R. The cationic cell-wall-peroxidase having oxidation ability for polymeric substrate participates in the late stage of lignification of *Populus alba* L **Plant Mol. Biol.**, v.62, p.797–807, 2006.

SAVIDGE, R. A.; WAREING, P. F. Plant growth regulators and the differentiation of vascular elements. In: Barnett J. R. (ed). **Xylem cell development**. Castle House, Tunbridge Wells, p.192-235, 1981.

SAVIDGE, R.A.; HEALD, J.K.; WAREING, P.F. Non-uniform distribution and seasonal variation of endogenous indol-3ylacetic in the cambial region of *Pinus contorta* Dougl. **Planta**, V.155, p.89-92, 1982.

SEDJO, R. **Biotechnology's Potential Contribution to Global Wood Supply and Forest Conservation**. Resources for the Future, Washington, 37p., 2001.

SMITH, D. L.; KRIKORIAN, A. D. Low external pH replaces 2,4-D in maintaining and multiplying 2,4-D initiated embryogenic cells of carrot. **Plant Physiol**, v. 72, p. 329-336, 1990.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S.; YOUNGS, H. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2206 – 2211, 2004.

SOROKIN, H.P.; MATHUS,S.N.;THIMANN, K.V. The effects of auxins and kinetin on xylem differentiation in the pea epicotyl. **Am J Bot**, v.49, p.444-454, 1962.

SOROKIN, H.P.; THIMANN, K.V. The histological basis for inhibition of axillary buds in *Pisum sativum* and effects of auxins and kinetin on xylem development. **Protoplasma**, v. 59, p. 326-350, 1964.

STAFFORD, A.; WARREN, G. **Plant cell and tissue culture**. Melksham: Red Wood Press, 1991, 251p. 1991.

SUNDBERG, B.; LITTLE, C. H. A ; CUI, K. Distribution of indole-3-acetic acid and the occurrence of its alkali-labile conjugates in the extraxylary region of *Pinus sylvestris* stems. **Plant Physiology**, v. 93, p.1295-1302, 1990.

TAWFIK, A. A.; MOHAMED, M. F. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, p. 21-27, 2007.

THOMPSON, N. P.; JACOBS, W. P. Polarity of IAA effect on sieve-tube and xylem regeneration in *Coleus* and tomato stems. **Plant Physiology**, n. 41, p.673-682, 1966.

TORREY, J.G.; LOOMIS, R. S. Auxin-cytokinin control of secondary vascular tissue formation in isolated roots of *Raphanus*. **American Journal of Botany**. v. 54, p.1098-1106, 1967.

TOTEVA-KAPCHINA, V.; YAKIMOVA, E. Effect of purine and phenylurea cytokinins on peroxidase activity in relation to apical dominance of *in vitro* cultivated *Rosa hybrida* L. Bulg. **Journal Plant Physiology**, v.23, p.40-48, 1997.

TRAVERT, S.; VALERIO, L.; FOURASTE, I.; BOUDET, A. M.; TEULIERES, C. Enrichment in specific soluble sugars of two *Eucalyptus* cell-suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a noncolligative mechanism. **Plant Physiology**, v.114, p.1433-1442, 1997.

TURNBULL, J. W. **Future use of *Eucalyptus*: opportunities and problems**. In: Intensive Forestry: The role of *Eucalyptus*. Proc. IUFRO Symposium, Durban, South Africa, September, 1991. Ed. By SCHOENAU, A. P. G. Pretoria: South African Institute of Forestry. p 2-27, 1991.

UDDIN, M. S.; CHOWDHURY, M. S. H.; KHAN, M. M. M. H.; UDDIN, M. B.; AHMED, R.; BATEN, MD. A. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n.13, p.1238-1240, 2006.

VAN DOORSSELAERE, J. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. **Plant Journal**, v. 8, p. 858-864, 1995.

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

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v.1, p.13-25, 2002.

**VOGEL, J. P.; SCHUERMAN, P.; WOESTE, K.; BRANDSTATTER, I.; KIEBER, J. J.** Isolation and characterization of Arabidopsis mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. **Genetics**, v.149, p.417-427, 1998.

WAREING, P. F. Interaction between indole-acetic acid and gibberellic acid in cambial activity. **Nature**, Lond., n.181, p.1744-1745, 1958.

WARREN WILSON, J.; WARREN WILSON P. M. Control of tissue patterns in normal development and in regeneration. In: Barlow, P M, Carr D J (Eds.) **Positional controls in plant development**. Cambridge University Press, Cambridge, 1984. p.225-280.

WHETTEN, R. & SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **The Plant Cell**., v.7, p. 1001-1023, 1995.

WODZICKI, T. J. & WODZICKI, A. B. Seasonal abscisic acid accumulation in the stem cambial region of *Pinus silvestris*, and its contribution to the hypothesis of a latewood control system in conifers. **Physiology Plant**, v.48, p.443-447, 1980.

WODZICKI, T. J.; WODZICKI, A. B.; ZAJACZKAWSKI, S. Hormonal modulation of the oscillatory system involved in polar transport of auxin. **Physiology Plant**, V.46, p.97-100, 1, 1979.

ZDRAVKOVIC-KORAC, S.; CALIC-DRAGOSAVAC, D.; UZELAC, B.; JANOSEVIC, D.; BUDIMIR, S.; VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D. Secondary somatic embryogenesis versus caulogenesis from somatic embryos of *Aesculus carnea* Hayne.: developmental stage impact. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 94, p. 225-231, 2008.

ZIMMERMANN, M. H.; BROWN, C. L. **Trees Structure and function**. Springer, Berlin Heidelberg New York, 336p.,1971.

## **CAPÍTULO II**

### **LIGNINA EXTRACELULAR EM CULTIVO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO DE *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden)**

## RESUMO

O cultivo de células em suspensão é uma técnica adequada da cultura de tecidos para análises moleculares e bioquímicas, tendo em vista sua realização em condições experimentais controladas. O cultivo *in vitro* de células diferenciadas pode produzir os mesmos produtos encontrados numa planta inteira (intacta)? Visando responder esta pergunta, foram utilizadas culturas de células em suspensão de *Eucalyptus grandis*, contendo como elicitores, sacarose, reguladores de crescimento e ácido *p*-cumárico para a indução da formação de lignina na parede celular e de lignina extracelular. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi a produção de lignina extracelular, a partir do cultivo de células em suspensão desta espécie, sendo os objetivos específicos: a produção de culturas de células em suspensão a partir de calos de *Eucalyptus grandis*; produção de lignina extracelular a partir de diferentes elicitores e extração, separação, purificação, quantificação e identificação da lignina da parede celular e da lignina extracelular liberada para o meio de cultura. Para obtenção da lignina da parede celular foi utilizada uma técnica baseada na derivação da lignina com o ácido tioglicólico, representada pela lignina tioglicolato. Os tratamentos utilizados tanto para indução da formação da lignina da parede celular e quanto da lignina extracelular foram compostos de meio MS suplementado com sacarose, 2,4-D + cinetina, ácido *p*-cumárico e meio MS sem nenhum suplemento extra (testemunha). Amostras celulares e extracelulares, das culturas em suspensão, foram analisadas por espectroscopia de UV e IV. Os tratamentos que mais estimularam a produção de lignina na parede celular e de lignina extracelular foram EG1pc (0,0584  $\mu$ M sacarose) e EG3e (100 $\mu$ M de ácido *p*-cumárico), respectivamente. Concluiu-se que, nas culturas de células em suspensão de *Eucalyptus grandis*, os melhores elicitores para a formação tanto de lignina na parede celular, quanto de lignina extracelular, foram a sacarose e o ácido *p*-cumárico, respectivamente. Concluiu-se, também, que a combinação de 2,4-D + cinetina inibiu a concentração de ambos os tipos ligninas formadas.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus grandis*; cultura de células em suspensão, lignina, ácido *p*-cumárico; elicitores



## ABSTRACT

Cells suspension culture, a plant tissue culture technique, is an adequate tool used for molecular and biochemical analyses, as they are performed under controlled experimental conditions. Can *in vitro* differentiated cells culture produce the same products found in the whole plant (intact)? To answer this question, *Eucalyptus grandis* cells suspension cultures containing as elicitors, sucrose, growth regulators and *p*-coumaric acid were used for induction of lignin formation in the cellular wall and extracellular. Thus, the main objective of this research was to produce extracellular lignin in *Eucalyptus grandis* cell suspension culture and the specific objectives were: to produce cells suspension from *Eucalyptus grandis* callus culture; to produce extracellular lignin with the use of different elicitors and to extract, to separate, to purify, to quantify and to identify the cellular wall and extracellular lignin, released to the culture medium. For cellular wall lignin analysis, the technique used was based on the derivation of the lignin with the thioglycolic acid that represents the thioglycolate lignin. The treatments used for lignin induction in the cellular wall and extracellular were composed by MS medium supplemented with sucrose, 2,4-D + kinetin, *p*-coumaric acid and MS medium without any extra supplement (control). Cellular and extracellular samples obtained from cells suspension cultures were analyzed by UV and IR spectroscopy. The treatments that stimulated better production of cellular wall and extracellular lignin were EG1pc (0,0584  $\mu$ M sucrose) and EG3e (100 $\mu$ M *p*-coumaric acid), respectively. It was concluded that the best elicitors for cellular wall and extracellular lignin formation in *Eucalyptus grandis* cells suspension culture were the sucrose and the *p*-coumaric acid, respectively. The combination of 2,4-D + kinetin inhibited both concentration, wall and extracellular lignin.

**Key words:** *Eucalyptus grandis*; cells suspension culture; lignin; *p*-coumaric acid; elicitors

## 1. INTRODUÇÃO

O teor e a composição química de lignina para os diversos usos da madeira, são componentes importantes e que necessitam de estudos. O conhecimento dos processos inerentes à formação da madeira é importante e torna-se necessário à medida que se objetiva manipulá-los. Logo após a expansão e o alongamento das células, ocorre uma fase muito relevante, a lignificação, que contribui com o reforço e a hidrofobicidade das paredes das células criando condições para o transporte de água das raízes até às folhas (RICHARDSON et al., 2000).

Este biopolímero (lignina) está altamente interligado por ligações cruzadas com a celulose e com outros constituintes da parede celular, não sendo possível seu isolamento de forma inalterada (MICIC et al., 2002). As ligninas são biopolímeros estruturais, heterogêneos, depositados principalmente nas paredes das células dos xilemas primário e secundário, bem como nas fibras do floema (LEWIS et al., 1999). As plantas lenhosas, de maneira geral, possuem alto teor de lignina, podendo alcançar valores superiores a 35% em relação ao seu peso seco (FENGEL & WEGENER, 1984). DAVIN & LEWIS (1992) mencionam que durante o crescimento e desenvolvimento das plantas vasculares, metabólitos específicos, tais como os fenilpropanoídicos, acumulam nos tecidos e que muitos deles estariam comprometidos com a estrutura da parede celular das plantas, conferindo resistência à compressão e impermeabilidade, bem como exercendo papel importante no transporte de nutrientes e na retenção de fluídos. Os conceitos sobre o modelo molecular estrutural da lignina e o seu papel sobre esses aspectos ainda não são totalmente conhecidos pelos pesquisadores em Ciências Florestais.

Sendo assim, modelos sintéticos de lignina são usados em muitos estudos, como maiores substitutos viáveis *in vitro* (MICIC et al., 2002). Observações estruturais, obtidas até o momento, indicam diferenças significativas entre a lignina liberada no meio de cultura de células em suspensão e a lignina presente na parede celular (BRUNOW et al., 1993). Alguns experimentos sobre a formação de lignina extracelular em culturas de células em suspensão utilizando-se diferentes concentrações de sacarose já foram relatados (EDE & BRUNOW, 1992). A formação da lignina extracelular tem sido descrita em culturas de células em suspensão de algumas coníferas, especialmente quando estas culturas são expostas a tratamento com um elicitador (MESSNER & BOLL, 1993) ou a altas concentrações de sacarose (NOSE et al., 1995). Sendo assim, este trabalho usou o cultivo de células em suspensão de *Eucalyptus grandis* para verificar o comportamento da lignina de angiosperma em meio nutritivo MS.

Tem sido frequentemente constatado que componentes (como por exemplo, metabólitos secundários) sintetizados em plantas intactas nem sempre estão presentes em cultura de tecidos vegetais (como em culturas de calos e de células em suspensões) da referida espécie (GIROD & ZRYD, 1991). A importância do metabolismo secundário está relacionada com o papel desempenhado por estas substâncias na sobrevivência da planta, tais como: atração de polinizadores; defesa contra predadores, doenças e outros patógenos (WINK, 1988). Sendo assim, outras abordagens como o cultivo de células diferenciadas e a indução de vias metabólicas com vários elicitores têm sido usados (VERPOORTE et al., 1999). O cultivo de células diferenciadas pode produzir os mesmos produtos encontrados na planta inteira (intacta) (VERPOORTE et al., 2002).

A elicitação de culturas de células vegetais pode conduzir à produção de grandes quantidades de metabólitos secundários específicos oferecendo uma fonte importante de quimiodiversidade (McALPINE et al., 1999). O meio de cultura pode ser considerado

como um grande espaço intercelular livre formando um contínuo com a parede celular vegetal (KÄRKÖNEN et al., 2002). A lignina extracelular formada em culturas de células em suspensão assemelha-se às ligninas sintéticas produzidas por meio de peroxidases (KÄRKÖNEN et al., 2002).

Recentemente, como relatam VERPOORTE et al. (2002), tem sido comum o estudo das vias biossintéticas objetivando traçá-las completamente, visando propor novos modelos para a produção de metabólitos secundários em plantas (FACCHINI, 2001). Para estudos especificamente bioquímicos sobre a lignificação, KÄRKÖNEN et al. (2002) usaram células em suspensão de abeto vermelho (*Picea abies* (L.) H.Karst) porque as enzimas envolvidas são facilmente separadas do meio nutritivo.

O processo de formação da lignina extracelular pode responder questionamentos fundamentais sobre a lignificação. Assim, o objetivo geral do trabalho foi produzir lignina extracelular no cultivo de células em suspensão de *Eucalyptus grandis*. Os objetivos específicos foram: produzir células em suspensão a partir da cultura de calos de *Eucalyptus grandis*; produzir lignina extracelular com o uso de diferentes elicitores; extrair, separar, purificar, quantificar e identificar lignina da parede celular e extracelular liberada para o meio de cultura e comparar a lignina da parede da célula com a lignina extracelular.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais

As técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, como, a cultura de células em suspensão, são usadas para análises moleculares e bioquímicas, pois são realizadas em condições experimentais controladas, que reduzem os efeitos do ambiente (ENCINA et al., 2001; CELEDÓN et al., 2000).

A sacarose e o nitrato de amônio, fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente, e outros íons presentes no meio de cultura, são prontamente absorvidos pelas células, servindo como uma fonte de nutrientes durante a fase inicial do cultivo *in vitro* (WINK, 1994).

Em muitos sistemas, o meio de cultura básico utilizado para a indução e o cultivo de calos é também usado para a cultura de células em suspensão (STREET, 1977). Há evidências de que o meio de cultura pode estressar as células; em resposta, várias substâncias secundárias, peptídeos e polissacarídeos são liberadas no meio de cultura de forma análoga ao que acontece quando as células vegetais secretam metabólitos necessários para a formação da parede ou quando as plantas liberam enzimas no meio extracelular, quando atacadas por microorganismos (BARZ et al., 1990; WINK et al., 1992).

A formação de agregados de maior ou menor tamanho durante o crescimento celular em meio líquido, é uma das características das culturas de células vegetais em suspensão (GÓMEZ-VÁSQUEZ et al., 2004).

A biotecnologia da madeira tem resultado na melhoria da qualidade e quantidade de seus componentes para uso industrial, levando a benefícios econômicos, tendo em vista que a elucidação do mecanismo da biossíntese de lignina em nível molecular fornece informações fundamentais sobre a diferenciação do xilema em plantas lenhosas (HIGUCHI, 2006). A cultura de calos e de células em suspensão, originadas a partir de vários tipos de explantes, em muitas espécies vegetais, tem sido usada para o estudo da xilogênese (FUKUDA & KOMAMINE, 1985).

Algumas culturas de células do abeto vermelho (*Picea abies* (L.) H.Karst) são capazes de liberar, no meio de cultura no qual são cultivadas células em suspensão, uma lignina muito pura (BRUNOW et al., 1990). Esta observação é interessante, pois, tais células são uma fonte potencial para a preparação de lignina pura que pode ser modificada, por exemplo, por isótopo marcado. A comparação da estrutura das ligninas da parede celular de plantas intactas com a das ligninas sintéticas possibilita estudar, de forma mais abrangente, o mecanismo de biossíntese da lignina (BRUNOW et al., 1990).

Em alguns casos, a cultura de células em suspensão se torna um sistema ideal para o estudo da indução de determinados processos bioquímicos, alguns dos quais, respondem rapidamente aos estímulos externos (ROLFS et al., 1987).

Algumas substâncias não são sintetizadas, se as células permanecerem no estado indiferenciado (BRODELIUS & NILSSON, 1983; BERLIN et al., 1985). As culturas de células vegetais indiferenciadas, frequentemente, perdem parcialmente ou totalmente sua habilidade biossintética para acumular determinados produtos secundários (ROKEM & GOLDBERG, 1985; CHARLWOOD & CHARLWOOD, 1991).

Como as células cultivadas em meio líquido têm paredes celulares primárias similares àquelas das células meristemáticas das plantas, elas podem ser usadas para estudos de algumas das mudanças dependentes de sinais individuais (BLEE et al., 2001).

Em experimento realizado com cultura de células em suspensão de linho (*Linum usitatissimum* L.) com elicitores para analisar o acúmulo diferencial de substâncias derivadas de monolignóis, HANO et al. (2006) observaram que as principais substâncias fenólicas segregadas no meio de cultura, tanto no controle como nas suspensões de células elicitadas, foram semelhantes àquelas associadas com a parede celular.

WINK (1994) em estudos com células em suspensão de lupino (*Lupinus polyphyllus* Lindl.) constatou que as células liberaram para o meio de cultura até 160 mmol.L<sup>-1</sup> de etanol; um grande número de ácidos orgânicos, íons hidrogênio, muitos aminoácidos e cerca de 50% dos polissacarídeos e entre 42 e 65% da atividade enzimática (das enzimas hidrolíticas e peroxidase) foram recuperados ao final do cultivo *in vitro*.

## 2.2 Sacarose

Muitas culturas de células em suspensão são heterotróficas, sendo, então, dependentes de um fornecimento exógeno de carbono para seu crescimento (KRETZSCHMAR et al., 2007; WU & ZHANG, 1999).

Sacarose, glicose, frutose ou qualquer combinação destes açúcares tem sido usada como suporte para o crescimento heterotrófico de várias culturas de tecido e células (SHIMON-KERNER et al., 2000).

A sacarose é a fonte de carbono mais usada em cultura de tecidos de plantas, pelo fato de poder ser transportada através da membrana e metabolizada eficientemente pela maioria das células, devido à presença de transportadores para esta substância (SLONE & BUCKHOUT, 1991).

Modificando-se o teor de sacarose adicionado ao meio, as células produzidas podem apresentar as paredes mais espessas, e maior número de células diferenciadas em traqueóides (BLEE et al., 2001).

NOSE et al., (1995) concluíram que a transferência das culturas de células em suspensão de pinheiro teca (*Pinus taeda* L.) para uma solução contendo sacarose, em concentração de 8%, resultou num filtrado de cultura com acúmulo de vários componentes fenólicos. Os autores verificaram também que a identificação desses componentes fenólicos revelou que ambos os álcoois *p*-cumarílico e coniferílico tiveram destinos metabólicos bastante distintos com a posterior formação de dímeros, e que a formação dos metabólitos, acumulados no filtrado de cultura, após a transferência, originou um precipitado semelhante à lignina extracelular.

Embora as culturas em suspensão de abeto vermelho (*Picea abies* (L.) H.Karst) tenham apresentado crescimento adequado no meio de cultura contendo 2% de sacarose, esta concentração não foi a ideal para a manutenção das culturas, uma vez que as células iniciaram precocemente a lignificação conduzindo à morte celular (SIMOLA et al., 1992).

Concentrações superiores a 2% de sacarose em cultura de células são normalmente usadas para aumentar a taxa de produção de metabólitos secundários (PANDA et al., 1992).

## 2.3 Estudos sobre lignina em cultura de células em suspensão

CARCELLER et al. (1971), trabalhando com células de sicômoro (*Ficus sycomorus* L.), observaram que a quantidade de lignina no extrato residual de células livres de extrativos de cultura em suspensão aumentou devido ao crescimento de células no meio de cultura sem a adição de auxina; entretanto, as células cultivadas em meio de cultura contendo concentrações altas de cinetina (46,6  $\mu\text{M}$ ) ou de 2,4-D (45,3  $\mu\text{M}$ ), presumivelmente, não apresentaram alteração na síntese de lignina.

PRYKE & REES (1976) constataram que culturas de células da alcachofra-de-jerusalém (*Helianthus tuberosus* L.) necessitaram da adição de hormônios vegetais como, ácido indolacético (28,5  $\mu\text{M}$ ), zeatina (0,46  $\mu\text{M}$ ) e ácido giberélico (2,9  $\mu\text{M}$ ) para a síntese de lignina.

Análises químicas mostraram que a citocinina promoveu a lignificação em cultura de tecido de cenoura *in vitro* contendo 4 mg/L de cinetina no meio de cultura nutritivo (KOBLOITZ, 1962).

MARCO et al. (1999) identificaram, na cultura de células em suspensão de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), isoperoxidasas presentes no meio de cultura, bem como avaliaram suas características bioquímicas para determinar se elas exerciam contribuição temporal ou atuavam sobre um substrato específico para o desenvolvimento estrutural da parede celular, e como resultado obtiveram cinco isoformas básicas e duas ácidas desta enzima.

GUSTAFSSON et al. (2001) utilizaram a cultura de células em suspensão de abeto vermelho (*Picea abies* (L.) H.Karst) para estudar os efeitos do álcool  $\beta$ -fluoroconiferílico - inibidor específico da polimerização da lignina - na formação de lignina. Os autores concluíram que a cultura de células e a produção de lignina não foram afetadas significativamente pela adição do referido álcool.

Material polimérico foi produzido em cultura de células em suspensão de abeto vermelho (*Picea abies* (L.) H.Karst) elicitado por uma preparação de patógenos que resultou em presença de lignina (LANGE et al., 1995).

A produção de lignina em células cultivadas em suspensão de petúnia (*Petunia hybrida* (Hook.) Vilm.) foi induzida após subcultivo em meio de cultura sem a suplementação com ferro; sendo que a adição de  $\text{F}^{3+}$  resultou na redução do conteúdo de lignina. (HAGENDOORN et al., 1994).

Análises estruturais revelaram diferenças entre a lignina da parede celular e a lignina liberada pelas células cultivadas de abeto vermelho (*Picea abies* (L.) H.Karst) sob luz contínua e elevada atmosfera de  $\text{CO}_2$  (BRUNOW et al., 1990). Estas diferenças indicam que, quando a lignina é formada fora da matriz de carboidrato da parede celular ou livremente, o resultado é um polímero que em alguns aspectos apresenta uma estrutura intermediária entre uma lignina da parede celular e uma lignina sintética. Não se sabe se esta lignina é em parte polimerizada dentro das células ou sintetizada no espaço apoplástico das culturas (paredes celulares e em espaços intercelulares) (BRUNOW et al., 1990). Algumas sínteses podem ocorrer no meio líquido por meio de precursores secretados (BRUNOW et al., 1990).

O extrato de suspensões celulares de jaborandi (*Piper crassinervium* H.B & K.) foi analisado por RMN<sup>1</sup>H cujos sinais mostraram a presença de várias metoxilas e hidrogênios aromáticos (DANELUTTE et al., 2005).

## 2.4 Bioquímica da lignificação

As ligações entre as isoenzimas de peroxidase e a formação da lignina têm sido investigadas bioquímica e citoquimicamente em muitas espécies vegetais (KÄRKÖNEN, 2002). Estes estudos sugerem que as isoenzimas de peroxidase ligadas à parede da célula são candidatas a enzimas que fazem parte da estrutura da lignina, mas, de qualquer modo, sabe-se que isoenzimas específicas estão envolvidas no final do processo de lignificação *in vivo* (KÄRKÖNEN, 2002). Entretanto, tem sido difícil especificar um papel fisiológico para a peroxidase, tendo em vista o grande número de isoenzimas encontradas nos extratos das plantas e suas respectivas especificidades de substrato (CAMPA, 1991).

A deposição de lignina é uma das etapas finais da diferenciação das células xilemáticas (DONALDSON, 2001). A fase final da biossíntese da lignificação envolve a atividade da oxidase, diferenciando as células (FREUDENBERG, 1968).

A polimerização da lignina em plantas ocorre através da desidrogenação de álcoois p-hidroxicinâmico, coniferílico e sinapílico por meio do acoplamento de radicais fenólicos. Entretanto, a identidade da(s) enzima(s) que catalisam a polimerização de monolignóis durante o processo de lignificação é um assunto controverso (KÄRKÖNEN et al., 2002). A duplicação de papéis entre as oxidases e peroxidases na polimerização da lignina pode ser uma consequência da importância da biossíntese da lignina na formação da madeira e do crescimento das árvores, com a possibilidade de que essas enzimas tenham papéis separados na deposição da lignina (RICHARDSON et al., 2000). Segundo conclusão de ROGERS & CAMPBELL (2004), possivelmente, a biossíntese da lignina seja regulada, pelo menos em parte, em nível de transcrição. O local expresso para os genes que codificam a biossíntese da lignina, determinará onde e quando este polímero será sintetizado.

Um exemplo da importância quantitativa das ligninas presentes na parede celular é que, dependendo da sua estrutura e da variedade de ligações cruzadas, há interferência na degradação dos carboidratos da parede celular realizada por microorganismos (GRABBER et al., 2004). Dessa forma, RALPH et al. (2004) concluíram que o conhecimento da base molecular é fundamental na manipulação da parede das células das gramíneas em relação à digestibilidade.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Seleção do calo**

O calo foi escolhido pela textura mais friável; dessa forma, qualquer dos calos dos tratamentos T 7, T 8 e T 10 apresentados no Capítulo I, poderiam ser escolhidos. Então, dos três tratamentos, no momento da transferência para o cultivo das células em suspensão, o tratamento T 10 (2,5  $\mu$ M de TDZ) foi escolhido.

#### **3.2 Preparo do meio de cultura para produção de células em suspensão**

Os calos selecionados, originados do mesmo tipo de explante, apresentavam aproximadamente 0,70 g. Estes calos foram, inicialmente, divididos ao meio, sendo cada metade colocada em frascos de Erlenmeyer, com capacidade de 250 mL, contendo 125 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) líquido, (sem a adição de iodeto de potássio KI), suplementado com 2,5  $\mu$ M de TDZ, em mesa agitadora com 100 rpm, temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Durante 60 dias, semanalmente, as células e os aglomerados foram transferidos para um novo meio de cultura. Com o aumento da produção celular, as células e os aglomerados foram sendo distribuídos sucessivamente para quatro, oito até chegar a 16 frascos de Erlenmeyers. Toda vez que as células foram transferidas para meio novo, uma alíquota 10 mL do meio líquido anterior também foi transferida.

#### **3.3 Tratamentos para a formação de lignina extracelular**

Esta técnica se baseia na liberação, para o apoplasto, de peroxidase ionicamente ligada, e para o meio nutritivo, dos precursores da lignina (SIMOLA & SANTANEN, 1990; SIMOLA et al., 1992; BRUNOW et al., 1993; KÄRKÖNEN, 2001; KÄRKÖNEN et al., 2002).

Após 60 dias as células mantidas em suspensão em meio MS suplementado com 2,5  $\mu$ M de TDZ como descrito (item 3.2), foram transferidas para meio de cultura fresco contendo novos tratamentos.

Os tratamentos foram compostos de meio MS suplementado com sacarose, 2,4-D + cinetina, ácido *p*-cumárico e meio MS sem nenhum suplemento extra. Para a indução de lignina da parede celular, os tratamentos foram denominados da seguinte forma: sacarose (EG1pc); 2,4-D + cinetina (EG2pc); ácido *p*-cumárico (EG3pc) e meio MS sem nenhuma adição extra usado como controle (EG4pc) (Tabela 3).

As culturas permaneceram nos respectivos tratamentos acima descritos por 30 dias, sendo que cada tratamento teve quatro repetições.

Uma observação importante em relação à nomeação dada aos tratamentos é que os tratamentos foram únicos. Dessa forma, a tabela abaixo (Tabela 3) foi para facilitar a leitura das análises dos resultados. Pois, do mesmo Erlenmeyer foram coletadas as células e o meio líquido para as análises e continuação dos experimentos. Assim, quando houver as letras “pc” nos tratamentos, significa que está relacionado a



tratamento ou resultado da parede celular e a letra “e” significa que está relacionado a tratamento ou resultado do meio extracelular líquido.

Para a indução de ligninas extracelulares, os tratamentos foram nomeados da seguinte forma: sacarose (EG1e); 2,4-D + cinetina (EG2e); ácido *p*-cumárico (EG3e) e meio MS sem nenhuma adição extra (EG4e) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tratamentos utilizados no cultivo de células em suspensão de *Eucalyptus grandis*, para induzir a produção de lignina na parede celular e lignina extracelular em meio de cultura básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Tratamentos	Auxina (μM)	Citocinina(μM)	Sacaro se (μM)	Ác. <i>p</i> -cumárico (μM)
EG1pc/e	-	-	0,0584	-
EG2pc/e	10 2,4-D	2,5 cinetina	-	-
EG3pc/e	-	-	-	100
EG4pc/e	-	-	-	-
(Controle)				

### 3.3.1 Solução de ácido *p*-cumárico

A solução do ácido *p*-cumárico foi preparada, conforme descrito por NUÑEZ-PALENIUS & OCHOA-ALEJO, (2005), e depois adicionada ao meio de cultura MS líquido como um dos tratamentos. Primeiramente, para fazer a solução estoque (100 mg/500 mL), o ácido *p*-cumárico foi dissolvido num pequeno volume de KOH 1M, ajustado para pH 5,7 com HCl 0,1N, e então dissolvido em meio de cultura MS na concentração de 16,4 mg/L.

### 3.4 Separação das células e aglomerados celulares dos meios de cultura líquidos

Para a separação das células do meio líquido, foi realizada uma filtração em Millipore com membrana 0,22μm para cada Erlenmeyer das células em suspensão de cada tratamento e suas respectivas repetições. Desta filtração foram obtidos dois produtos: células (para obtenção de lignina da parede celular) e meio líquido (para obtenção de material extracelular - lignina). Análises foram realizadas para cada um destes dois produtos.

Com as células foi realizado o método descrito por BRUCE & WEST (1989) para a obtenção de lignina tioglicolato (item 3.7) e quantificação de absorvência na faixa de 280 nm por espectroscopia em UV.

Após a filtração, com o meio líquido de cada tratamento, foi realizada a quantificação na faixa de 280 nm por espectroscopia no UV e teste de Wiesner.

Foi obtido também do meio líquido, após filtração e centrifugação um precipitado (material extracelular - lignina) de acordo com NOSE et al., (1995).

### **3.5 Teste de cor com o reagente Wiesner (Floroglucinol-HCl)**

Para indicar a presença de lignina liberada ou formada no meio de cultura, foi realizado o teste de cor do reagente Wiesner, com pequena alíquota do meio de cultura de células em suspensão de cada tratamento em capela de fluxo laminar. Do meio líquido filtrado em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ , , foi colocada uma alíquota (3 gotas com pipeta  $\mu\text{L}$ ) de cada tratamento. Uma gota de cada tratamento foi colocada sobre cromatoplasmas (TLC), de aproximadamente 7 x 2,5 cm pré fabricada (Sorbert Technology). Esperou-se um minuto em seguida foi adicionado sobre cada spot uma gota (com pipeta  $\mu\text{L}$ ) os reagentes de Wiesner. Após a formação de cor, as cromatoplasmas foram fotografadas.

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 o HCl somente na hora de usar.

### **3.6 Extração e determinação da lignina da parede celular**

As células cultivadas nos diversos tratamentos, descritos anteriormente (Tabela. 3), foram coletadas individualmente por filtração em membranas de Millipore (0,22  $\mu\text{m}$ ) (item 3.4), após 30 dias de cultivo. Após a filtração, a lignina foi extraída da suspensão de células, separada e quantificada de acordo com a técnica relatada por BRUCE & WEST (1989). Esta técnica é baseada na derivação da lignina com o ácido tioglicólico que representa a lignina tioglicolato (NUÑEZ-PALENIUS & OCHOA-ALEJO, 2005).

### **3.7 Quantificação de lignina por espectroscopia UV da parede celular e lignina extracelular**

A espectrofotometria de UV está entre os métodos mais usuais para análises quantitativas e qualitativas de lignina em solução, pois, devido sua natureza aromática, a lignina absorve fortemente a luz ultravioleta e apresenta característica máxima na região de luz ultravioleta (LIN & DENCE, 1992; HATFIELD & FUKUSHIMA, 2005).

A absorvência do UV é muito sensível às diferenças de unidades guaiacila e siringila. Por exemplo, ligações duplas e/ou grupos carboxílicos de lignina causam um

aumento ou mudança na absorção máxima na absorbância do UV (TAKABE et al., 1992).

A maioria dos métodos espectrais para a determinação de lignina consiste essencialmente em dissolver totalmente a amostra em um solvente adequado e medir a absorbância em UV da solução a um comprimento de onda característico de lignina, normalmente 280 nm. Esta análise explora as propriedades químicas da lignina em absorver radiação em regiões distintas de espectros eletromagnéticos. A produção de espectro único nestas regiões permite selecionar características espectrais (comprimentos de onda) em que a resposta será proporcional à quantidade de lignina (HATFIELD & FUKUSHIMA, 2005).

A metodologia descrita (item 3.6) foi uma preparação das amostras para posterior quantificação.

Para a medição no UV das amostras de lignina da parede celular dos tratamentos, segundo BRUCE & WEST (1989), primeiro foi realizada 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), para a formação da curva de calibração baseado na lei de Lambert que resultou na equação  $A = k_1c + k_0$ , onde  $A$  = absorbância;  $k_1 = 0,001589$ ;  $c = [ ]$  lignina (ppm)  $k_0 = 0,130143$ .

O procedimento para as medições quantitativas no UV para amostras de lignina extracelular dos tratamentos, seguiram as descrições de NOSE et al. (1995), foi realizada a relação entre a concentração e a absorbância com amostra padronizada de álcool coníferico dissolvida em MeOH com seis concentrações (0, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L) para a formação da curva de calibração, a qual resultou na equação  $A = k_1c + k_0$ , onde  $A$  = absorbância;  $k_1 = 0,001779$   $c = [ ]$  de lignina e  $k_0 = 0,048378$ .

Foram realizadas três leituras de diferentes amostras para cada tratamento em aparelho UV, tanto para as amostras da lignina tioglicolato da parede celular, quanto para o material extracelular.

Os dados da concentração de lignina da parede da célula e das ligninas extracelulares obtidos no UV (Tabelas 13 e 14, Anexo II), foram submetidos à verificação da normalidade pelo teste de Lilliefors e comprovados esta condição, foram examinados por ANAVA, ao nível de 5% de significância e as médias contrastadas pelo teste de Tukey, também neste nível.

### **3.8 Espectroscopia de IV para as ligninas extracelulares**

Os materiais extracelulares (precipitados) obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 12 horas para completa desidratação. 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 transformada de Fourier, Nicolet 6700 FT IR.

### **3.9 RMN H de ligninas extracelulares**

Por meio da análise de RMN dos produtos, pode-se deduzir a via biossintética envolvida na lignificação (EISENREICH & BACHER, 2000). Para caracterizar a lignina em cultura de células em suspensão foram usadas técnicas de ressonância magnética nuclear do  $^{13}\text{C}$  e H (BRUNOW et al., 1993).

Os materiais extracelulares (precipitados) obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 16 horas para completa desidratação e para determinar estruturalmente o material extracelular foi utilizada espectroscopia de RMN H. Das amostras secas, foram pesadas 100 mg de cada tratamento e dissolvidas em 0,5 mL de  $\text{CDCl}_3$  e a solução foi examinada por espectroscopia e os espectros foram registrados em um aparelho Bruker AC 200 Advance 4000 MHz.

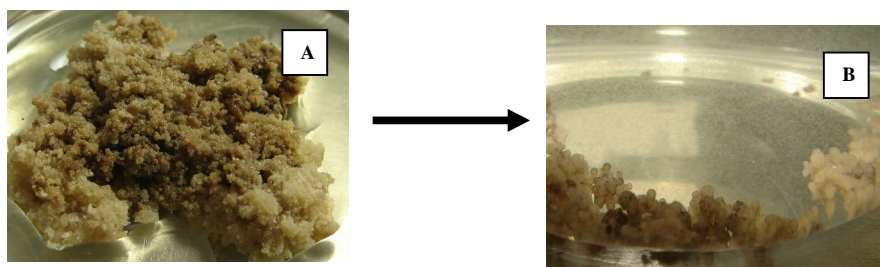
### **3.10 RMN<sup>13</sup>C ligninas extracelulares**

A espectroscopia de RMN<sup>13</sup>C é uma importante técnica para análises de lignina, em particular para determinar estruturas secundárias não receptivas à análise através de outros métodos (ROBERT, 1992). Os materiais extracelulares (precipitados) obtidos após filtração e centrifugação foram liofilizados por 16h para completa desidratação e para determinar estruturalmente o material extracelular foi utilizada espectroscopia de RMN<sup>13</sup>C. Das amostras secas, foram pesadas 100 mg de cada tratamento e dissolvidas em 0,5 mL de DMSO-d<sub>6</sub> e a solução foi examinada por espectroscopia e os espectros foram registrados em um aparelho Bruker AC 200 Advance 4000 MHz.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Calo escolhido para início do cultivo das células em suspensão

Como apresentado no Capítulo I, o principal objetivo da produção de calos foi a obtenção de protocolos que formassem material de textura friável. Assim, houve a possibilidade de escolha de calos friáveis produzidos por três tratamentos que foram: T 5 (10,0  $\mu\text{M}$  ANA + 2,0  $\mu\text{M}$  TDZ); T 7 (2,0  $\mu\text{M}$  TDZ); T 8 (1,0  $\mu\text{M}$  TDZ) e T 10 (2,5  $\mu\text{M}$  TDZ) (Tabela 2, Cap. I). Dessa forma, o tratamento T 10 (Figura 11A) foi escolhido para o início da cultura de células em suspensão (Figura 11B). O TDZ estimula a divisão celular em algumas espécies, induzindo à calogênese e é possível que ele esteja envolvido no metabolismo de auxinas (LU, 1993).



**Figura 11.** Calo de *Eucalyptus grandis* do tratamento T 10 (2,5  $\mu\text{M}$  de TDZ). Em meio sólido (A) e em meio líquido formando a suspensão com células livres e microcalos (pequenos aglomerados de células) (B).

### 4.2 Quantificação de lignina da parede celular por espectrofotometria de UV

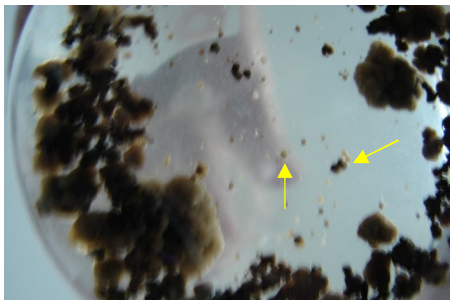
As ligninas das células de *Eucalyptus grandis*, cultivadas em meio de cultura básico MS com os elicitores, foram obtidas como ligninas tioglicolato e analisadas por espectrofotometria UV (Tabela 11, Anexo I).

Para decidir em que condições de luminosidade os tratamentos seriam expostos, as culturas de células em suspensão de *Eucalyptus grandis* receberam uma intensidade luminosa de 11,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , o que acarretou a oxidação das mesmas. Porém, não foi uma oxidação imediata, apenas com a exposição à luminosidade, mas, quando as culturas de células mantidas na luz eram transferidas para novo meio de cultura, apresentavam oxidação, independente do tratamento utilizado. Com base nesses resultados, as culturas foram mantidas em ausência de luz.

Entretanto, em cultura de células em suspensão de guduchi (*Tinospora cordifolia* Miers) para a produção de alcalóides, as culturas mantidas sob intensidade luminosa 30  $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 h apresentaram crescimento mais adequado do que as culturas mantidas no escuro (RAO et al., 2008).

Outra percepção em relação às células em suspensão foi a produção e desenvolvimento não somente de células soltas, mas, em agregados em todos os tratamentos utilizados para indução de lignina extracelular (Figura 12). O mesmo foi

percebido por KUBOI & YAMADA (1978) que analisaram a formação e dissociação de agregados de células de tabaco em suspensão cultivadas com 2,4-D ( $10^{-6}$   $\mu$ M), com BA ( $10^{-6}$   $\mu$ M) e seus efeitos sobre a lignificação. Os autores perceberam uma diferença significativa na formação e dissociação de células agregadas entre os tratamentos com 2,4-D e BA, onde, os agregados do tratamento com BA cresceram mais rapidamente na fase inicial de cultivo em agregados grandes. E no tratamento com 2,4-D, os agregados se dissociaram em agregados menores e também em células soltas no início do crescimento e, posteriormente com o desenvolvimento, formou agregados maiores.



**Figura 12.** Células isoladas e agregados celulares de diversos tamanhos cultivadas em meio MS com 0,0584  $\mu$ M de sacarose (tratamento EG1). As setas mostram algumas células isoladas que se desprenderam dos aglomerados.

#### 4.2.1 Tratamento EG1pc

Corroborando com a literatura, estatisticamente, a maior concentração de lignina na parede celular (371,42 ppm) obtida com as células de *Eucalyptus grandis*, foi proporcionada pelo tratamento EG1pc 0,0584  $\mu$ M (2%) de sacarose. O tratamento EG1pc proporcionou 371,42 ppm de lignina e diferenciou-se estatisticamente do controle (EG4pc) 250,80 ppm. Também com sacarose em concentração mais elevada, NOSE et al. (1995) verificaram que as culturas de células em suspensão de pinheiro taeda (*Pinus taeda* L.) mantidas em solução de sacarose a 0,2336  $\mu$ M (8%), apresentaram alterações na parede celular, como, paredes mais lignificadas. A mesma relação entre a sacarose e o aumento da lignina na parede celular foi analisada por CARCELLER et al. (1971) quando as células de sicômoro (*Ficus sycomorus* L.) foram expostas a um aumento de sacarose na concentração de 0,438  $\mu$ M (15%), isto é, aumentou o teor de lignina nos resíduos celulares.

A sacarose contribuiu para o aumento na concentração de lignina nas células de pinheiro silvestre (*Pinus sylvestris* L.) quando foi utilizada em combinação com auxina e citocinina. Em uma cultura de células em suspensão de pinheiro silvestre - iniciada a partir de calos originados de explantes caulinares de plântulas de 1 mês de idade - várias combinações de fatores de crescimento foram testadas para análise de suas habilidades na indução da atividade da fenilalanina amônia liase (RAMSDEN & NORTHCOTE, 1987). Para isso, os autores inocularam as células em meio básico suplementado com ANA (53,5  $\mu$ M), cinetina (9,3  $\mu$ M) e sacarose (175 mM), dessa forma, o resultado obtido, após 25 dias em cultura, foi a diferenciação dos traqueóides, espessamento da parede secundária correlacionados com um aumento no teor de lignina. Mais especificamente, foi realizada uma comparação do teor de lignina das paredes celulares

das células inoculadas em meio de manutenção, que resultou em 3,5% de lignina com o teor de lignina das paredes celulares das células inoculadas em meio de indução (com ANA, cinetina e sacarose), que resultou em 4,6% de lignina.

#### 4.2.2 Tratamento EG2pc

Efeito estatisticamente contrário ao tratamento EG1pc, foi obtido pelas células do tratamento EG2pc (10  $\mu\text{M}$  2,4-D e 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina) que apresentou a menor concentração de lignina (123,67 ppm) diferenciando-se estatisticamente em relação ao controle (EG4pc), que foi de 250,80 ppm, e de todos os outros tratamentos (Tab. 4). Em experimento com uma baixa concentração de ANA no meio, HAGENDOORN et al. (1991b) encontraram maior produção de lignina em suspensões celulares de *P. hybrida* Violeta 30. Isto coincidiu com um baixo pH citoplasmático. O aumento na concentração de ANA levou à diminuição na formação de produto e aumento no pH citoplasmático. Reduzindo a concentração de ANA sem uma elicitação anterior, não houve efeito na atividade de PAL ou formação de produto (lignina). Em cultura de células em suspensão de abeto vermelho (*Picea abies* (L.) H. Karst.) concentrações altas (25 $\mu\text{M}$ ) de cinetina causaram toxicidade, tornando as culturas rapidamente marrons, sendo que as mesmas produziram lignina e finalmente morreram (SIMOLA et al., 1992). Entretanto, a cinetina é conhecida por estimular a síntese de lignina em cultura de calos de fumo (BERGMANN, 1964).

CARCELLER et al. (1971) em experimento com células de sicômoro cultivadas em meio de cultura com altas concentrações de cinetina (46,6  $\mu\text{M}$ ) ou de 2,4-D (45,3  $\mu\text{M}$ ), não obtiveram alteração na síntese de lignina. Sendo assim, nestes casos, podemos considerar que ambos os reguladores de crescimento, mesmo nas concentrações utilizadas no tratamento EG2pc, que foram bem menores que as utilizadas para a cultura de células em suspensão de sicômoro, apresentaram resultados reduzindo a concentração de lignina, como no caso das células de *Eucalyptus grandis* (2,4-D e cinetina combinados) ou não interferindo na lignificação, como no caso das células de sicômoro (2,4-D e cinetina isolados).

Porém, com o uso intercalado de uma auxina e depois uma citocinina, os resultados diferenciaram do ocorrido com as células de *Eucalyptus grandis* e de sicômoro, como demonstrado com células de pinheiro teca (*Pinus taeda* L.). Para a indução de lignificação em células de pinheiro teca (*Pinus taeda* L.), as células foram mantidas em cultura em suspensão cultivadas em meio com 11  $\mu\text{M}$  2,4-D e depois foram transferidas para meio contendo 11  $\mu\text{M}$  de ANA, sendo que a cultura foi mantida nas mesmas condições antes e depois da transferência, isto é, 25 mL de meio descrito por BROWN & LAWRENCE (1968) em Erlenmeyer de 125 mL; incubadas a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  sob 100 rpm de agitação sob luz contínua (25-45  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) foram coletadas por filtração após 49 dias (transferidas para meio fresco em intervalos de 7, 14, 21, 35 dias e coletadas 2 semanas após a última transferência) (EBERHARDT et al., 1993). Os autores mantiveram inicialmente as culturas de células em meio contendo 2,4-D para obter, predominantemente paredes celulares não lignificadas para posteriormente cultivá-las em meio com ANA, através da qual proporcionou espessamento da parede e lignificação.

O efeito de aplicação exógena de ANA sobre os níveis internos de AIA em enraizamento de hipocótilos de soja (*Glycine max* L.) foi analisado, e também, sobre o teor de lignina (LIU et al., 1996). Os autores mostraram que: um declínio na atividade da peroxidase foi acompanhado da diminuição no conteúdo de lignina durante a

formação de raiz; o ácido cafeico e o ácido ferúlico foram críticos para o acúmulo de lignina em tecidos tratados com ANA; o aumento nos níveis de AIA com diminuição da atividade de AIA oxidase, acompanhou um teor mais baixo de lignina e uma atividade de peroxidase reduzida em tecidos tratados com ANA.

A interação de auxinas e citocininas têm sido utilizadas para estudos de elicitação de lignina em diversas espécies vegetais. A relação entre a atividade da coniferina  $\beta$ -glicosidase (enzima que participa da biossíntese dos fenilpropanóides) e a lignificação tem sido pesquisada com uma combinação dos fitohormônios ANA e BAP, ambos na concentração de 5  $\mu$ M, a qual permitiu a lignificação em culturas de células em várias espécies vegetais (HÖSEL et al., 1981). Os autores realizaram estudos em cultura de células de salsa-hortense (*Petroselinum hortense*) e trigo (*Triticum aestivum*) e concluíram que o aspecto desta atividade enzimática coincidiu com a lignificação da cultura celular das espécies acima descritas. Essa situação marca uma diferença importante, pois, nessa situação, a concentração mais baixa ou igual de auxina e citocinina, não inibiu ou reduziu o teor de lignina como ocorreu com o tratamento EG2pc com as células de *Eucalyptus grandis* (Tabela 4).

#### 4.2.3 Tratamento EG3pc

O tratamento EG3pc (100 $\mu$ M de ácido *p*-cumárico) proporcionou estatisticamente a segunda maior concentração de lignina (320,87 ppm) em relação aos outros tratamentos, inclusive o controle. Evidências sugerem que o ácido *p*-cumárico é o precursor chave para a biossíntese de lignina (HUMPHREYS & CHAPPLE, 2002). Isso coaduna com os resultados obtidos de experimento com células de pimenta malagueta (*Capsicum annuum* L.) cultivadas em meio suplementado com ácido *p*-cumárico e apresentaram diferenças significantivas quando comparadas com as células do tratamento controle. As células tratadas com o ácido *p*-cumárico exibiram os maiores teores de lignina: cerca de 33,43 – 68,33  $\mu$ g/mL durante o ciclo de crescimento, isto é, 10 à 15 vezes maior do que as células controle (NUÑEZ-PALENIUS & OCHOA-ALEJO, 2005).

#### 4.2.4 Tratamento EG4pc

O controle (tratamento EG4pc), somente com o meio básico MS, apresentou estatisticamente a terceira maior concentração (250,80 ppm) de lignina. O tratamento EG2pc apresentou a menor concentração de lignina (123,67 ppm). Isto mostra que na composição básica do meio MS pode ter havido um componente ou o conjunto deles que apresentou capacidade elicitora de lignina ou houve uma redução da concentração de lignina pela combinação utilizada no tratamento EG2pc (10,0  $\mu$ M de 2,4-D + 2,5  $\mu$ M de cinetina) nas condições que foram expostas as culturas de células em suspensão de *Eucalyptus grandis* descritas no item “Material e Métodos”.

Diversas composições de elicitores da lignificação como: polissacarídeos de origem animal; metais; entre outras foram descritas. Em relação aos metais, por exemplo, em cultura de células em suspensão de petúnia (*Petunia hybrida* cv. Violet 30) o caminho fenilpropanoídico pode ser induzido a produzir lignina por adição de ortovanadato no meio de cultivo (HAGENDOORN et al., 1991).

Já em relação aos polissacarídeos, em cultura de células em suspensão de laranja-amarga (*Citrus aurantium*) foram analisadas as atividades enzimáticas dessa



cultura após elicitação com os oligômeros de quitina (polissacarídeo constituinte principal da parede celular de alguns fungos e carapaça de artrópodes) que induziram a atividade da peroxidase e da L-fenilalanina amônia-liase (GALLÃO et al., 2007). Devido a teste histoquímico (Floroglucinol-HCL) realizado nas células, os autores registraram uma coloração vermelha observada por microscopia óptica na parede celular mais intensa após três horas de elicitação, devido à relação peroxidase e da L-fenilalanina com a lignificação.

Outro exemplo foi a atividade da peroxidase em meio de crescimento de cultura de células em suspensão de pinheiro (*Pinus elliottii* Engelm.) eliciadas por quitosana, que mostraram que os maiores níveis de lignificação, corresponderam à atividade mais baixa de peroxidase extracelular (LESNEY, 1990).

Com o mesmo princípio, porém, com diferente elicitor, culturas de células em suspensão de mamoneira (*Ricinus communis* L.) foram eliciadas por fragmentos pécticos (preparados de uma solução de 2% de ácido poligalacturônico) (BRUCE & WEST, 1989). Os autores observaram que a sensibilidade das células eliciadas em relação à lignina, nesse caso, dependeu da fase de crescimento da cultura, onde a resposta máxima foi em 6 dias, com um aumento de lignina evidente nas 3 primeiras horas depois da adição de elicitor de fragmentos pécticos, onde, os maiores teores de lignina ocorreram entre 4 e 10 horas. Os autores consideram, ainda, que a síntese de lignina em culturas de células vegetais, é um mecanismo de resistência à doença de planta que é induzida pelo elicitor.

Com estas relações descritas na literatura, é possível então analisar as composições do meio MS como possíveis elicitores de lignina. Uma explicação possível para o tratamento EG4pc ter mantido uma produção de lignina é a mudança na pressão osmótica no meio de cultura em suspensão. Foram observadas até mesmo quantidades significativas de lignina acumulada em células de cipreste-do-buçaco (*Cupressus lusitanica* Miller) cultivadas em suspensão no 5º dia de incubação sem qualquer tratamento, fato explicado pelas mudanças em pressão osmótica no meio de cultura de suspensão (ALWIS et al., 2009).

**Tabela 4.** Comparações através do Teste Tukey em nível de 5% de significância das médias dos teores de lignina da parede das células em suspensão de *Eucalyptus grandis*.

Tratamentos	Média da concentração de lignina das células em suspensão ppm
EG1pc	371.4200 a
EG2pc	123.6767 d
EG3pc	320.8700 b
EG4pc	250.8033 c

### 4.3 Quantificação de ligninas extracelulares por espectrofotometria de UV

Os quatro tratamentos foram estatisticamente diferentes (Tabela 5). Dessa forma, cada elicitador (sacarose, 2,4-D + cinetina, ácido *p*-cumárico e meio MS como controle) agiu de forma particular. Possibilitando a liberação pelas células, de substâncias extracelulares (ligninas) para o meio líquido extracelular (Figura 13).

Devido à proposta de produção polimérica formada após liberação de substâncias (precursores) pelas células, ficou estabelecido a possibilidade de originar ou não substâncias semelhantes à lignina. Então, os tratamentos apresentaram estatisticamente diferentes concentrações de ligninas na faixa de 280 nm que é característica de lignina (Tabela 12, Anexo I).



**Figura 13.** Aspecto dos meios MS filtrados, os quais foram cultivados as células.

#### 4.3.1 Tratamento EG1e

O tratamento EG1e que obteve uma concentração de lignina extracelular de 111,72 ppm foi diferente estatisticamente em relação ao controle e aos outros tratamentos. SIMOLA et al., (1992) mantiveram as culturas de células em suspensão de (*Picea abies* (L.) H.Karst.) por 6 meses com 2% (0,0584  $\mu$ M) de sacarose. Dessa forma, a lignina liberada no meio nutriente foi observada em vários experimentos, especialmente em culturas com crescimento lento suplementadas com níveis de sacarose moderados ou mesmo sem sacarose. Já CARCELLER et al. (1971) observaram lignina em suspensão celular de sicômoro em alta concentração de sacarose (15%). BRUNOW et al. (1993) coletaram lignina liberada em cultura em suspensão de células de *Picea abies* (L.) HKarst. cultivadas em meio suplementado com 2,4-D (0,5  $\mu$ M) e cinetina (2,5  $\mu$ M) após o terceiro ou quarto subcultivo depois de três semanas de experimento. A transferência de células não lignificadas de *Pinus taeda* L. para uma solução com 8% de sacarose, induziu a formação de um precipitado semelhante à lignina (NOSE et al., 1995). Entre outras análises, os autores optaram por analisar o tempo que levou para a formação de componentes aromáticos solúveis presentes na solução de sacarose através da absorvância pelo UV ( $\lambda = 280$ ). Dessa forma, observaram um rápido aumento na quantidade de absorvância do material solúvel no UV ( $\lambda = 280$ ) de quatro a seis dias seguintes à transferência para a solução com 8% de sacarose.

### 4.3.2 Tratamento EG2e

Este tratamento apresentou a menor concentração de ligninas extracelular em relação ao controle e aos outros tratamentos. O que possivelmente inibiu a liberação e conseqüentemente a formação de ligninas no meio extracelular foi a alta concentração usada no tratamento EG2e (10,0  $\mu\text{M}$ ) de 2,4-D combinada com cinetina. A concentração de cinetina deve ter sido baixa para barrar a toxidez da alta concentração do 2,4-D. Pois, em um meio livre de 2,4-D ou com baixa concentração (0,05  $\mu\text{M}$ ) em combinação com cinetina (2,5  $\mu\text{M}$ ), SIMOLA et al. (1992) obteve uma ótima liberação de lignina no meio nutritivo com células de *Picea abies* (L.) H.Karst cultivadas.

### 4.3.3 Tratamento EG3e

Este tratamento apresentou a maior concentração de ligninas extracelular em relação ao controle e aos outros tratamentos. Justifica-se, pois, o ácido *p*-cumárico é integrante da rota biossintética da lignina; dessa forma, atuou como um forte elicitador, possivelmente, desencadeando a formação também de outros precursores no meio extracelular.

### 4.3.4 Tratamento EG4e

Este tratamento foi usado como controle, assim foi possível visualizar a inibição da concentração de lignina representada no tratamento EG2e (59.37 ppm). Substâncias da composição do meio MS como o Fe, o Ca podem ter contribuído para a manutenção do teor de lignina ou até mesmo para sua indução.

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

Tratamentos	Concentração ligninas extracelular ppm
EG1e	111.7267 c
EG2e	59.3700 d
EG3e	134.3167 a
EG4e	122.3267 b

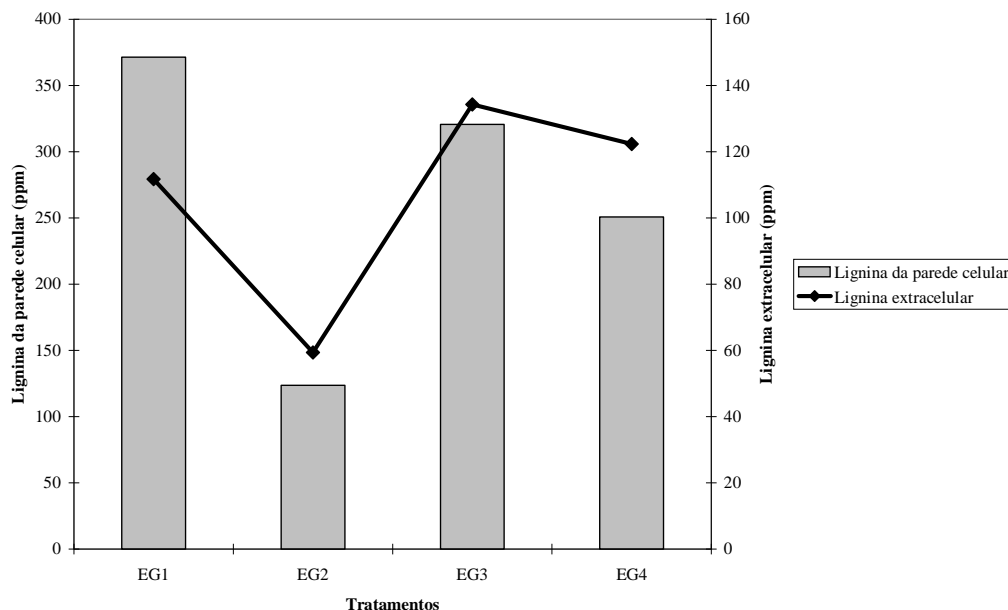
#### 4.4 Relação entre as concentrações de lignina da parede celular com a lignina extracelular

Os dados das concentrações de lignina da parede celular e de lignina extracelular, que foram analisadas estatisticamente tiveram seus respectivos resultados discutidos (itens 4.2 e 4.3). Porém, tornou-se necessário avaliar a relação existente entre as ligninas induzidas por elicitores em ambas as formas celular e extracelular (Figura 14). A amostra do tratamento com sacarose (EG1) apresentou a maior concentração de lignina na parede celular. Já em relação à lignina extracelular, o tratamento EG1 foi a terceira concentração, e ficou abaixo do controle (EG4).

A análise da amostra do tratamento EG2 (10  $\mu\text{M}$  2,4-D + 2,5  $\mu\text{M}$  cinetina) mostrou que os reguladores de crescimento utilizados foram inibidores da lignificação, pois, foi o tratamento que apresentou a menor concentração de lignina para ambas, lignina da parede celular e lignina extracelular.

A concentração de lignina extracelular da amostra do tratamento EG3, que utilizou o ácido *p*-cumárico, apresentou a maior concentração. Este mesmo tratamento teve como efeito a segunda maior concentração de lignina na parede celular. Dessa forma, o ácido *p*-cumárico tem eficiência tanto no aumento da concentração de lignina da parede celular quanto fazer as células liberarem precursores de lignina para o meio de cultura.

A análise da amostra do controle (EG4) apresentou maior concentração de lignina na parede celular, em relação ao tratamento EG2pc (Tab. 4). Já em relação à lignina extracelular, o controle apresentou maior concentração em relação a dois tratamentos, EG1 e EG2.

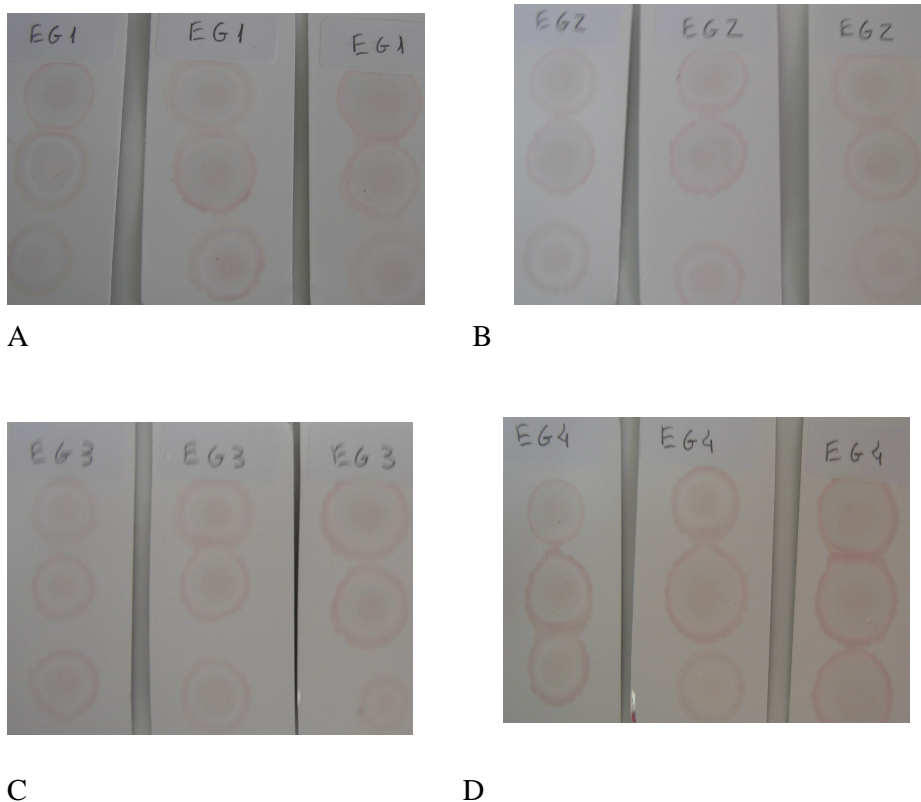


**Nota:** EG1- 0,0584  $\mu\text{M}$  de sacarose; EG2- 10,0 + 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina; EG3- 100  $\mu\text{M}$  de ácido *p*-cumárico; EG4- controle.

**Figura 14.** Relação entre a concentração de lignina da parede celular com a lignina extracelular através dos dados estatísticos.

#### 4.5 Wiesner (Floroglucinol-HCl)

Com a aplicação do teste de cor do reagente Wiesner foi possível identificar uma cor avermelhada (Figura 15), indicando a presença de traços de lignina e/ou substâncias fenólicas no meio de cultura para todos os tratamentos, inclusive o controle (EG4e). É possível perceber uma coloração rosada mais apagada no tratamento EG2e.

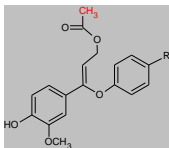
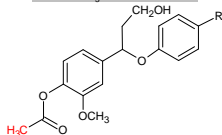
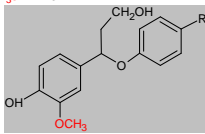
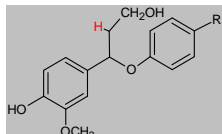
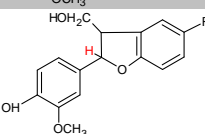
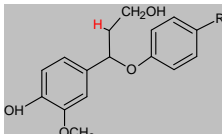
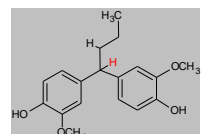
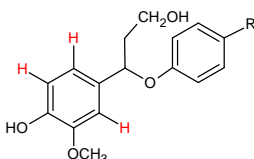


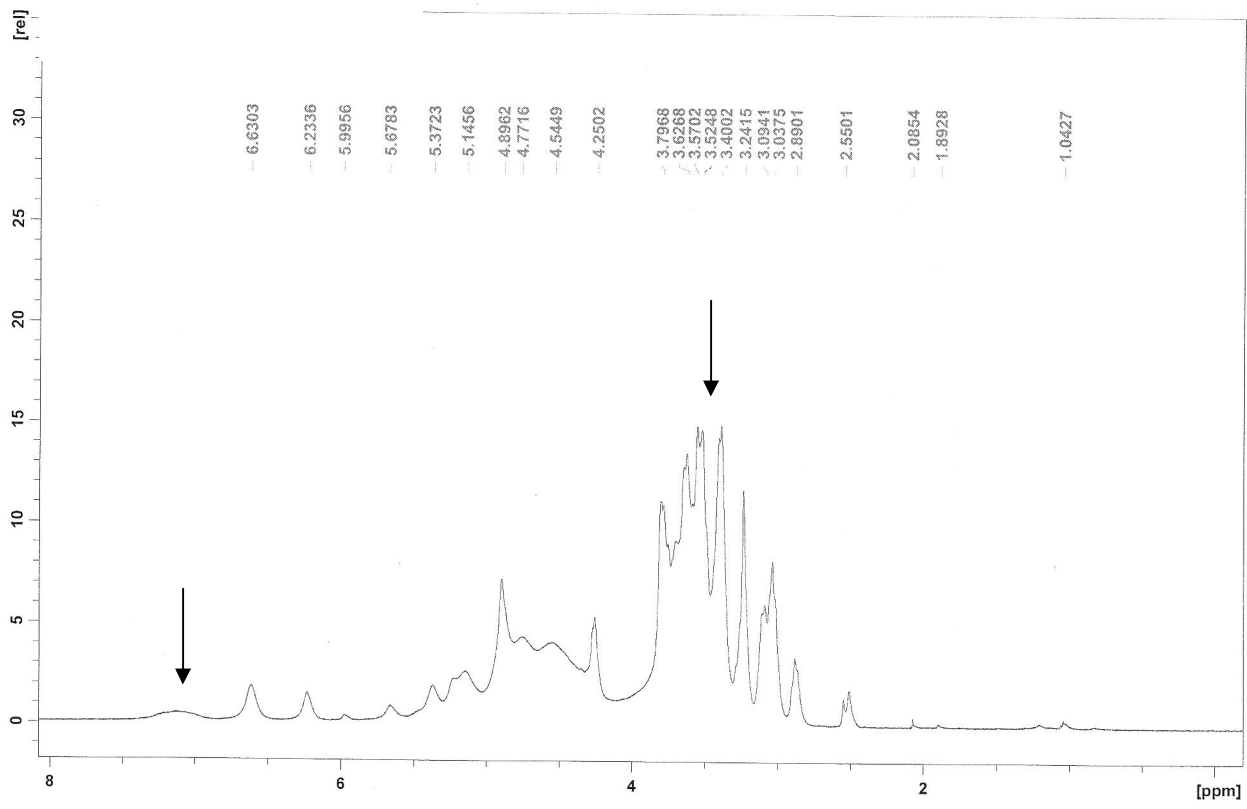
**Figura 15.A, B, C e D.** Teste de cor com os reagentes Wiesner dos tratamentos EG1e, EG2e, EG3e e EG4e realizados com o meio de cultura das células em suspensão.

#### 4.6 RMN H da lignina extracelular

Os resultados das análises dos espectros de RMN H nas amostras dos tratamentos elicitores (Tabela 6) mostraram a presença de sinais em regiões que caracterizam: hidrogênios metoxílicos (3,82 ppm); hidrogênios aromáticos (7,39 ppm); hidrogênio em posição  $\beta$  de estrutura  $\beta$ -O-4 (4,74 ppm); hidrogênios benzílicos em estruturas  $\beta$ - $\beta$  (2,56 ppm). Dessa forma, foi possível constatar que as células, mediante tratamentos elicitores, liberaram precursores para o meio formando a lignina extracelular (Figuras 16 a 19).

**Tabela 6.** Sinais, atribuições e estruturas da RMN H das amostras analisadas.

DESLOCAMENTO QUÍMICO H (ppm)	DESLOCAMENTO QUÍMICO H (LIN & DENCE, 1992) (ppm)	ESTRUTURA
1-1,47 – H contaminante	1,26 - H contaminante	-
2,03-2,19 – Acetato Alifático	2,01– Acetato Alifático	
2,31-2,34 – Acetato Aromático	2,28 – Acetato Aromático	
3,85 – 3,92 – Hidrogênios metoxílicos	3,81 – Hidrogênios metoxílicos	
4,10 –4,50 - Hidrogênio de Várias Estruturas	4,27–4,30 - Hidrogênio de Várias Estruturas	-
4,71- 4,72 – Hidrogênio em posição beta de estruturas β-O-4	4,65 - Hidrogênio em posição beta de estruturas β-O-4	
5,50 – 5,52 – Hidrogênio em posição alfa em estrutura β-O-5	5,49 - Hidrogênio em posição alfa em estrutura β-O-5	
6,14 – 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 – 7,20 - Hidrogênio Aromáticos	6,93– Hidrogênio Aromáticos	



**Figura 16.** Espectro de RMN H do tratamento EG1e

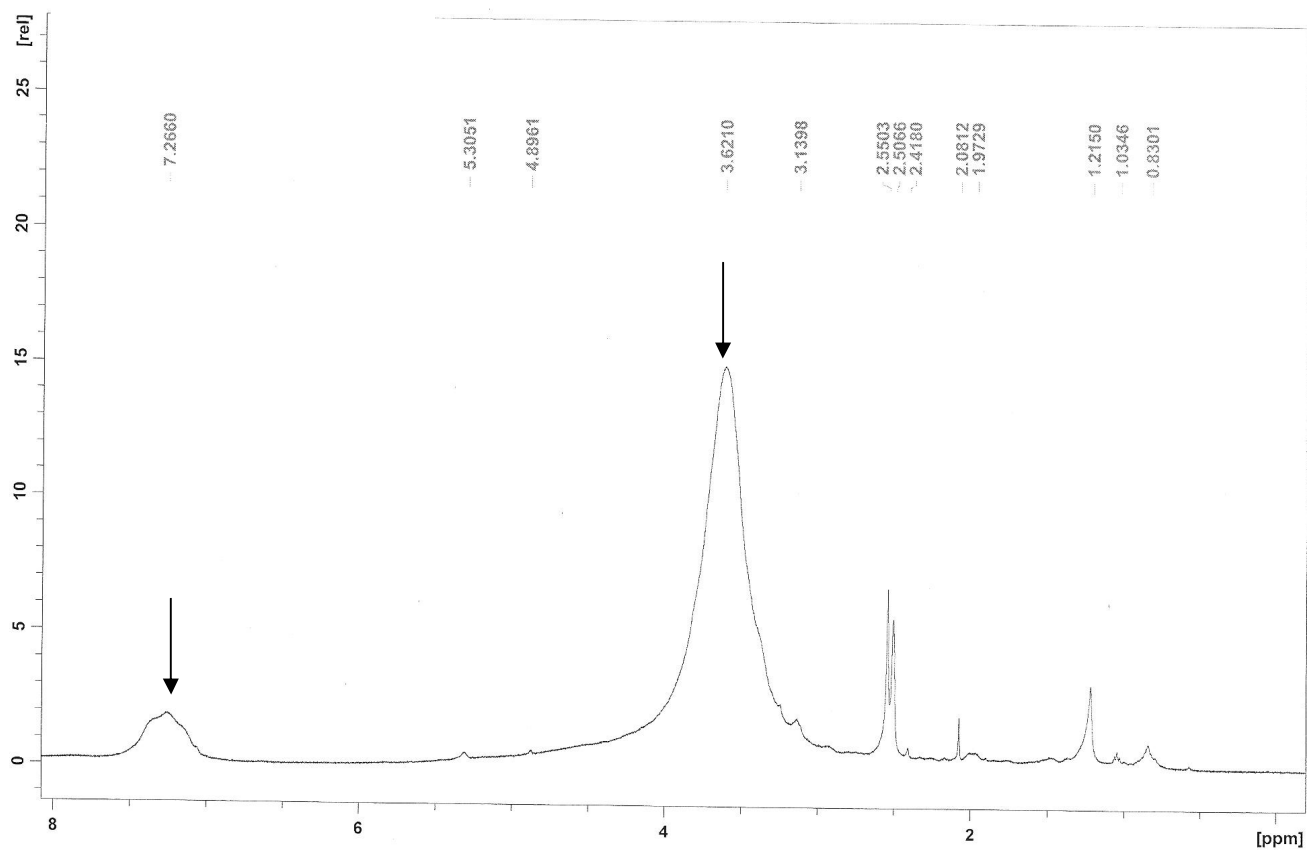
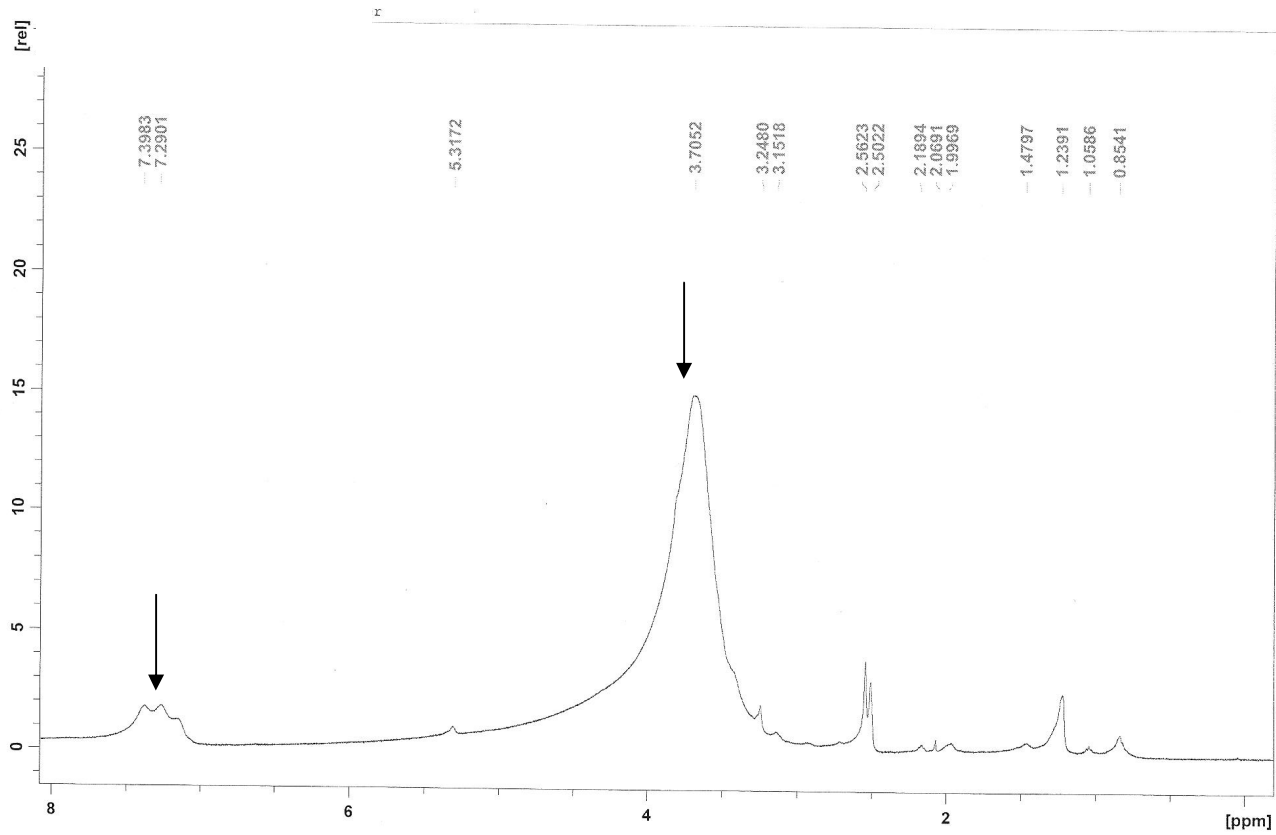


Figura 17. Espectro de RMN H do tratamento EG2e





**Figura 18.** Espectro de RMN H do tratamento EG3e

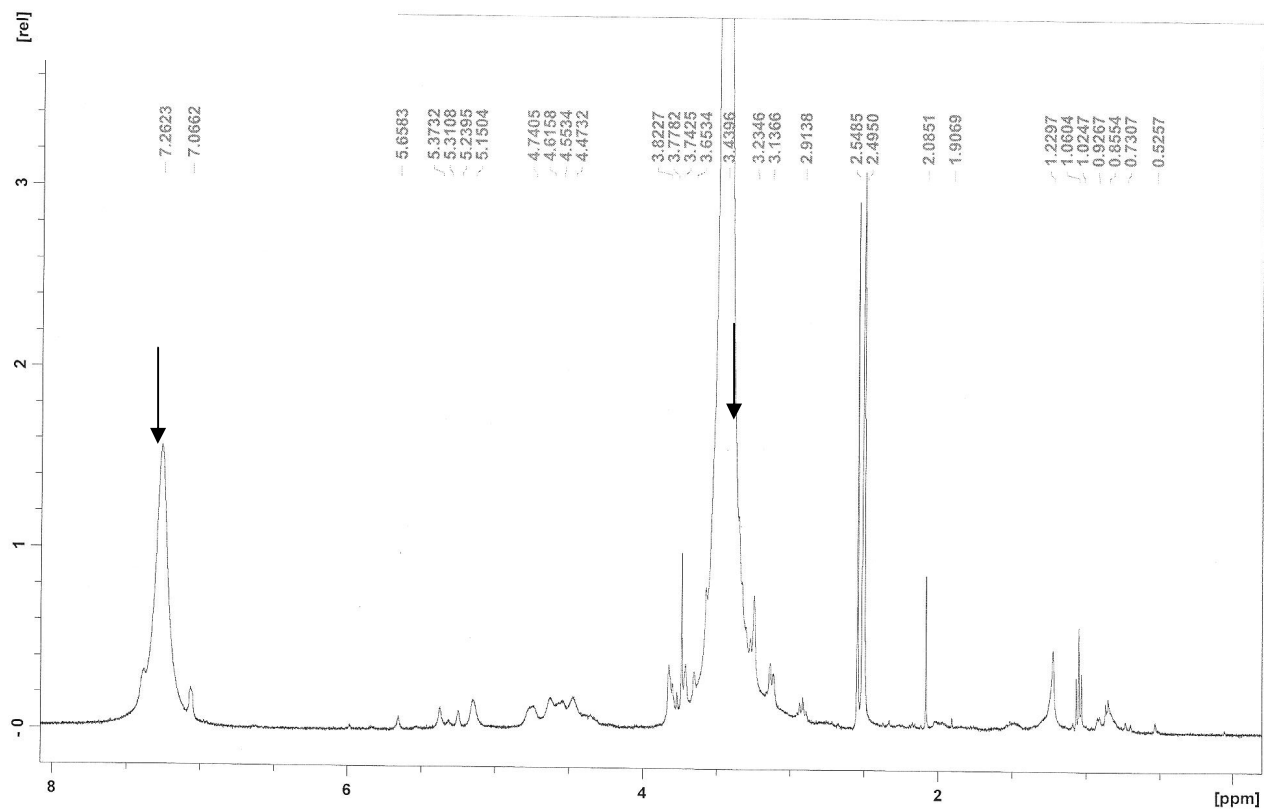


Figura 19. Espectro de RMN H do tratamento EG4e

#### **4.7 RMN<sup>13</sup>C lignina extracelular**

A constatação da formação de lignina extracelular nos tratamentos (Tabela 3) foi plausivelmente respaldada através de: teste de cor com o reagente Wiesner; análises de medições no UV na faixa de 280 nm e RMN H. Os resultados positivos para as três análises realizadas, corroboram que as células responderam à elicitação de diferentes tratamentos liberando precursores para o meio extracelular de cultivo, o que possibilitou a formação polimérica. Porém, os espectros de RMN<sup>13</sup>C não apresentaram os sinais que caracterizaram a formação do polímero lignina, pois, a quantidade de material para tal análise foi insuficiente.

## 5. CONCLUSÕES

- Sacarose na concentração de 0,0584  $\mu\text{M}$  (2%) induziu a maior concentração de lignina na parede celular;
- A concentração de lignina na parede celular foi reduzida com o tratamento que combinou 10  $\mu\text{M}$  2,4-D com 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina;
- O ácido *p*-cumárico induziu maior liberação de ligninas pelas células para o meio extracelular;
- A concentração de lignina no meio extracelular foi inibida com o tratamento que combinou 10  $\mu\text{M}$  2,4-D com 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina e
- Os espectros de RMN<sup>1</sup>H dos tratamentos com 0,0584  $\mu\text{M}$  sacarose, 10  $\mu\text{M}$  2,4-D com 2,5  $\mu\text{M}$  de cinetina, 16,4 mg/L ácido *p*-cumárico e MS sem suplemento (controle) exibiram sinais em regiões que confirmam que ocorreu a formação de lignina em meio extracelular.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADLER, E.; BJÖRKQUIST, J.; HAGGROTH, S. Über die Ursache der Farbreaktionen des Holzes. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, Denmark, V.2, p.93-94, 1948.

ALWIS, R. D.; FUJITA, K.; ASHITANI, T.; KURODA, K. Induced monoterpene and lignin production in mechanically stressed and fungal elicited cultured *Cupressus lusitanica* cells. **Plant Biotechnology Reports**, v.3, p.57-65, 2009.

BARZ, W.; BEIMEN, A.; DRÄGER, B. JAQUES, U.; OTTO, CH.; SÜPER, E.; UPMEIER, B. Turnover and storage of secondary metabolites in cell culture. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (EDS) **Secondary products from plant tissue culture**. Clarendon Press, p. 79-102, 1990.

BERGMANN, L. Der Einflu von Kinetin auf die Ligninbildung und Differenzierung Gewebekulturen von *Nicotiana tabacum*. **Planta**, v.62, p. 221-254, 1964.

BERLIN, J.; BEIER, H.; FECKER, L.; FORCHE, E.; NOE, W.; SASSE, F.; SCHIEL, O.; WRAY, V. **Conventional and new approaches to increase the alkaloid production of plant cell cultures**. In: NEUMANN, K. H., BARZ, W., REINHARD, E., (eds.). Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Berlin: Springer-Verlag; 1985, 272-280p.

BLEE, K.A.; WHEATLEY, E. R.; BONHAM, V. A.; MITCHELL, G. P.; ROBERTSON, D.; SLABAS, A.R.; BURRELL, M. M.; WOJTASZEK, P.; BOLWELL, G. P. Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesizes secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. **Planta**, v. 212, p. 404-415, 2001.

BRODELIUS, P.; NILSSON, K. Permeabilization of immobilized plant cells, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 265-318, 1983

BROWN, C. L.; R. H. LAWRENCE. Culture of pine callus on a defined medium. **Forest Science** v.14, p.62-64, 1968.

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

BRUNOW, G.; EDE, R. M.; SIMOLA, L. K.; LEMMETYINEN, J. Lignin release from *Picea abies* suspension cultures true native spruce lignins? **Phytochemistry**, v.29, p. 2535-2538, 1990.

BRUNOW, G.; KILPELÄINEN, I.; LAPIERRE, C.; LUNDQUIST, K.; SIMOLA, L. K.; LEMMETYINEN, J. The chemical structure of extracellular lignin released by cultures of *Picea abies*. **Phytochemistry**, v.32, p.845-850, 1993.

**BRUNOW, G.** Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of **lignin**. In: LEWIS, N. SARKANEN, G. S. Eds, **Lignin and Lignan Biosynthesis**. American Chemical Society, Washington, DC, p 131-147, **1998**.

BRUNOW, G.; KILPELAINEN, I.; LAPIERRE, C.; LUNDQUIST, K.; SIMOLA, L.K.; LEMMETYINEN, J. **The chemical structure of extracellular lignin released by cultures of Picea abies**. **Phytochemistry**, v. 32, 4, p. 845-850, 1993.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, K. E.; GRISHAM, M. B. Eds **Peroxidases in Chemistry and Biology**, v.2, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p.25-47, 1991.

CARCELLER, M.; DAVEY, M. R.; FOWLER M. W.; STREET, H. E. The influence of sucrose, 2,4-D, and kinetin on the growth, fine structure, and lignin content of cultured sycamore cells. **Protoplasma**, v. 73, n. 3-4, 1971.

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, p.431-437 2000.

CHARLWOOD, B. V.; CHARLWOOD, K. A. Terpenoid production in plant cell culture. In: Harborne, J. B., Tomas-Barberan, F. A., Eds. **Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids**. Oxford: Clarendon Press; 1991, 95–132p.

DANELUTTE, A. P.; COSTANTIN, M. B.; DELGADO, G. E. ; BRAZ-FILHO, R. ; KATO, M. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6B, p. 1425-1430, 2005.

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

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

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

EDE, R. M.; BRUNOW, G. Application of two-dimensional homo and heteronuclear correlation NMR spectroscopy to wood lignin structure determination. **The Journal Organic Chemistry**, v.57, p.1477-1480, 1992.

EISENREICH, W.; BACHER, A. Elucidation of biosynthetic pathways by retrodictive/predictive comparison of isotopomer patterns determined by NMR

spectroscopy. In: SETLOW, J. K. Ed. **Genetic Engineering**. v. 22, p.121-153. Kluwer Academic Press, Dordrecht, 2000.

ENCINA, C. L.; CONSTANTIN, M.; BOTELLA, J. An easy and reliable method for establishment and maintenance of leaf and root cell cultures of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 245-248, 2001

FACCHINI, P. J. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p.29-66, 2001.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reaction**, Ed. GRUYTER, W. Berlin, p.66, 1984.

FREUDENBERG, K. The hydrogenation of Coniferyl alcohol. In: FREUDENBERG, K., NEISH, A. C. Eds. **Constitution and biosynthesis of Lignin**. Springer-Verlag, Berlin, p.82-92, 1968.

FUKUDA, H.; KOMAMINE, A. Cytodifferentiation. In: **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. VASIL, I. K. Ed, **New York Academic**, v.2, p.149-212, 1985.

GALLÃO, M. I.; CORTELAZZO, A. L.; FEVEREIRO, M. P. S.; BRITO, E S. Response to chitin in suspension-cultured *Citrus aurantium* cells Braz. **Journal Plant Physiology**, v.19, n.1, 2007.

GIROD, P. A. & ZRYD, J. P. Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, p.1-12, 1991

GÓMEZ-VÁSQUEZ, R.; DAY, R.; BUSCHMANN, H.; RANGLES, S.; BEECHING, J. R.; COOPER, R.M. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidase in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. **Annals of Botany**, v. 94, p. 87-97, 2004.

GRABBER, J. H.; RALPH, J.; LAPIERRE, Y.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell-wall biosynthesis and degradability. I. Components and structure of cell walls in grasses. **Comptes Rendus Biologies**, 2004.

GUSTAFSSON, M. ; KÄRKONEN, A. ; SIMOLA, L.K.; TEERI, T. H.; SIPILÄ, J.; KILPELÄINEN, I. BRUNOW, G.  $\beta$ -Fluoro-coniferyl alcohol does not inhibit lignin biosynthesis in suspension cultures of *Picea abies* (L.) Karst. **Phytochemistry**, v. 58, p. 243-248, 2001.

HAGENDOORN, M. J. M.; ZETHOF, J. L. M.; HUNNIK, E. van.; der Plas, L. H. W. van.; Regulation of anthocyanin and lignin synthesis in *Petunia hybrida* cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, n.2, p.141-147, 1991b.

HAGENDOORN, M.; GEELLEN, T.; van BEEK, T.; JAMAR, D. TETTEROO, F.; van der PLAS, L. Occurrence of polygodial in plant organs and tissue culture of *Polygonum hydropiper*. **Physiologia Plantarum**, v. 92, p. 595-600, 1994.

HANO, C.; ADDI, M.; BENSADDEK, L.; CRÔNIER, D.; BALTORA-ROSSET, S.; DOUSSOT, J.; MAURY, S.; MESNARD, F.; CHABBERT, B.; HAWKINS, S.; LAINÉ, E.; LAMBLIN, F. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. **Planta**, v. 223, p. 975-989, 2006.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, p. 832-839, 2005.

HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v.52, p.2-8, 2006.

HÖSEL, W.; FIEDLER-PREISS, A.; BORGMANN, E. Relationship of coniferin  $\beta$ -glucosidase to lignification in various plant cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.1, n.1, 1981.

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

KÄRKÖNEN, A. **Plant tissue cultures as models for tree physiology: somatic embryogenesis of *Tilia cordata* and lignin biosynthesis in *Picea abies* suspension cultures as case studies.** Academic dissertation, Helsinki, 89p. 2001.

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

KOBLITZ, H. Die chemie der Zellwand in vitro kultivierter pflanzlicher Gewebe. **Faserforsch Textiltech**, v. 13, p. 270-275, 1962.

KRETZSCHMAR, F. S.; OLIVEIRA JR., C. J.; BRAGA, M. R. Differential sugar uptake by cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.43, p. 71-78, 2007.

KUBOI, T.; YAMADA, Y. Regulation of the enzyme activities related to lignin synthesis in cell aggregates of tobacco cell cultures. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 542, p. 181-190, 1978.



LANGE, B. M.; LAPIERRE, C. ; SANDERMANN, H. Jr. Elicitor-induced spruce stress lignin (structural similarity to early developmental lignins). **Plant Physiology**, v. 108, p.1277-1287, 1995.

LESNEY, M. S. Effect of 'elicitors' on extracellular peroxidase activity in suspension-cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, n.3, 1990.

LEWIS, N. G. A 20<sup>th</sup> Century roller coaster ride: a short account of lignification, *Curr. Opin. Plant. Biology*, v.2, p.153-162, 1999.

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

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

LIU, Z-H; HSIAO, I-C; PAN, Y-W. Effect of naphthaleneacetic acid on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and auxin oxidase in hypocotyl cutting of soybean during formation. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.37. n.4, p. 247-253, 1996.

LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.29, p.92-96, 1993.

MARCO, A.; GUZZARDI, P.; JAMET, E. Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. **Plant Physiology**, v. 120, p. 371-381, 1999.

McALPINE, J. B.; PAZOLES, C.; STAFFORD, A. Bioassay methods in natural products research and drug development. In: BOHLIN, L.; BRUHN, J. G. Eds. **Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 43, p.159-166, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.

MESSNER, B.; BOLL, M. Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v.34, p.261-269, 1993.

MICIC, M., ORBULESCU, RADOTIC, K., JEREMIC, M., SUI, G., SHENG, YUJUN, LEBLANC, R. M. **Biophysical Chemistry**, n.99, p.55-62, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-479,

1962.

MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey. **Plant Growth Regulation**, v. 35, p. 269-275, 2001.

NANDI, S. K.; LETHAM, D. S.; PALNI, L. M. S.; WONG, O. C.; SUMMONS, R. E. 6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. **Plant Science**, v. 61, p. 189–196, 1989.

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, p.71-79, 1995.

NUÑEZ-PALENIUS, H. G.; OCHOA-ALEJO, N. Efect of phenylalanine and phenylpropanoids on the accumulation of capsaicinoids and lignin in cell cultures of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, v. 41, n. 6, p. 801-805, 2005.

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.

PRYKE, J. A.; REES, T. Activity of the pentose phosphate pathway during lignification. **Planta**, v. 132, p. 279-284, 1976.

RALPH, J.; GUILLAUMIE, S.; GRABBER, J. H.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell-wall biosynthesis and degradability. III. Towards a forage grass ideotype. **Comptes Rendus Biologies**, v.327, p.467-479, 2004.

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

RAO, B. R.; D. KUMARI, V.; AMRUTHA, R. N.; JALAJA, N.; VAIDYANATH, K.; RAO, A. M. SRINATH RAO RATHNAGIRI POLAVARAPU AND P. B. KAVI KISHOR. Effect of growth regulators, carbon source and cell aggregate size on berberine production from cell cultures of *Tinospora cordifolia* Miers. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.2, n.2, p.269 -276 2008.

RICHARDSON, A.; DEIGHTON, N.; DUNCAN, J. A.; McDOUGALL, G. J. Oxidases participate in the formation of wood. **The Salford Centre for Research & Innovation Annual Report**, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee. p.129-131, 2000.

ROBERTS, L. W. Hormonal Aspects of Vascular Differentiation. In: ROBERTS, L. W., GAHAN, P. B., ALONI, R. **Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators (Springer series in wood science)**. USA, Springer-Verlag, p.22-38, 1988.

ROBERT, D. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. In: LIN, Z. S; DENCE, D. W. Eds, **Methods in Lignin Chemistry**. Springer-Verlag, Berlin, p.250-273, 1992.

ROGERS, L. A.; CAMPBELL, M. The genetic control of lignin deposition during plant growth and development. **New Phytologist**, v.164, p.17-30, 2004.

ROKEM, J. S.; GOLDBERG, I. Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: methods for yield improvement. **Advances in Biotechnological Processes** (USA), v. 4, p. 241-274, 1985.

ROLFS, C. H.; SCHÓN, H.; STEFFENS, M.; KINDL, H. Cell suspension culture of *Arachis hypogaea* L.: model system of specific enzyme induction in secondary metabolism. **Planta**, v. 172, p. 238-244, 1987.

SHIMON-KERNER, N.; MILLS, D.; MERCHUK, J. C. Sugar utilization and invertase activity in hairy-root and cell-suspension cultures of *Symphytum officinale*. **Plan Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 89-94, 2000.

SIMOLA, L. K. & SANTANEN, A. Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megametophyte and callus line of *Picea abies*, **Phytochemistry**, n. 80, p.27-35, 1990.

SIMOLA, L. K; LEMMETYINEN J.; SANTANEN, A. Lignin release and photomixotrophism in suspension cultures of *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, n. 84, p.374-379, Copenhagen, 1992.

SLONE, H. J. & BUCKHOUT, T. J. Sucrose-dependent H<sup>+</sup> transport in plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves (*Beta vulgaris* L.): evidence in support of the H<sup>+</sup>-symport model for sucrose transport. **Planta**, v. 183, p. 584-589, 1991.

STREET, H. E. Cell (Suspension) cultures -techniques. In: STREET, H. E. Ed. **Plant Tissue and Cell Culture**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p.61-102, 1977.

TAKABE, K.; MIYAUCHI, S.; TSUNODA, R.; FUKAZAWA, K. Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in Japanese beech (*Fagus crenata*): variation within an annual ring. **International Association of Wood Anatomists Bulletin**, v.13, p. 105-112, 1992.

VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v.1, p.13-25, 2002.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; TEN HOOPEN, H. J. G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemical. **Biotechnology Letters**, v. 21, p.467-479, 1999.

WINK, M. Plant breeding – Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical Applied Genetics**, v. 75, p.225-233, 1988.

WINK, M.; PERREY, R.; SCHNEIDER, M.; WARSKULAT, U.; YON BORSTEL, K.; MENDE, P. Alkaloid metabolism and gene expression in cell suspension cultures of *Lupinus polyphyllus* and *L. hartwegii*. In: OONO, K. **Plant Tissue Culture and Gene Manipulation for Breeding and Formation of Phytochemicals**. National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Japan, p.101-119, 1992.

WINK, M. The cell culture medium – a functional extracellular compartment of suspension-cultured cells. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 38, p. 307-319, 1994.

WU, J.; ZHANG, J. J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technology and applied aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 209-212, 1999.

## **CAPÍTULO III**

### **Desidrogenação polimérica de monolignóis em colchão de meio nutritivo contendo elicitores**

## RESUMO

*In vitro*, as ligninas têm sido modeladas pela polimerização desidrogenativa, os DHPs ou ligninas sintéticas. Os DHPs são constituídos, *in vitro*, por meio de polimerização desidrogenativa semelhante à que ocorre na formação da lignina natural na parede celular das plantas. Considerando que a lignina não pode ser isolada em sua forma natural, a polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico obtida *in vitro*, é usada como um modelo para reprodução do comportamento das ligninas *in situ*. O principal objetivo deste trabalho foi produzir e analisar os DHPs em condições similares às de produção de material extracelular liberado e/ou formado pelas células de *Eucalyptus grandis* em suspensão, em meio nutritivo MS contendo diferentes tratamentos. Para isto, foi realizado um experimento para obtenção de síntese de DHPs em meio de cultura MS filtrado, obtido a partir da cultura de células em suspensão de *Eucalyptus grandis*. Após 30 dias de cultivo das células em suspensão, o meio de cultura líquido, presente em cada Erlenmeyer, foi filtrado por meio de membranas de Millipore (0,22  $\mu\text{M}$ ) gerando um filtrado (125 mL) de cada tratamento. O filtrado de cada tratamento foi usado como substrato (colchão), para formação de DHPs. Em cada experimento de síntese, foi dosado e gotejado  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxidase e uma combinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com peroxidase formando doze tratamentos. Outro modelo proposto no experimento foi a utilização do meio MS como substrato (colchão) para a formação da polimerização desidrogenativa (DHP), isto é, o meio de cultura MS na forma líquida (sem prévio cultivo das células). A este meio foram adicionadas três soluções (álcool coniferílico ou sinapílico, peroxidase e o peróxido de hidrogênio) simultaneamente por gotejamento. Assim, foram formados quatro tratamentos do álcool coniferílico e quatro tratamentos do álcool sinapílico. Todos os experimentos foram realizados em uma sala com temperatura controlada a 25°C, ausência de luz e em pH 5.8. Os materiais resultantes das DHPs dos filtrados foram liofilizados e analisados por espectroscopia de IV e RMN H. E os materiais resultantes das DHPs dos meios MS, sem prévio cultivo de células, foram analisados por RMN H e RMN<sup>13</sup>C. Como instrumento de comparação dos resultados dos espectros de RMN<sup>13</sup>C dos DHPs de álcool coniferílico e álcool sinapílico, foram elaboradas tabelas com os deslocamentos químicos para os tratamentos. Pelos lívidos resultados espectrais no IV, não foi observada formação de polimerização desidrogenativa para os experimentos realizados com os filtrados celulares. Os espectros de RMN H e RMN<sup>13</sup>C confirmaram a formação de DHP do álcool coniferílico nos meios MS (sem prévio cultivo de células) nos tratamentos com 10 $\mu\text{M}$  2,4-D + 2,5 $\mu\text{M}$  cinetina, 100 $\mu\text{M}$  de ácido *p*-cumárico e na testemunha (MS sem suplemento extra). O espectro de ambas acusaram também ausência de DHP no tratamento contendo 0,0584  $\mu\text{M}$  de sacarose. E para o álcool sinapílico, os espectros de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C confirmaram a formação de DHP apenas quando foi adicionado 10 $\mu\text{M}$  2,4-D + 2,5 $\mu\text{M}$  cinetina. Desta maneira, foi possível concluir que as características das DHPs variam de acordo com as condições expostas para a síntese.

**Palavras chave:** álcool coniferílico; álcool sinapílico; lignina

## ABSTRACT

*In vitro*, the lignins have been modeled by the dehydrogenize polymerization, DHPs or synthetic lignins. The DHPs are formed *in vitro* by dehydrogenize polymerization similar to natural lignin formed in plant cellular wall. Considering that lignin cannot be isolated in its natural form, the coniferyl alcohol dehydrogenize polymerization obtained *in vitro* is used as a model to reproduce *in situ* lignins behavior. The main objective of this research was to produce and to analyze the DHPs in similar way the extracellular material is produced, liberated and/or formed by *Eucalyptus grandis* cells suspension culture in MS culture medium at different treatments. For this, an experiment was done to obtain DHPs synthesis in MS culture medium filtrated, obtained from *Eucalyptus grandis* cells culture suspension. After 30 days of cells suspension cultivation, the liquid medium culture present in each Erlenmeyer was filtered by Millipore (0,22  $\mu\text{M}$ ) membranes generating a filtrated (125 mL) for each treatment. The filtrated of each treatment was used as substratum (mattress), to induce DHPs formation. In each synthesis experiment, it was dosed and dripped  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxidase and a combination of  $\text{H}_2\text{O}_2$  with peroxidase forming twelve treatments. Another proposed model for the experiment was MS culture medium as substratum (mattress) for dehydrogenize polymerization (DHP) formation, that is, the liquid MS culture medium (without prior cultivation of cells). Three solutions (coniferyl or sinapyl alcohol, peroxidase and the  $\text{H}_2\text{O}_2$  peroxidase) were added to the culture medium at the same time by drip. Thus, it was formed four treatments of the coniferyl alcohol and four treatments of the sinapyl alcohol. All the experiments were developed at a room with controlled temperature to  $25^\circ\text{C}$ , light absence and in pH 5.8. The DHPs filtrates were lyophilized and analyzed by IR and HNMR spectroscopy. The DHPs obtained MS medium culture without previous cultivation of cells were analyzed by H NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR. The DHPs results of  $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of coniferyl and sinapyl alcohol were compared, and tables were elaborated with the chemical displacements for the treatments. The IR results didn't present dehydrogenized polymerization formation for the experiments done with the cellular filtrated. The H NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR spectrum confirmed coniferyl alcohol DHP formation in MS medium culture (without previous cells cultivation) in the treatments with  $10\mu\text{M}$  2,4-D +  $2,5\mu\text{M}$  kinetin,  $100\mu\text{M}$  *p*-coumaric acid and control (MS without extra supplement). The spectrum accused the absence of DHP in the treatment with  $0,0584\ \mu\text{M}$  of sucrose. And for the sinapyl alcohol, H NMR and  $^{13}\text{C}$ NMR spectrum confirmed the DHP formation only when it was added  $10\mu\text{M}$  2,4-D +  $2,5\mu\text{M}$  kinetin. It was possible to conclude that the DHPs characteristics vary in agreement with the exposed conditions for its synthesis.

**Key words:** coniferyl alcohol; sinapyl alcohol; lignin

## 1. INTRODUÇÃO

Os modelos propostos para um estudo aprimorado da estrutura de ligninas nativas (protolignina) não produzem um material inalterado e são, em sua grande maioria, baseados em lignina de coníferas. As metodologias usadas para o isolamento da lignina não permitem, ao final, obter a lignina de forma íntegra. Considerando que a lignina não pode ser isolada em sua forma nativa, a desidrogenação de polímeros de álcool coniferílico, obtida *in vitro*, é usada como um modelo que reproduz o comportamento de ligninas naturais (LEWIS et al., 1997).

Ao invés de usar protolignina, modelos compostos de lignina da polimerização desidrogenativa de monolignóis (DHP) e lignina de madeira moída são frequentemente usadas em estudos de reações de lignina em aplicações técnicas (HAFRÉN et al., 2002). HAFRÉN et al. (2002) definem DHP como substâncias modelos de lignina de baixo peso molecular que têm sido utilizadas ao invés de protolignina (lignina nativa) para estudos mais detalhados.

*In vivo*, as ligninas são polímeros complexos que ocorrem nas paredes celulares e lamela média das plantas, e sua síntese, que é um processo iniciado enzimaticamente, envolve a polimerização dos três precursores (monolignóis) do álcool cinamílico (SARKANEN & LUDWIG, 1971).

*In vitro*, as ligninas têm sido modeladas pela desidrogenação de polímeros, os DHPs ou ligninas sintéticas. Os DHPs são a formação, *in vitro*, de uma polimerização desidrogenativa semelhante à lignina nativa formada na parede celular das plantas, e caracteriza sua biossíntese, estrutura e degradação (FREUDENBERG, 1968; ADLER, 1977; KIM & RALPH, 2005).

Já para TOLLIER et al. (1991) as ligninas sintéticas formadas sob estas condições diferem estruturalmente das ligninas naturais das plantas.

Desde a década de 50, compostos macromoleculares semelhantes à lignina têm sido sintetizados *in vitro* (MICIC et al., 2002).

Estudos realizados por MÄDER et al. (1980); SATO et al. (1995), entre outros, defenderam o envolvimento da peroxidase no DHP para ligninas de plantas superiores.

No Brasil, algumas espécies de eucalipto são destaques comerciais, por exemplo, o *Eucalyptus grandis*. É do Brasil a posição de maior área plantada de eucalipto do mundo. A importância do eucalipto para o Brasil e os poucos estudos relacionados à lignificação em angiospermas são fatores que impulsionaram a necessidade de produzir ligninas para estudos desse polímero natural em ambiente quimicamente diversificado. Assim, esse trabalho procurou comparar modelos de ligninas realizadas *in vitro* utilizando o meio de cultura onde foram produzidas células de *Eucalyptus grandis*, isto é, DHPs dos filtrados do meio MS com DHPs produzidas também no meio MS sem células.

Para KIM et al. (2002) algumas condições do meio de cultura podem maximizar a produção de metabólitos secundários *in vitro* tais como: fases de crescimento da cultura; facilidade de manipulação dos nutrientes; elicitores; condições de luminosidade; ciclo de subcultura e mudança de pH (SAENZ-CARBONELL et al., 1993).

Muitos aspectos concernentes à biossíntese, estrutura, degradação e interação da lignina com outros componentes da parede celular da planta ainda necessitam de esclarecimentos. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi produzir e analisar os DHPs em meios similares aos de produção de material extracelular liberados e/ou formados pelas células de *Eucalyptus grandis* em suspensão em meio nutritivo MS segundo diferentes



tratamentos. Os objetivos específicos foram: produzir DHPs com os filtrados de meio líquido onde foram cultivadas as células em meio nutritivo MS; produzir DHPs de álcool coniferílico e álcool sinápico em meio nutritivo MS e identificar, caracterizar e classificar estruturalmente os DHPs formados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Desidrogenação Polimérica de Monolignóis (DHP)

Os DHPs têm sido formados na presença de carboidratos, oligossacarídeos ou proteínas para investigar como os componentes da parede celular são acoplados à lignina e também como afetam sua estrutura (TERASHIMA & SEGUCHI, 1988; OHNISHI et al., 1992; RALPH et al., 1992). Para TERASHIMA et al. (1996), em preparações convencionais de DHP, é comum a adição de peróxido de hidrogênio diretamente à composição monolignol/enzima. Entretanto, para os mesmos autores, o preparo de DHP simulando as condições naturais de lignificação utilizando géis de polissacarídeos como matrizes para a polimerização e produção *in situ*, de peróxido de hidrogênio produzido por glicose oxidase, tem resultado em uma estrutura de DHP mais similar à lignina nativa que estrutura de DHP preparada convencionalmente. O tipo frequentemente empregado de lignina de DHP é preparado de álcool de coníferílico (LEWIS et al., 1987).

Diversos fatores têm sido enfatizados por afetarem a polimerização de monolignol *in vitro*. TERASHIMA et al. (1996), citou como exemplo, o pH. O pH natural exato da lignificação não é conhecido, mas, o pH tem sido relatado por ter grande efeito sobre a polimerização de monolignol (TERASHIMA & ATALLA, 1995).

Segundo HATFIELD & VERMERRIS (2001) a matriz da parede celular pode influenciar a formação de ligninas; dessa forma, muitas ligninas sintéticas (DHPs) têm sido produzidas em presença de polissacarídeos (TERASHIMA et al., 1996).

Segundo RANOCHA et al. (1999) existia a possibilidade que a polimerização desidrogenativa de monômeros de lignina pudesse ser realizada por várias enzimas diferentes e que a peroxidase como uma enzima exclusivamente envolvida na lignificação (RANOCHA et al., 1999).

Outro fator importante é a concentração de  $Ca^{2+}$ , pois, há relatos que em mudas de abeto desenvolvidas em meio líquido controlado, a deposição de lignina e hemicelulose é inibida por baixa concentração de  $Ca^{2+}$  e é estimulada a uma alta concentração (EKLUND & ELIASSON, 1990).

Durante a formação de lignina artificial, são formadas aparentemente ligações com proteínas da parede celular (WHITMORE, 1982). Há evidência que a lignina forma ligações covalentes com proteínas da parede celular (WHITMORE, 1978). Através de um processo oxidativo, formam-se radicais fenólicos, que em seguida sofrem reações de acoplamento, cujo processo dirigente ainda não está claramente definido (LEWIS & SARKANEN, 1998).

A lignificação tem sido temporal e espacialmente correlacionada com a secreção do aparelho de Golgi de proteínas ricas em glicina e prolina (RYSER et al., 1997; MÜSEL et al., 1997). Para BURLAT et al. (2001) apesar de ser um fato a presença dessas proteínas na arquitetura da parede celular em amadurecimento, nenhuma função bioquímica explícita foi demonstrada *in vitro* para qualquer classe de proteínas.

### 2.2 Estudos com DHPs

O estudo dos passos da síntese de lignina, bem como suas interações com outros componentes desperta interesse em muitos pesquisadores. Para tal, o progresso no estudo

desse polímero natural, depende do seu isolamento e identificação das suas unidades construtoras (VAN SOEST, 1994).

É possível, através do DHP, modelar e caracterizar *in vitro*, a biossíntese, estrutura e degradação da lignina (CATHALA et al., 2004).

### 2.2.1 Biossíntese

Uma variedade de sistemas modelos tem sido desenvolvida, incluindo a polimerização de precursores de lignina catalisada por oxidação *in vitro* em desidrogenação polimérica (DHP) iniciada há 50 anos (MÉCHIN et al., 2007).

Para elucidar aspectos relacionados aos papéis de enzimas envolvidas na polimerização final de monolignóis precursores de lignina, RANOCHA et al., (1999) utilizaram o DHP com o objetivo de confirmar evidências de um potencial relação da enzima lacase na lignificação. RANOCHA et al., (1999) obtiveram, entre outros resultados, que, em geral, os aspectos de DHPs produzidas por lacase purificada de coniferaldeído e sinapaldeído têm semelhança com aquelas obtidas de monolignóis.

A identidade das enzimas que realizam o acoplamento desidrogenativo de monolignóis para formar as ligninas tem sido um assunto para debate de longo alcance (GUAN et al., 1997).

Peroxidases usadas para catalisar a formação de DHPs *in vitro* tornam-se firmemente associadas com os DHPs e conservam a atividade (EVANS & HIMMELSBACH, 1991).

Para melhor entender o mecanismo da formação da desidrogenação polimérica por (peroxidase ligada cationicamente à parede celular), SASAKI et al. (2004) estudaram a eficiência catalítica de oxidação de lignóis diméricos e poliméricos por uma peroxidase específica. Estudaram também o potencial de transferência do radical do monolignol para o lignol polimérico. Demonstraram que a peroxidase ligada cationicamente à parede celular é eficiente para oxidar o polímero; porém, uma transferência de álcool coniferílico para polímeros de lignina é inadequada. Estabeleceram que o radical do álcool coniferílico foi transferido rapidamente para o álcool sinapílico, e que o radical mediador teoricamente não explica suficientemente o mecanismo para a polimerização desidrogenativa de lignina.

Uma peroxidase ligada cationicamente à parede celular em calos de choupó (*Populus alba* L.) mostraram uma forte preferência de substrato para álcool sinapílico e o dímero de álcool sinapílico, siringaresinol. Para SASAKI et al. (2004) os resultados sugerem que a peroxidase ligada cationicamente à parede celular pode ser uma isoenzima de peroxidase responsável pela lignificação de paredes celulares.

Com o objetivo de avaliar a influência da proporção da peroxidase/álcool coniferílico sobre a síntese do polímero desidrogenado (DHP), MÉCHIN et al. (2007) prepararam DHPs com o método contínuo e com o método descontínuo. Diferenças na organização molecular são observadas quando o método descontínuo foi mudado para o método contínuo ou quando a proporção de polimerização é mais baixa por uma liberação gradual do precursor da lignina através de tubo de diálise (MÉCHIN et al., 2007). Nesse trabalho, a investigação da fração do polímero foi realizada por tiacidólises, um método já aplicado aos DHPs para estudar a influência de vários parâmetros sobre a estrutura do polímero (GRABBER et al., 2003). Análise de cromatografia de exclusão estérica da mistura tiacidólises sem nenhuma derivação, informa sobre o tamanho da área (domínio) de

derivados de lignina condensada e sobre a distribuição das ligações  $\beta$ -O-4 dentro do polímero inteiro (MÉCHIN et al., 2007).

Os DHPs são relatados como polímeros altamente condensados (baixa proporção de ligações  $\beta$ -O-4) e anormalmente ricos em grupos finais de álcool coniferílico (15% - 40%) (TERASHIMA et al., 1996).

A diferença mais notável é que a ligação  $\beta$ -O-4 é mais comum em lignina da planta (nativa) que em DHP; entretanto, ligações carbono-carbono assim como 5-5 são muito mais comuns em DHP que em lignina nativa (LEWIS et al., 1998).

Já CATHALA & MONTIES (2001) usaram os métodos contínuos e descontínuos para mensurar mais detalhadamente a solubilidade e massas molares de DHPs em relação ao processo de polimerização em presença de quantidade crescente de pectina e concluíram que a pectina aumenta a solubilidade do DHP e é provável que o complexo lignina-carboidrato age como uma molécula surfactante para formar agregado ou estruturas como micelas.

McDOUGALL (2001) usou o DHP *in vitro* para descrever a insolubilização de glicoproteínas associadas à parede celular de xilema em lignificação de abeto *Sitka* durante a desidrogenação de álcool coniferílico catalisado pela peroxidase. Embora as condições para a formação dos DHPs (70 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10 mM álcool coniferílico) sejam improváveis de existirem *in vivo*, a insolubilização seletiva de oxidases e peroxidases em DHPs *in vitro* podem ter comparações com tecidos em lignificação (McDOUGALL, 2001). Assim, o autor relatou que a atividade de peroxidase e oxidase está firmemente ligada aos DHPs, e os polipeptídeos – que diminuiriam em quantidade nos extratos durante a formação de DHPs – foram ativados em seu estado insolúvel.

### 2.2.2 Estrutura

Para análise espectroscópica de materiais contendo lignina, AGARWAL & TERASHIMA, (2003) modelaram DHPs (incluindo duas análogas de DHP guaiacilica) para estudos. Os mesmos autores relataram conclusivamente, que os DHPs apresentaram diferenças estruturais que possibilitaram, sem dificuldade, distinguir entre as características de DHPs de siringilas, guaiacilas e cumarilas e amostras de madeira moída de angiospermas e de gimnospermas foram reproduzidas nos espectros de DHPs.

MICIC et al. (2002) apresentaram uma hipótese de que a estrutura da lignina consiste de reuniões supramoleculares esféricas e ocas. Para tal, os autores exploraram as propriedades interfaciais de composto modelo de lignina baseado sobre o álcool poli-coniferílico polimerizado enzimaticamente, isto é, composto modelo de lignina sintetizado quando são misturados no começo da reação, em que é conhecido como polímero desidrogenado ou ZL-DHP.

Uma variedade de modelos de lignina simples e DHP foram usados para demonstrar a capacidade quantitativa do método espectroscopia Raman. E como conclusão, AGARWAL & RALPH (1997) relataram que o método FT-Raman foi bem sucedido na quantificação de estruturas etilênicas conjugadas ao anel em DHP de lignina e polpas termomecânicas.

Nos estudos sobre o mecanismo de lignificação e o processo de deposição de lignina na parede celular, HAFRÉN et al. (2002) não utilizaram os métodos frequentemente empregados, tais como: a protolignina, a desidrogenação polimérica de monolignóis, isto é,

o DHP clássico, e a lignina de madeira moída. Os autores produziram um complexo de DHP-parede celular, a partir de uma mistura de coniferina e amostra xilema (coletado por raspagem) empregando enzimas naturais ligadas à parede celular, com e sem a adição de  $\beta$ -glucosidase (enzima relacionada ao metabolismo de carboidratos da parede celular) e glucose-oxidase (enzima que catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glucose), concluindo que o material utilizado pode servir como um modelo para estudos sobre a estrutura da lignina e de suas reações sobre várias condições como polpação, branqueamento e foto-amarelecimento; os autores concluíram também que esse método pode ser usado sob condições de laboratório para estudos mais avançados dos mecanismos de lignificação *in vitro* e de como as condições de lignificação afetam a estrutura da lignina.

Com objetivos de determinar a organização supramolecular dos polímeros de DHP sobre vários substratos (grafite, mica e vidro) e para estudar as propriedades superficiais dos substratos na estrutura supramolecular da lignina, MICIC et al. (2000) utilizaram microscopia eletrônica na investigação de modelo composto de lignina polimerizada enzimaticamente do álcool coniferílico. Através das análises, os autores evidenciaram que há pelo menos quatro níveis diferentes de estruturas supramoleculares de lignina e que sua organização supramolecular depende das características superficiais dos substratos, tais como hidrofobicidade, orbitais deslocados e energia de superfície livre.

Como já foi relatado, anteriormente, a fotoquímica da lignina é amorfa e tem aparência randômica, enquanto que lignina produzida enzimaticamente apresenta estruturas ordenadas MICIC et al. (2001a) investigaram fotoquimicamente as propriedades da lignina, através de DHP, constatando que a fotoquímica da polimerização da lignina pode ser um dos efeitos da degradação da radiação UV para as células vegetais.

BARAKAT et al. (2007) avaliaram a solubilidade e a estrutura química de DHPs-AX (DHPs preparados em presença de arabinoxilanas) e DHPs controles ((DHPs preparados sem arabinoxilanas). Os resultados indicaram que a frequência de ligações éter  $\beta$ -alquil-aril e o peso molecular dos DHPs diminuíram insignificamente sob as mesmas condições.

A organização supramolecular de partículas compostas de heteroxilanas e lignina sintética (DHPs) foi estudada por dispersão da luz, microscopia de força atômica e sonda fluorescente (BARAKAT et al., 2008). Pelos resultados, os autores identificaram diferença no comportamento mecânico entre as partes internas e externas dessas partículas.

A determinação dos tamanhos das partículas e das massas molares indicaram que amostras de HX-90 (heteroxilana extraída de farelo de milho a 90°C com 1% de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) formaram partículas mais densas que a HX-40 (heteroxilana extraída do farelo de milho a 40°C com 1,5M de KOH) (MERYDY et al., 2002a). Para esta determinação, os autores utilizaram o álcool coniferílico e uma mistura de álcool coniferílico/álcool sinapílico (razão 1/1) que foram polimerizados para formar DHPs em presença de duas heteroxilanas estruturalmente similares, diferindo somente em suas configurações de substituição fenólica.

Combinando microscopias eletrônica e de força atômica, MICIC et al. (2001b) produziram lignina sintética, a partir da polimerização enzimática, evidenciando a existência de forças intermoleculares fortes, que são responsáveis por controlar os glóbulos de lignina unidos em estruturas altamente ordenadas. Baseado nestas observações, os autores confirmaram a hipótese de que os glóbulos de lignina consistem de no mínimo duas camadas esféricas individuais, com espaço no meio preenchido com solvente ou gás. MERYDY et al. (2002b) conduziram estudo comparativo entre uma lignina sintética (DHP) e

uma lignina extraída. É importante ressaltar que cada método fornece informação apenas sobre uma parte do sistema. Nesse trabalho, os autores concluíram que as características dos substratos lignocelulósicos e dos resíduos extraídos das paredes celulares da palha de trigo são similares, embora, o DHP apresente diferenças importantes quando comparado com materiais lignocelulósicos naturais.

ÖNNERUD et al. (2002) produziram DHP a partir de acetato Mn (III) (substância química inorgânica usada como oxidante) em uma solução dioxano/água, em quantidade suficiente de DHP para análise por espectroscopia de RMN. Entre os resultados obtidos, os autores observaram que as estruturas  $\beta$ -1 não estavam presentes no DHP.

A lignina é um dos biopolímeros mais abundantes da natureza, possui uma estrutura racêmica complexa, podendo ser formada por uma polimerização radical iniciada por enzimas redox, mas, grande parte sobre este processo permanece desconhecida (ÖNNERUD et al., 2002). Dessa forma, os autores sintetizaram oligômeros de lignina de acordo com uma nova substância, na qual a peroxidase não fica em contato direto com os monômeros de lignina de coniferaldeído e com o álcool coniferílico. Ao invés disso, o oxalato de manganês atuou como um transportador difusível redox, primeiramente foi oxidado de Mn(II) para Mn(III) por uma peroxidase, e posteriormente, foi reduzido para Mn(II) por uma oxidação simultânea dos monômeros de lignina para aqueles radicais fenóxidos formados por ligações covalentes dos tipos de lignina (G, S e H). Além disso, a alta massa molecular polimérica foi gerada por oxidação de álcool coniferílico por acetato Mn(III) em uma mistura de dioxano e água. Este polímero foi muito similar à lignina natural da madeira de abeto (*Picea sp*), de acordo com seus espectros de RMN. O possível envolvimento de um sistema transportador redox peroxidase em biossíntese de lignina é discutido.

### 2.2.3 Degradação

O ciclo do carbono tem significativa contribuição na biodegradação da lignina, que constitui a segunda maior reserva natural de carbono fixo depois da celulose (EGGERT et al., 1996). Os fungos da podridão branca constituem organismos com capacidade para mineralizar a lignina (TIEN & KIRK, 1983), sendo os mecanismos enzimáticos empregados por esses fungos - para a desestruturação da lignina - considerados de grande interesse para a pesquisa (ERIKSSON & ANDER, 1990).

Devido à complexidade do polímero de lignina, suas subestruturas foram usadas como composto modelo para definir reações específicas. Para TIEN & KIRK (1983) a identificação de reações individuais do processo de degradação da lignina é essencial para definir o mecanismo bioquímico.

Os fungos da podridão branca são de grande interesse, pois, estes organismos são capazes de degradar polímeros estruturais originados de material vegetal (LEWIS et al., 1987; EGGERT et al., 1996). Destes fungos, *Phanerochaete chrysosporium*, é a espécie que tem despertado maior interesse por ser capaz de degradar até certo ponto a lignina (ANDER & ERIKSSON, 1975).

Em trabalhos recentes, tem sido relatado que tratamento de ligninase (enzima isolada de fungo *Phanerochaete chrysosporium* descrita como tendo grande capacidade de degradar a lignina) em lignina não metilada, resulta na polimerização e despolimerização do material fenólico (KIRK, 1986).

Estudos mais detalhados revelaram que a ligninase é uma isoenzima de peroxidase. Entretanto, sabe-se que a peroxidase não têm a capacidade de degradar a lignina. Dessa forma, LEWIS et al. (1987) comprovaram, por meio de experimentos realizados com DHP de lignina preparada a partir de álcool coniferílico, que a peroxidase atua especificamente no rearranjo interno dos componentes poliméricos, e não na despolimerização das ligninas sintética (DHP) e natural, realizada pela ligninase. REID (1991) para estudar a dinâmica da degradação de lignina pelo fungo *Phlebia tremellosa* (fungo de podridão branca que degrada seletivamente a lignina em madeira – em que a mineralização de carbono da lignina está reduzida) - utilizou produtos da desfragmentação de DHP em culturas dessa espécie. O autor concluiu que a correlação, entre a estimulação inicial de polimerização de DHP com a estimulação posterior de mineralização por agitação e Tween, sugere que polimerização oxidativa não interfere na degradação posterior e pode realmente preparar lignina para o desarranjo.

A lignificação de parede celular reduz a degradação por microorganismos do rúmen (WILSON, 1993). Sendo assim, o entendimento dos tecidos lignificados e de quando ocorre a lignificação é fundamental (JUNG & CASLER, 2006). Embora esteja claro que a presença de lignina nas paredes celulares impacta negativamente a degradação das forragens, permanecem ainda dúvidas sobre as causas exatas deste efeito (JUNG & CASLER, 2006).

A degradação de lignina é um passo importante no ciclo do carbono. A *Shingomonas paucimobilis* SYK-6 produz enzimas únicas e específicas para a degradação da lignina. A quebra da ligação éter arilglicerol- $\beta$ -aril é a mais importante no processo metabólico realizado por *Shingomonas paucimobilis* SYK-6. SONOKI et al. (2002) sintetizaram uma lignina de alto peso molecular fluorescente (UBE-DHP) por meio da polimerização desidrogenativa (DHP) e examinaram a habilidade de enzimas quebrarem a ligação éter- $\beta$ -aril em combinação com a bactéria *Escherichia coli*. Os autores concluíram que a enzima *Shingomonas paucimobilis* SYK-6 pode ser expressa em *Escherichia coli* e tem habilidade de quebrar a ligação éter- $\beta$ -aril em lignina sintética de alto peso molecular.

Os mecanismos de rompimento das cadeias laterais e dos anéis aromáticos pelas enzimas peroxidase de lignina e lacase foram elucidados por uso de subestruturas diméricas de lignina marcadas com  $^{18}\text{O}$ ,  $^2\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e DHP marcado com  $^{18}\text{O}$  e  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  (HIGUCHI, 2006).

### 2.3 Proteínas na lignificação

Nas células, a lignina é sintetizada por meio de processo altamente mediado por sistema enzimático, envolvendo enzimas oxidases (peroxidases e lacases) (LEWIS, 1999).

Atualmente, vários trabalhos têm detalhado o mecanismo enzimático envolvido na síntese da lignina; entretanto, ainda persiste a dúvida em relação ao modelo envolvido na síntese destas proteínas da parede celular (ROUHI, 2000; GUAN et al., 1997).

Na formação da lignina *in vivo*, é necessário um sistema oxidativo para o acoplamento dos dímeros, mas não se tinha conhecimento da necessidade de alguma enzima ou proteína adicional (GANG et al., 1999). As extensinas, glicoproteínas ricas em hidróxiprolina, são consideradas como sendo componentes estruturais importantes das paredes primárias das células de plantas dicotiledôneas (MC NEIL et al., 1984). Os precursores das extensinas são secretados na parede e ficam ligados covalentemente uns aos

outros por uma reação de peroxidase catalisada para formar uma matriz rígida e inextensível (WYCOFF et al., 1995).

Entre uma variedade de processos, as peroxidases estão envolvidas na biossíntese da lignina (OLSON & VARNER, 1993).

A nova perspectiva sobre o controle do acoplamento de monolignóis foi obtida com a descoberta de proteínas dirigentes (GANG et al., 1999). Atualmente, as proteínas dirigentes e seus homólogos têm sido relatados somente em plantas vasculares (DAVIN & LEWIS, 2000).

## **2.4 Ligações no processo da lignificação**

Durante a deposição das camadas da parede celular, são formadas ligações químicas entre a lignina e a hemicelulose (SUN et al., 2000). Os acoplamentos mais comuns formados durante a polimerização da lignina são ligações éter  $\beta$ -O-4 (WERSHAW, 2004); no entanto, outros acoplamentos como  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -5 e 5-5 foram apontados como presentes na lignina (SAAKE et al., 1996).

Segundo conclusões de MICIC et al. (2002), a lignina é altamente flexível devido às ligações éster, permitindo a esta macromolécula assumir diferentes conformações resultando possivelmente em severas alterações reversíveis em tamanho e volume molecular. O polímero é constituído por ligações cruzadas, com, pelo menos 11 tipos diferentes de ligações formadas entre unidades de monolignóis (SAAKE et al., 1996).



### 3.1 Experimento para formação de DHPs utilizando como substrato (colchão) os filtrados com produtos extracelulares liberados pelas células

Foi realizado experimento para a possível síntese de DHPs em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) filtrado, obtido a partir da cultura de células em suspensão de *Eucalyptus grandis*. Devido ao indicativo de existência de fenóis no meio nutritivo, confirmado pelo teste de Wiesner (item 3.5, Cap. II) foi realizado experimento para cada filtrado pelo método do gotejamento com os tratamentos da Tabela 3.

Após 30 dias do cultivo das células em suspensão, nos tratamentos descritos anteriormente na Tabela 3 (Cap. II), o meio de cultura líquido presente em cada Erlenmeyer foi filtrado em membranas de Millipore (0,22  $\mu\text{M}$ ) gerando um filtrado (125 mL). A partir de cada tratamento, as células ficaram retidas na membrana, às quais também foram analisadas por ultravioleta no Capítulo II.

O filtrado de cada tratamento foi usado como substrato (colchão) para a possível formação de DHPs.

Em cada experimento de síntese, foi dosado e gotejado peroxidase, peróxido de hidrogênio, para síntese de DHPs por polimerização contínua em colchão dos filtrados de cada tratamento.

As reações foram realizadas em sala com temperatura controlada a 25°C, e pH 5,8. O experimento foi realizado da seguinte forma:

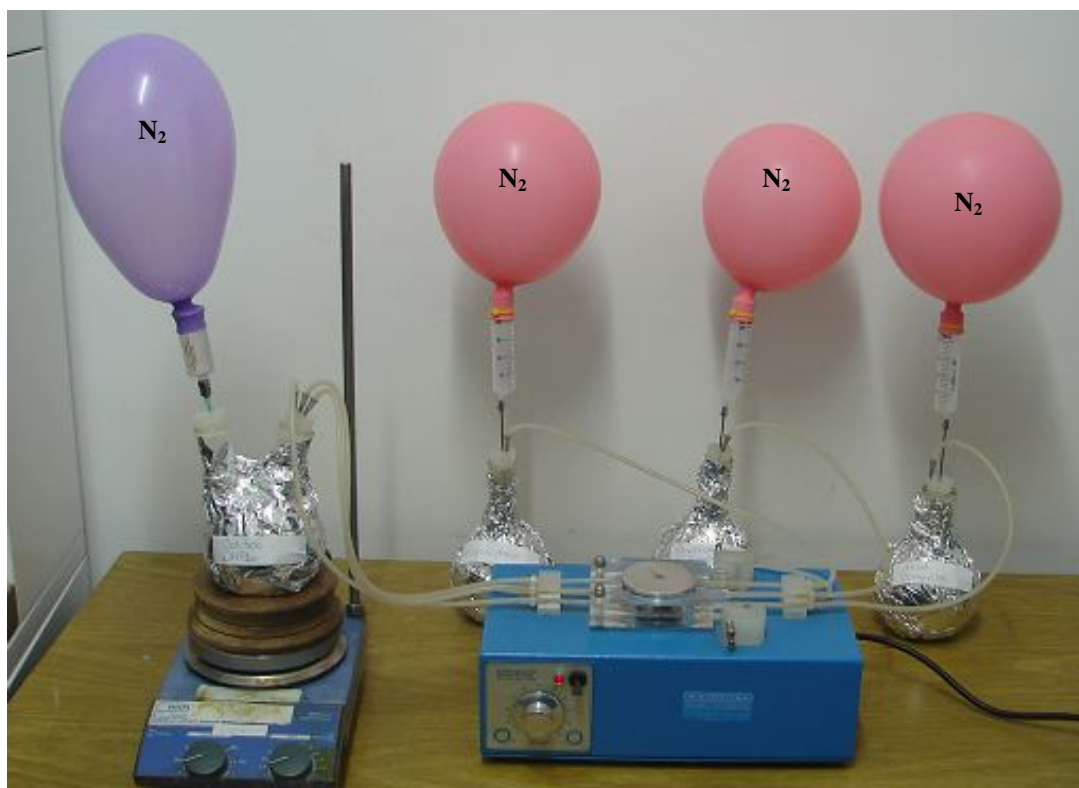
1° - Preparo de 112 mL/tratamento de meio MS básico líquido sem KI, sem agar e sem sacarose, sendo que 24 ml foram utilizados para solubilizar 2,4 mg de peroxidase e 88 mL foram utilizados para adicionar 76  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio;

2° - Para cada solução acima descrita foi utilizado balão de 250 mL revestido com papel alumínio para minimizar a interferência da luz e adicionado  $\text{N}_2$  (Figura 20);

3° - Em um balão de 500 mL de duas entradas revestido com papel alumínio foi colocado o filtrado (125 mL) em ambiente com  $\text{N}_2$  sobre uma placa agitadora que manteve o substrato (colchão) em constante agitação, onde, por uma entrada recebeu um balão contendo  $\text{N}_2$  e por outra, através de gotejamento controlado por uma bomba peristáltica foi adicionado, as soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (76  $\mu\text{L}/88\text{mL}$ ), peroxidase (2,4mg/24mL), e combinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com peroxidase nas respectivas concentrações mencionadas (Tabela 7);

4° - Após 48 horas, o substrato (balão de 500 mL) foi centrifugado à 23000 rpm por 15 minutos a 4 °C e os precipitados foram lavados uma vez com água destilada e bideionizada, secos em temperatura ambiente e acetiladas e

5° - Os produtos (precipitados) foram analisados por IV e RMN H e RMN  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 20.** Montagem experimental para produção de DHP em meio MS fresco e filtrado do cultivo de células.

**Tabela 7.** Tratamentos para formação de produtos nos filtrados dos meios de cultura MS líquido nos quais foram cultivadas células em suspensão de *E. grandis*.

Tratamentos	Substrato (125 mL)	Substâncias para formar o polímero		
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /MS	Peroxidase/MS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Peroxidase/MS
DEG1h	Filtrado	76 µL/88mL		
DEG1p	Filtrado		2,4mg/24mL	
DEG1hp	Filtrado			76 µL/88mL+2,4mg/24mL
DEG2h	Filtrado	76 µL/88mL		
DEG2p	Filtrado		2,4mg/24mL	
DEG2hp	Filtrado			76 µL/88mL+2,4mg/24mL
DEG3h	Filtrado	76 µL/88mL		
DEG3p	Filtrado		2,4mg/24mL	
DEG3hp	Filtrado			76 µL/88mL+2,4mg/24mL
DEG4h	Filtrado	76 µL/88mL		
DEG4p	Filtrado		2,4mg/24mL	
DEG4hp	Filtrado			76 µL/88mL+2,4mg/24mL

**Nota:** DEG1 (sacarose); DEG2 (2,4-D + cinetina); DEG3 (ácido *p*-cumárico); DEG4 (controle)

### 3.2 Experimento para formação de DHPs em meio de cultura MS

O meio MS foi utilizado como substrato (colchão) para a formação da polimerização desidrogenativa (DHP), isto é, o meio líquido que recebeu as três soluções (álcool coniferílico ou sinapílico, peroxidase e o peróxido de hidrogênio) simultaneamente por gotejamento, foi usado também para o preparo das soluções de álcool (coniferílico ou sinapílico), da peroxidase e do peróxido de hidrogênio.

A partir da preparação das soluções, foi montado o experimento com seus tratamentos.

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

1° - Preparo de 413 mL/tratamento de meio MS básico líquido sem KI, sem agar e sem sacarose, sendo, que 24 ml foi utilizado para solubilizar 2,4 mg de peroxidase e 88 mL foram utilizados adicionar 76 µL de peróxido de hidrogênio;

2° - Para cada solução acima descrita 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;

3° - Em um balão de 500 mL de duas entradas revestido com papel alumínio foi colocado o meio MS fresco e sem o cultivo de células (125 mL) com gás nitrogênio adicionado como descrito acima em uma placa agitadora que manteve o substrato (colchão) em constante agitação, onde, por uma entrada recebeu um balão de encher contendo gás nitrogênio e por outra, por gotejamento, realizado por uma bomba peristáltica dosadora, foram adicionadas as soluções de peroxidase, peróxido de hidrogênio álcool coniferílico ou álcool sinapílico (Tabelas 8 e 9);

4° - 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 acetiladas e

5° - Os precipitados foram analisados por RMN H e RMN <sup>13</sup>C.

Para a formação dos tratamentos dos DHPs de álcool coniferílico, foi utilizado o meio MS (Tab. 8).

**Tabela 8.** Tratamentos utilizados para a formação dos DHPs de álcool coniferílico realizados em meio MS.

Tratamentos	Substrato (125 mL MS)	Substâncias para formar o polímero		
		H <sub>2</sub> O 2 (µL)	Peroxidase (mg)	Álcool coniferílico (mg)
DHP1c	MS + 0,0584 sacarose	76	2,4	50
DHP2c	MS + 10µM2,4-D + 2,5µMCinetina	76	2,4	50
DHP3c	MS + 16,4mg/L ac.p-cumárico	76	2,4	50
DHP4c	MS	76	2,4	50

Para a formação dos tratamentos dos DHPs de álcool sinápico, foi utilizado o meio MS da forma estabelecida (Tabela 9).

**Tabela 9.** Tratamentos utilizados para a formação dos DHPs de álcool sinápico realizados em meio MS.

Tratamentos	Substrato (125 mL MS)	Substâncias para formar o polímero		
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu$ L)	Peroxidase (mg)	Álcool sinápico (mg)
DHP1s	MS+0,0584 sacarose	76	2,4	50
DHP2s	MS+10 $\mu$ M2,4-D+2,5 $\mu$ MCinetina	76	2,4	50
DHP3s	MS+16,4mg/L ac. <i>p</i> -cumárico	76	2,4	50
DHP4s	MS	76	2,4	50

### 3.3 Acetilação

Os produtos das reações foram acetilado dissolvendo-o inicialmente em piridina e em seguida anidrido acético na proporção 1:1 e deixado em agitação intermitente durante 48 horas à temperatura ambiente.

Após 48 horas, os produtos foram recuperados da mistura reacional gotejando varias vezes em éter etílico, centrifugados e lavados. Em seguida, foi seco em dessecador de vidro sob vácuo contendo KOH (ABREU et al., 2006).

### 3.4 Infravermelho dos DHPs filtrados das células

Os materiais resultantes dos DHPs dos filtrados obtidos foram liofilizados por 16 horas para completa desidratação. 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 transformada de Fourier, da marca Perkin-Elmer.

### 3.5 RMN H dos DHPs dos filtrados das células 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 12 horas para completa desidratação e, para determinar estruturalmente os materiais formados dos DHPs (dos filtrados e do meio MS), foi utilizada espectroscopia de RMN H. Das amostras secas, foram pesadas 100 mg de

cada tratamento e dissolvidas em 0,5 mL de clorofórmio deuterado e a solução foi examinada por espectroscopia e os espectros foram registrados em um aparelho Bruker AC200 Advance 400 MHz.

Os sinais dos espectros foram designados por comparação com dados da literatura.

### **3.6 Análise dos deslocamentos químicos para os espectros de RMN H**

Para instrumento de comparação dos resultados dos espectros de RMN H dos DHPs de álcool coniferílico e álcool sinapílico, foram elaboradas tabelas com os deslocamentos químicos para os tratamentos.

### **3.7 RMN <sup>13</sup>C dos DHPs do meio MS**

Os produtos da formação dos DHPs do meio MS obtidos após centrifugação foram liofilizados por 12 horas para completa desidratação. Das amostras secas, foram pesadas 100 mg de cada tratamento e dissolvidas em 0,5 mL de DMSO-d<sub>6</sub> e as soluções foram examinadas por espectroscopia e os espectros foram registrados em um aparelho Bruker AC200 Advance 400 MHz.

### **3.8 Análise dos deslocamentos químicos para os espectros de RMN <sup>13</sup>C**

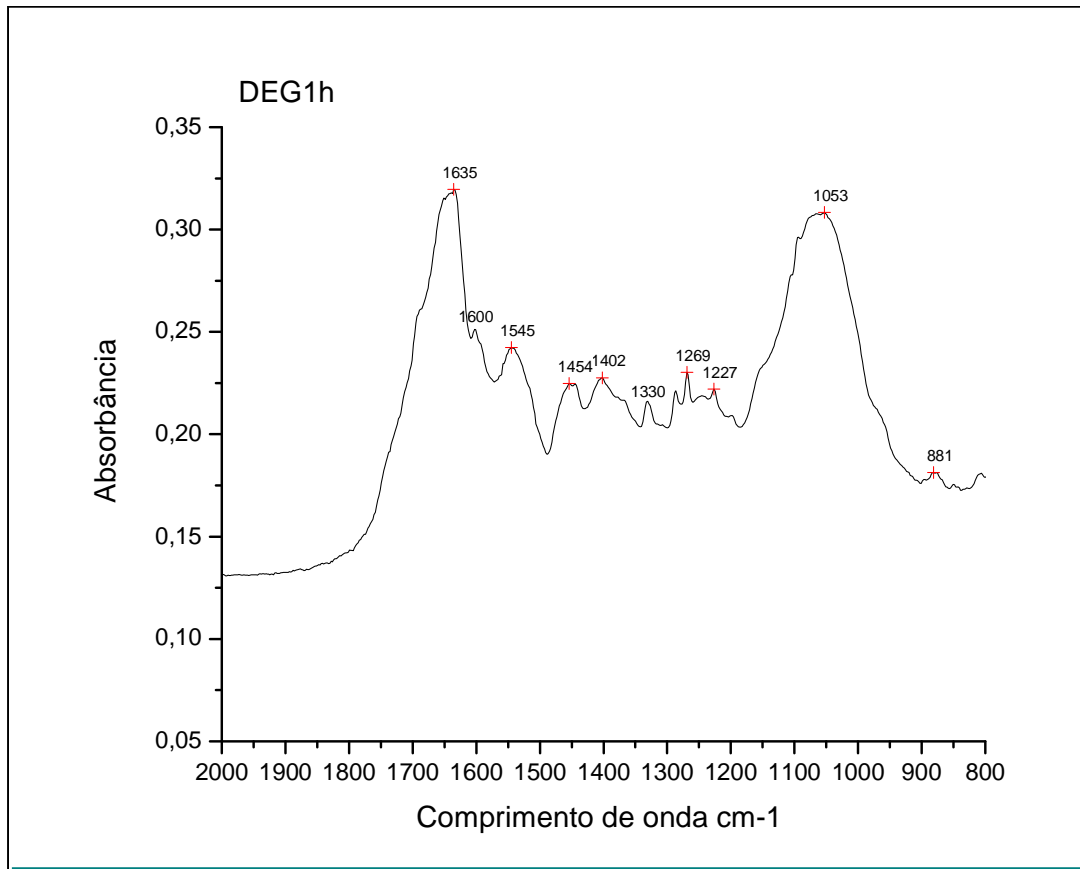
Como instrumento de comparação dos resultados dos espectros de RMN<sup>13</sup>C dos DHPs de álcool coniferílico e álcool sinapílico, foram elaboradas tabelas com os deslocamentos químicos para os tratamentos.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1 Infravermelho (IV) dos produtos formados em meio extracelular com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase.

As amostras utilizadas para análise de espectroscopia no IV foram derivadas dos tratamentos com os filtrados celulares (Tabela 15, Anexo III), isto é, com os meios MS líquidos onde foram cultivadas as células, visando essas células liberarem precursores de lignina para o meio de cultura. Dessa forma, esses possíveis precursores de lignina liberados pelas células, juntamente com os tratamentos propostos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase (Tabelas 8 e 9) pudessem possibilitar a ocorrência polimerização desidrogenativa. Porém, as análises dos espectros de IV da maioria dos produtos formados (Figuras. 35-42 em Anexo IV) revelaram não se tratar de polimerização desidrogenativa. Entretanto, foi possível observar a polimerização de amidas através dos espectros de infravermelho.

Consta, por exemplo, no espectro do tratamento DEG1h (76 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/88 mL de filtrado) um sinal na região 1269 cm<sup>-1</sup>, 1330 cm<sup>-1</sup> e 1600 cm<sup>-1</sup> (Figura 21). DHPs de álcool sinapílico e coniferílico produzem espectros com forte sinal a 1330 cm<sup>-1</sup> em espectros de IV designados para anéis siringílicos e anéis guaiacílicos 5 substituído, respectivamente, mas, DHPs de álcool coniferílico produzem um forte sinal à aproximadamente 1270 cm<sup>-1</sup> (anéis guaiacílicos) (RANOCHA et al., 1999). Dessa forma, não se pode afirmar que houve formação de DHP no tratamento DEG1h, pois o sinal na região de 1500 cm<sup>-1</sup> não está evidente no correspondente espectro. Pode-se constatar, ainda, que o tratamento com sacarose (0,0584 µM) (Tabela 3, Cap. 2) usado como substrato (colchão) não foi um eficiente elicitor de ligninas para o meio extracelular. É possível que este fato não tenha permitido uma quantidade suficiente de ligninas no meio extracelular ou, então, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha de alguma forma modificado ou degradado essas ligninas de forma a não apresentarem em espectro de IV os sinais característicos para substâncias semelhantes à lignina. Porém, não é o que preconiza alguns trabalhos que mostram que o conhecimento sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é fundamental para formação de lignina extracelular; entretanto, pouco se sabe sobre o modo de formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da sua regulação nas paredes das células. Em experimento realizado por NOSE et al. (1995), com culturas de células em suspensão de pinheiro teca (*Pinus taeda* L.) contendo 8% de sacarose, os autores concluíram que as ligninas resultantes (intra e extracelular) foram consequências das atividades da peroxidase dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo, dessa forma, que a disponibilidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exerça um controle sobre a seqüência geral de eventos neste sistema de cultivo.

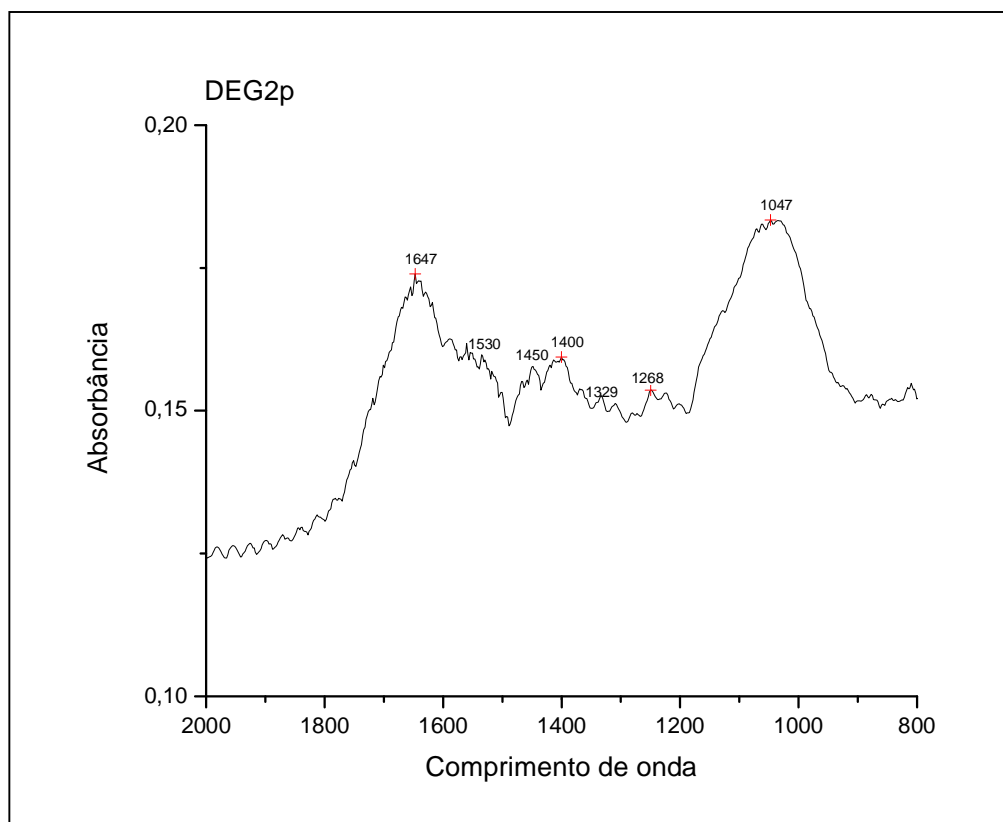


**Figura 21.** Espectro de IV do tratamento DEG1h.

Não foi possível atribuir pelo espectro de IV, como DHP o tratamento DEG2p (2,4 mg/L peroxidase/24 mL MS) devido a ausência do sinal de  $1500\text{ cm}^{-1}$  característico de lignina. Porém, vale ressaltar alguns sinais como os das regiões  $1447\text{ cm}^{-1}$  e  $1530\text{ cm}^{-1}$  (Figura 22). Atividade de oxidase no xilema em desenvolvimento de ramos (máximo de 5 cm de diâmetro) de abeto vermelho [*Picea sitchensis*] (Bong) Carr. foi expressa em sincronia com deposição de lignina (RICHARDSON et al., 1997). Quando incubaram alíquotas de isoformas de oxidase ácida por 48 h com álcool coníferílico, foi formado um precipitado branco. O espectro de IV do produto de oxidação de álcool coníferílico conteve muitos sinais que podem ser designados para estruturas características de polimerização desidrogenativa feita de álcool coníferílico, como, 1512, 1326, 1267, 1214, 1137, 1087 e  $1029\text{ cm}^{-1}$  ombros pronunciados a 1595, 1530, 1490, 1425 e  $1375\text{ cm}^{-1}$  (FAIX, 1991).

Em cultura de células em suspensão as peroxidases atuam como oxidoredutases, catalisando a oxidação de um diverso grupo de substâncias orgânicas que usam o peróxido de hidrogênio como receptor final de elétrons (DAWSON, 1988). As peroxidases têm sido isoladas e purificadas a partir de vários organismos, inclusive bactérias, fungos e plantas superiores (ARNALDOS et al., 2002). As peroxidases de plantas possuem múltiplas formas

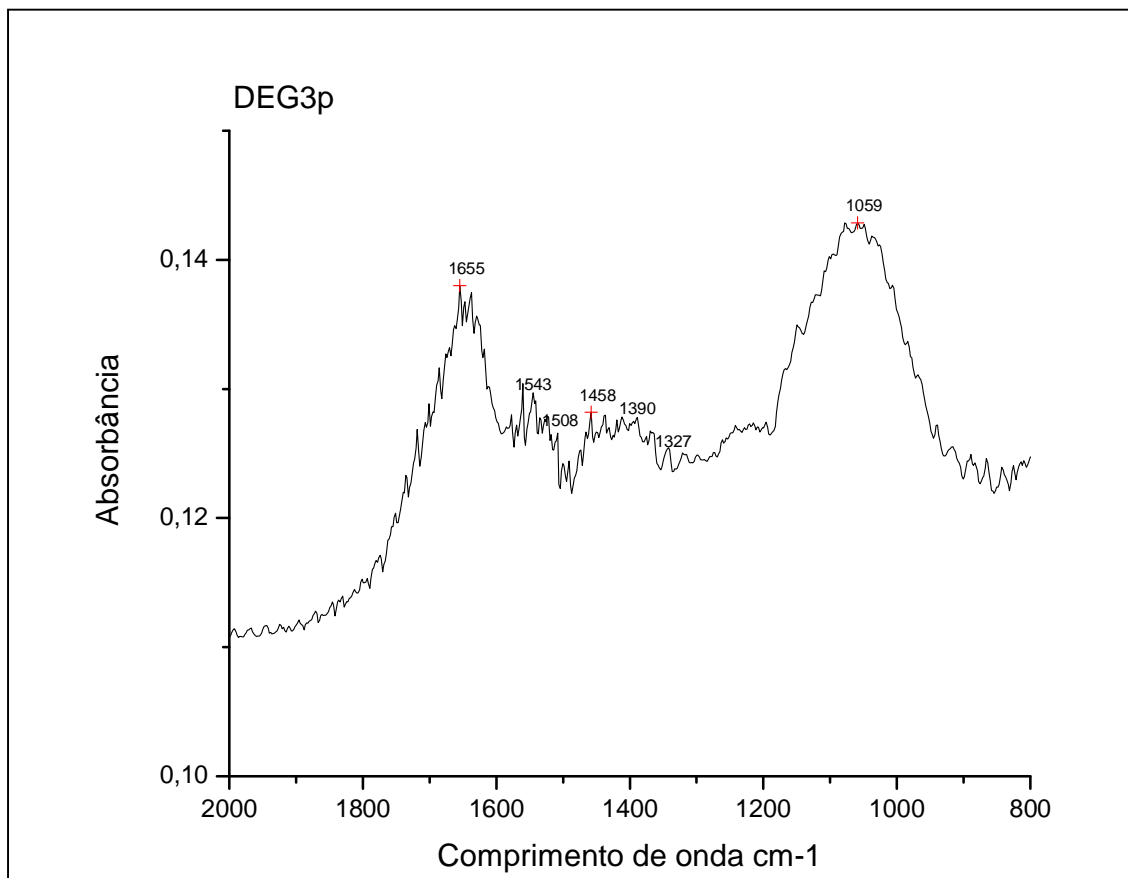
moleculares que variam em composição de acordo com a espécie, o tecido, a fase de crescimento e a aplicação exógena de substâncias de crescimento (SHANNON, 1968).



**Figura 22.** Espectro de IV do tratamento DEG2p.

O espectro do tratamento DEG3p (2,4 mg/L peroxidase/24mL MS) apresentou sinal não muito claro na região de  $1508\text{ cm}^{-1}$  podendo se tratar de ruído (Figura 23). Em cultura de tecidos de plantas, a iniciação da organização celular está associada com as variações das atividades de várias enzimas e dos níveis de metabólitos celulares (SWARNKA & TYAGI, 1997). Em cultura de lupino (*Lupinus polyphyllus*) a peroxidase apresentou a maior atividade enzimática (WINK, 1994). O envolvimento de peroxidase em uma variedade de processos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (THORPE, 1980). Uma vez que as peroxidases desempenham um significativo papel na regulação de crescimento e diferenciação celular (GALSTON & DALBERG, 1954; LAGRIMINI & ROTHSTEIN, 1987).

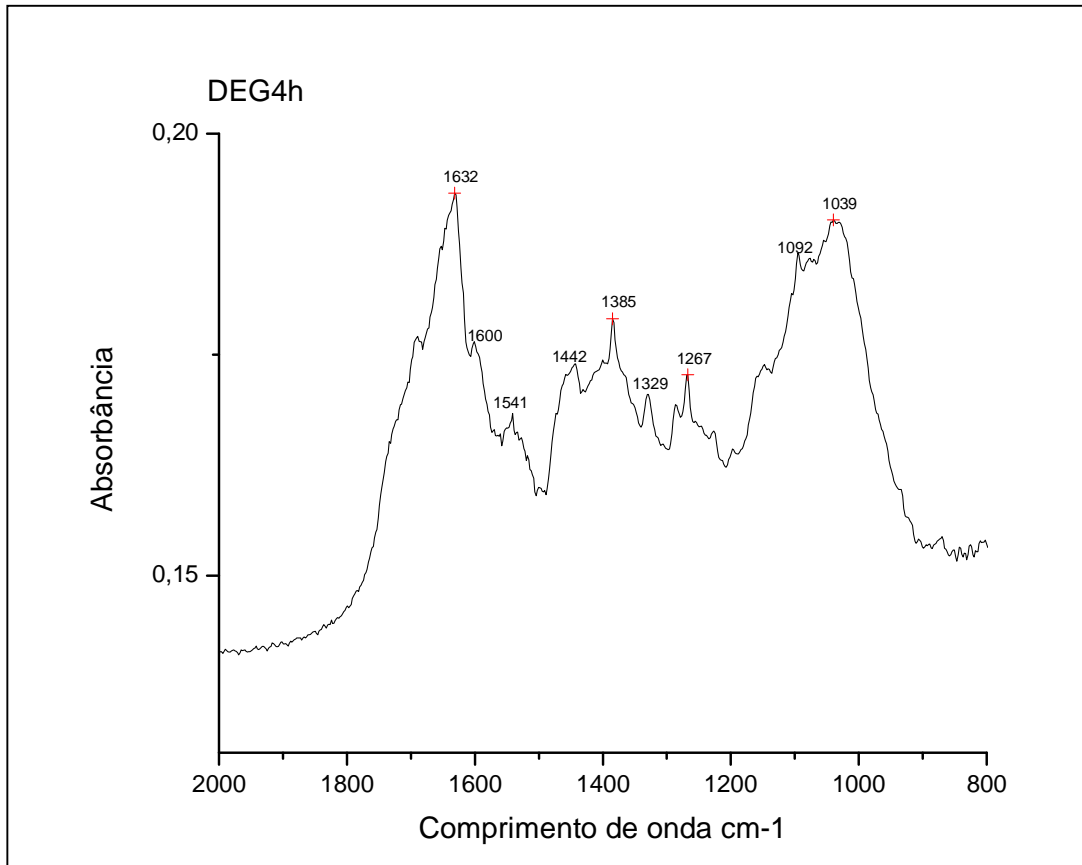




**Figura 23.** Espectro de IV do tratamento DEG3p.

O espectro do tratamento DEG4h (76  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /88mL) marcou sinal nas regiões de  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1267\text{ cm}^{-1}$  e  $1329\text{ cm}^{-1}$  (Figura 24). Semelhante ao que ocorreu com o tratamento DEG1h (Figura 21). Da mesma forma, também não podemos afirmar que o tratamento DEG4h apresentou espectro de IV característico de um DHP. No entanto, para a formação da lignina extracelular, a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi extremamente importante, confirmando ser um passo regulatório na lignificação (NOSE et al., 1995). Observações histoquímicas efetuadas em zínia (*Zinnia elegans* Jacq.), sugeriram uma importante correlação temporal e espacial entre de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a lignificação (OLSON & VARNER, 1993).

GABALDÓN et al. (2006) estudando a catalisação por peroxidases na cultura de células em suspensão de zínia (*Zinnia elegans* Jacq.) verificaram que a lignificação da parede celular era controlada pela taxa de fornecimento de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e as análises quantitativas revelaram que o padrão de lignificação dessas células era similar àquela ocorrida em hipocótilos, isto é, compostas de unidades G/S em uma proporção 42/58 respectivamente (RÓS BARCELÓ et al., 2004).



**Figura 24.** Espectro de IV do tratamento EG4h.

#### 4.2 RMN H dos produtos formados em meio extracelular com os filtrados das células após adição de $H_2O_2$ , peroxidase e $H_2O_2$ + peroxidase

Foram realizadas com as amostras dos produtos extracelulares, resultantes dos tratamentos feitos com filtrados do material liberado pelas células (tratados com  $H_2O_2$  e peroxidase isolados e combinados) (Tabela 9), a RMN H. Como descrito recentemente, três processos bioquímicos têm sido propostos para a síntese de lignina, que envolvem qualquer um dos três, peroxidase(s) dependente de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SIEGEL, 1953), lacase(s) requerendo oxigênio ( $O_2$ ) (FREUDENBERG, 1952), ou uma combinação de ambos (STERJIADES et al., 1993).

Através de análise dos espectros (Figuras 51-62 em Anexo VII), foi possível verificar a ausência de sinais característicos de formação de DHPs. Alguns sinais típicos de lignina podem ter sido suprimidos em decorrência da baixíssima concentração de material fenólico da mistura analisada, apesar de a RMN H não ter apresentado claramente, sinais característicos de DHP.

### 4.3 RMN H dos DHPs do meio MS

#### 4.3.1 DHPs de álcool coniferílico realizados em meio MS

##### 4.3.1.1 DHP1c

O tratamento DHP1c (MS + 0,0584  $\mu$ M de sacarose) (Tabela 8) do álcool coniferílico não formou DHP (Figura 25). O resultado do tratamento fica claro quando comparado com o espectro do controle (DHP4c) que formou DHP em meio MS (Figura 28). O tratamento DHP1c não apresentou vários sinais característicos da formação de uma polimerização desidrogenativa, como, por exemplo, sinal na região de prótons aromáticos (no controle ficou claro com o sinal 6,91 ppm). Pode ter ocorrido no decorrer do processo uma despolimerização, devido, talvez, a algum solvente orgânico no meio. O álcool coniferílico é um importante precursor para a síntese de lignina na planta. O álcool coniferílico, com ou sem os álcoois *p*-cumarílico e sinapílico, é o monolignol mais abundante e frequentemente secretado nas paredes celulares no começo da lignificação (INGOLD et al., 1990). Dessa forma, pode ter ocorrido com o tratamento DHP1c, devido à presença de sacarose, outras interações que impediram a formação de DHP. Já na indução de lignina na parede celular, o mesmo tratamento com sacarose apresentou a maior concentração de lignina. Espectro de DHP de isoconiferina (álcool coniferílico  $\gamma$ -O- $\beta$ -D-glicosídeo) catalisada por peroxidase confirmou que esta DHP reteve porções de D-glicose do álcool coniferílico  $\gamma$ -O- $\beta$ -D-glicosídeo; o que dificultou as análises de distribuição de ligações da lignina (TOBIMATSU et al., 2006). Os autores perceberam que os fortes sinais de açúcar sobrepõem com os sinais para estruturas da cadeia lateral em ambos os espectros de RMN H e RMN<sup>13</sup>C.

##### 4.3.1.2 DHP2c

O tratamento DHP2c formou em meio MS a polimerização desidrogenativa (Figura 26). Neste tratamento, a intensidade do sinal atribuído aos grupos metoxílicos e prótons aromáticos, 3,86 e 6,92 respectivamente, são maiores que os mesmos sinais no controle (DHP4c). Porém, essa intensidade aumentou muito mais quando o tratamento DHP2c foi comparado ao tratamento DHP3c com ácido *p*-cumárico.

A combinação de 2,4-D e cinetina (Tabela 8) usada neste tratamento foi a mesma utilizada para indução de lignina na parede celular e extracelular (Cap. II); porém, nestes casos a auxina e citocinina obtiveram as menores concentrações de compostos ligninas.

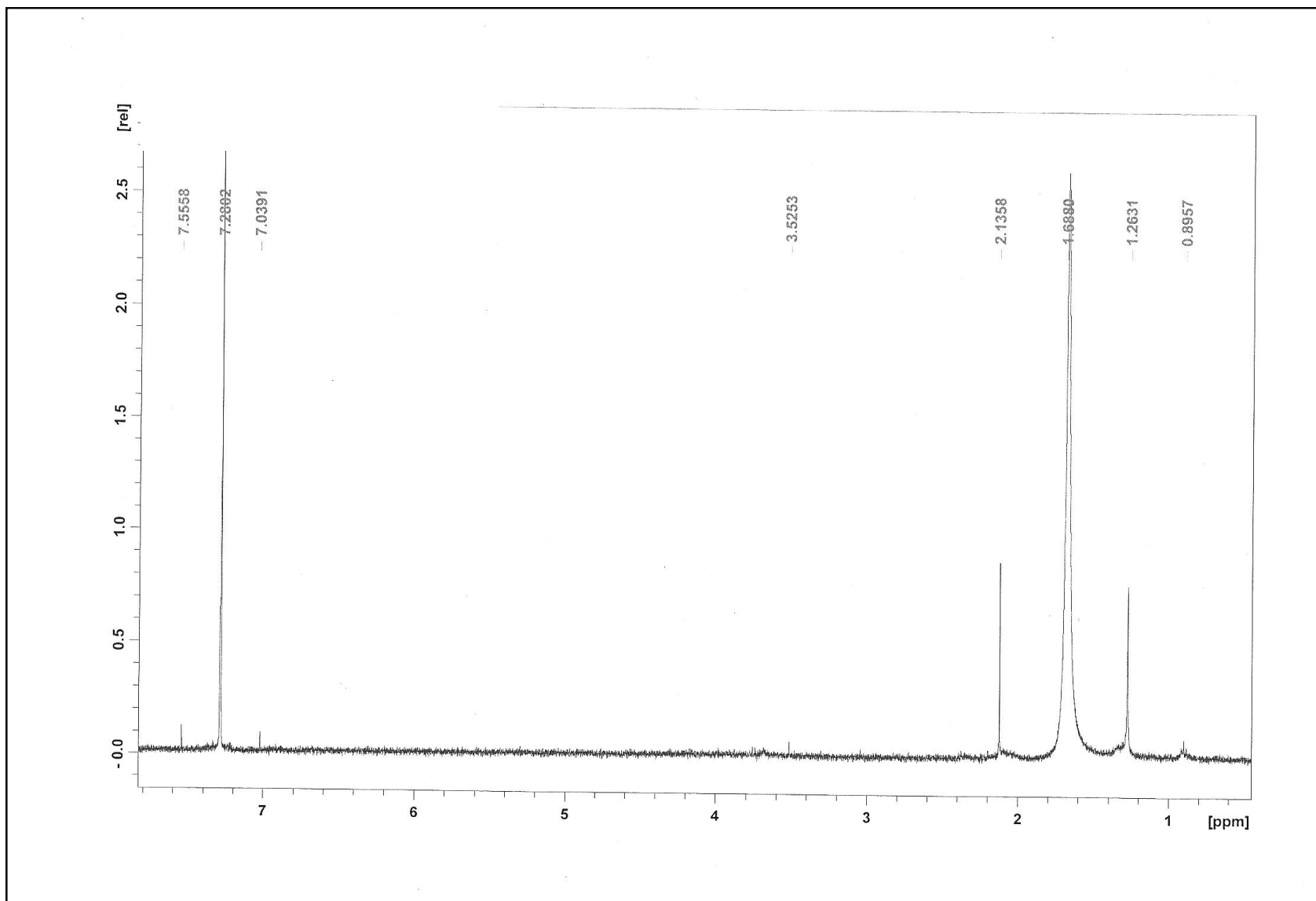
O tratamento DHP2c apresentou também maior intensidade na região de 4,71 ppm que caracteriza hidrogênio em posição  $\beta$  de estruturas  $\beta$ -O-4. A polimerização da lignina ocorreu mais rapidamente e de forma extensiva quando a glicose oxidase e a  $\beta$ -glicosidase foram adicionadas, mas, o teor das subestruturas  $\beta$ -O-4 foi inferior à DHP formada sem adição dessas enzimas (HAFRÉN et al., 2002). Isso indica que o ambiente, em que ocorre a polimerização de monolignóis, determina a estrutura resultante de DHP. O sinal na região 6,14 ppm que está evidente neste tratamento, e caracterizou as estruturas  $\beta$ -O-4 e  $\beta$ -1 (Tabela 6) não ocorreu, pelo menos com clareza no espectro do controle (DHP4c).

#### **4.3.1.3 DHP3c**

O espectro do tratamento DHP3c apresentou a formação de DHP (Figura 27), porém a intensidade dos sinais característicos para grupos metoxílicos e grupos aromáticos foram os menores neste tratamento em relação ao controle (DHP4c) e o tratamento DHP3c.

#### **4.3.1.4 DHP4c**

O controle (tratamento DHP4c) também formou DHP em meio MS (Figura 28). A intensidade dos sinais dos grupos metoxílicos e prótons aromáticos foram maiores que no tratamento DHP3c e menor que no tratamento DHP2c. No entanto, o sinal característico de estruturas  $\beta$ -O-4 e  $\beta$ -1 não foram marcadas no controle (Tabela 6), que são características do sinal 6,06-6,14 ppm.



**Figura 25.** Espectro da RMN H da DHP1c

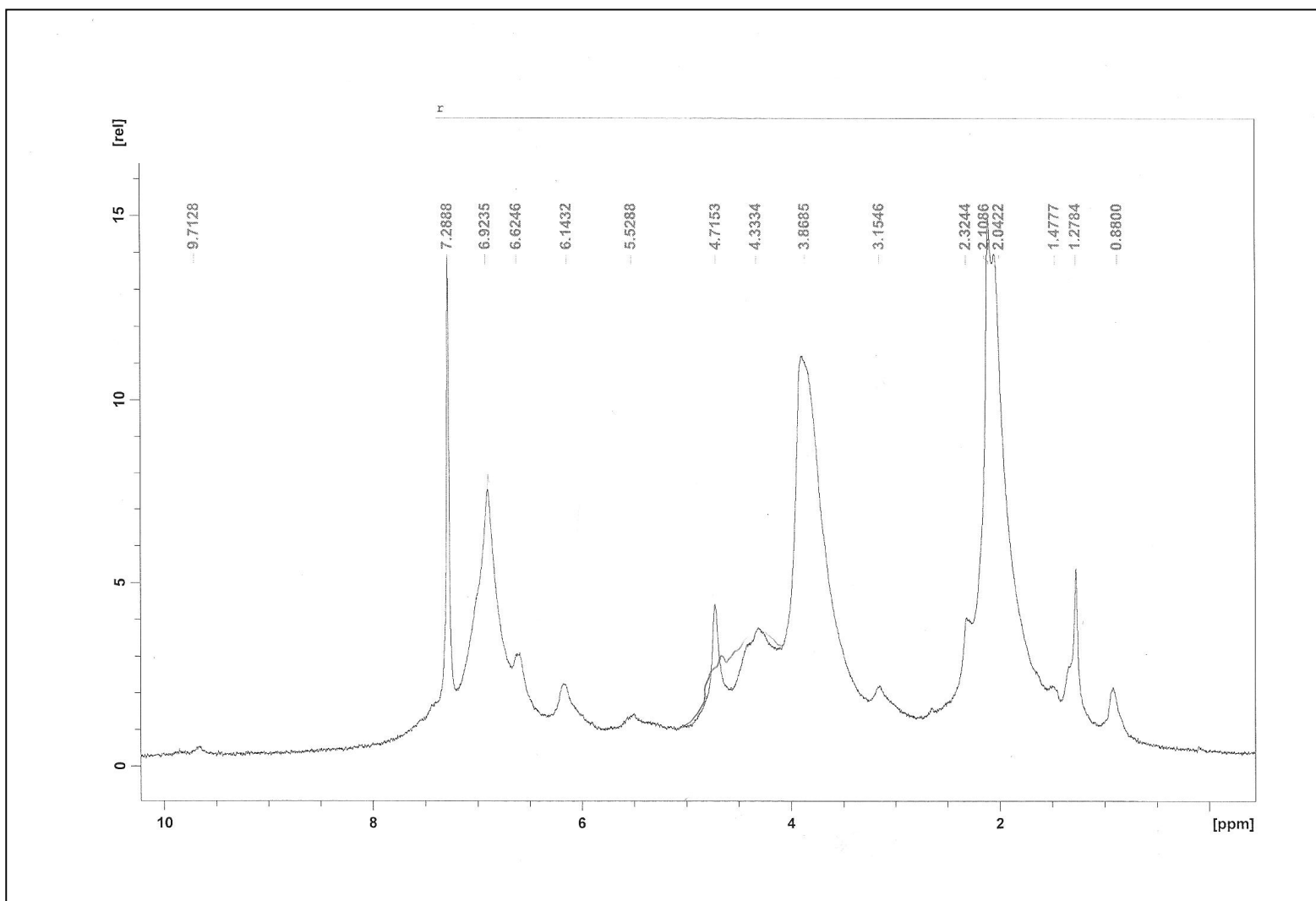
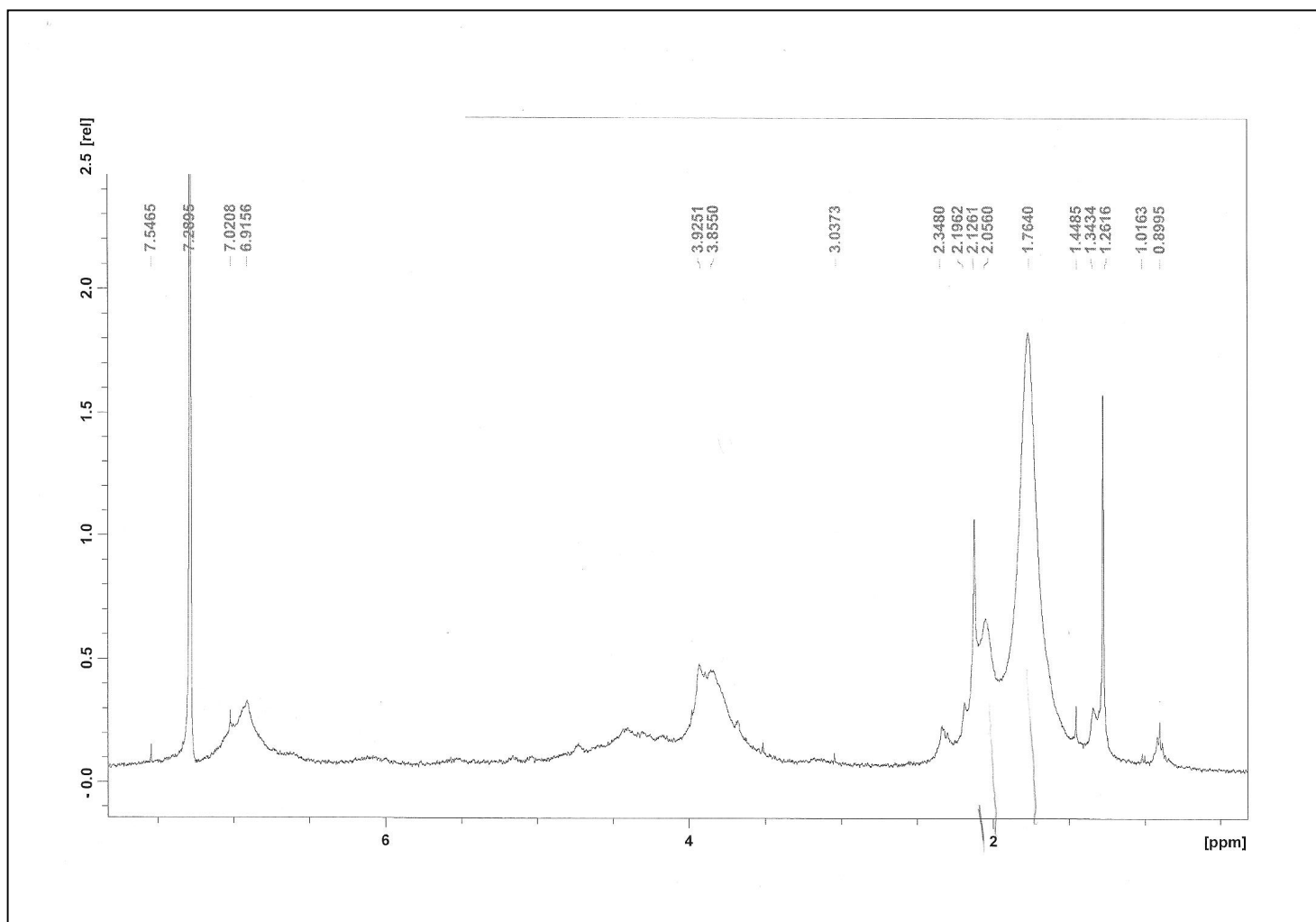
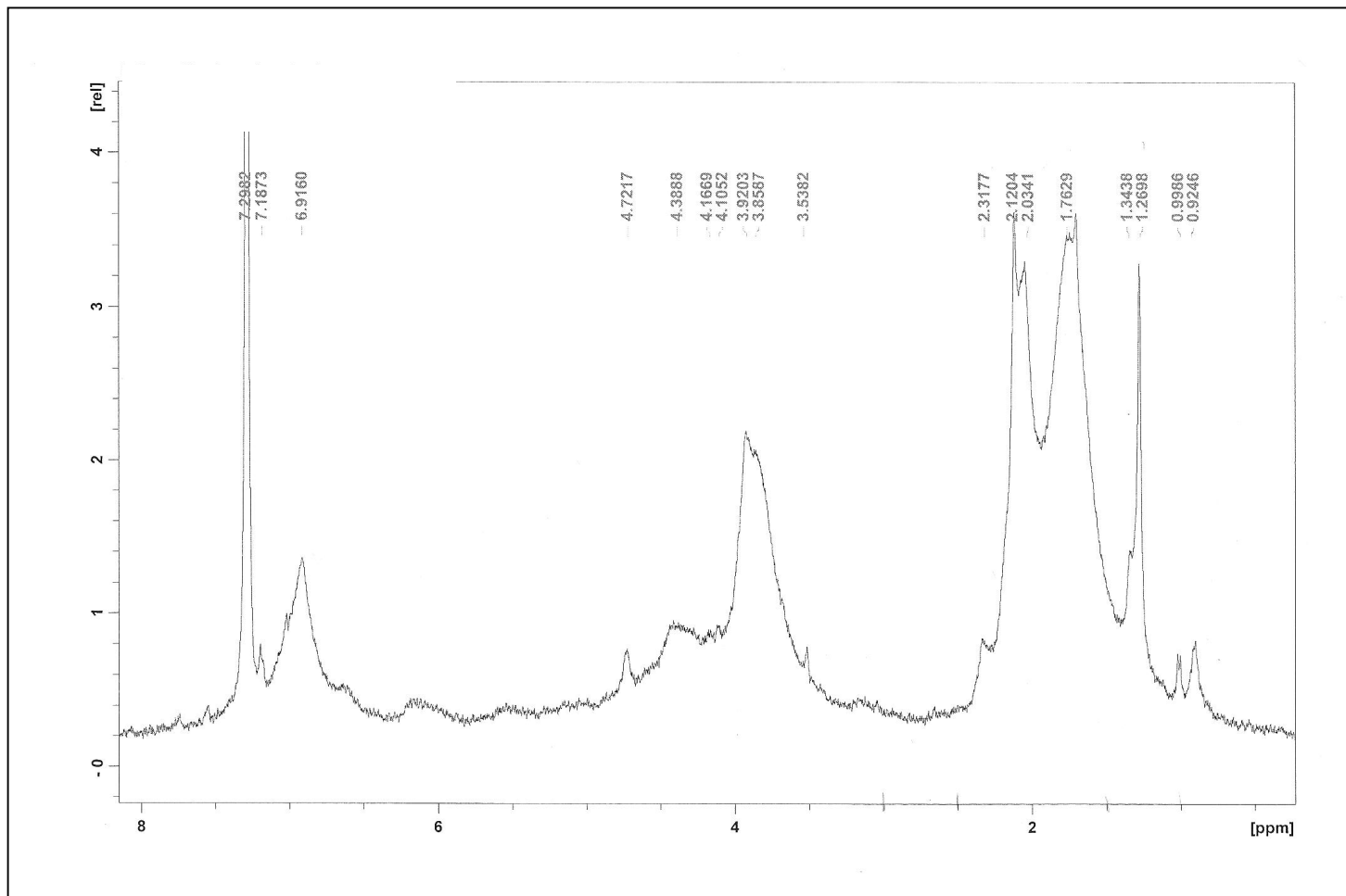


Figura 26. Espectro da RMN H da DHP2c



**Figura 27.** Espectro da RMN H da DHP3c

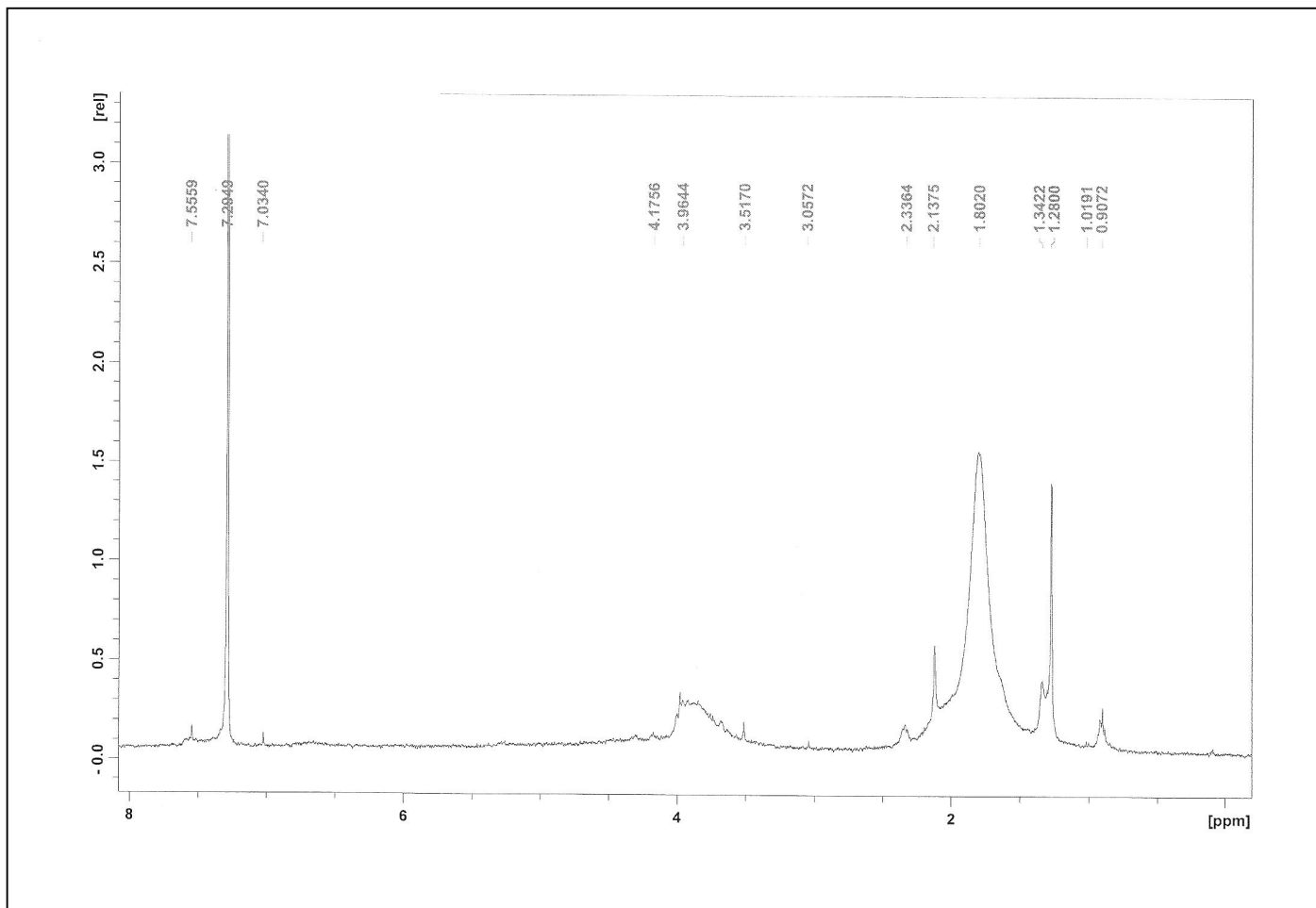


**Figura 28.** Espectro da RMN H da DHP4c



### 4.3.2 DHPs de álcool sinápico realizados em meio MS

Os tratamentos realizados para a formação de DHP do álcool sinápico tiveram como suplemento ao meio MS: a sacarose; uma combinação de 2,4-D com cinetina; o ácido *p*-cumárico e o meio MS sem suplemento. Porém, o único tratamento que formou DHP foi o tratamento DHP2s (Figura 29). O espectro de RMN H apresentou para este tratamento sinais nas regiões características de polimerização desidrogenativa como 3,96 ppm e 6,92 ppm que designam, respectivamente, para hidrogênios metoxílicos e hidrogênios aromáticos. O mesmo não ocorreu com os outros tratamentos que não apresentaram sinal na região dos aromáticos (Figuras. 43-45 em Anexo V).



**Figura 29.** Espectro da RMN H da DHP2s

#### 4.4 RMN <sup>13</sup>C DHPs do meio MS

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C para os DHPs de álcool coniferílico e álcool sinapílico confirmaram os resultados obtidos com os espectros de RMN H (Tabela 10).

##### 4.4.1 DHPs de álcool coniferílico realizados em meio MS

###### 4.4.1.1 DHP1c

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C desacoplados permitiram entre alguns experimentos de sucesso atribuir alguns sinais importantes que evidenciaram a formação de DHPs. Entretanto, o espectro de RMN <sup>13</sup>C confirmou o resultado da RMN H para tratamento DHP1c (MS + 0,0584 μM de sacarose) do álcool coniferílico que não formou DHP (Figura 25).

###### 4.4.1.2 DHP2c

O espectro de RMN <sup>13</sup>C para o tratamento DHP2c (Figura 30) apresentou sinais para algumas designações como: C1 de β-O-4 (134,26 ppm); C α em β-5 (88,21 ppm); C γ de álcool coniferílico acetilado em γ (65,17 ppm); metoxila aromática em G e em S (55,90); grupo CH<sub>3</sub> de grupos acetílicos (20,75); entre outros que caracterizam a formação de DHP. KISHIMOTO et al. (2006) realizaram experimento com a síntese de polímero de lignina artificial contendo somente subestruturas β-O-4 para investigar suas características poliméricas e resultou em um grau de polimerização comparável à lignina artificial sintetizada enzimaticamente de álcoois *p*-hidroxicinâmicos (DHP) e algumas ligninas isoladas.

###### 4.4.1.3 DHP3c

Através do espectro de RMN <sup>13</sup>C o tratamento DHP3c (Figura 31) formou DHP em meio MS suplementado com ácido *p*-cumárico e assim como o tratamento DHP2c, apresentou o sinal na região da estrutura C1 de β-O-4, C α em β-5, C γ de álcool coniferílico acetilado em γ, metoxila aromática em G e em S e grupo CH<sub>3</sub> de grupos acetílicos entre outros. PARKÅS et al. (2001) utilizaram DHP-parede celular com adição de glicose-oxidase e β-glicosidase, obtendo 36% de subestruturas derivadas β-O-4, 42% de β-β, β-5 e β-1 combinadas e 22% de álcool coniferílico/coniferaldeído e grupos.

###### 4.4.1.4 DHP4c

O controle (DHP4c) (Figura 32) trata-se, também de um DHP, pois, apresentou, no espectro de RMN <sup>13</sup>C os sinais característicos como nos tratamentos que formaram DHP. Segundo HAFRÈN et al. (2002) o aumento no teor de β-O-4 pode ser em parte devido à extração de monolignóis não polimerizados e de DHP de peso molecular inferior, já que

ocorreu redução do teor de lignol após extrações com acetona/água. Porém, o fato de que ligações entre ligninas e polissacarídeos ocorrem principalmente nas subestruturas da posição  $\alpha$  da  $\beta$ -O-4 (XIE et al., 2000) pode produzir ligninas com uma alta quantidade de subestruturas  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -1, não ligadas a polissacarídeos, mas solúveis em acetona.

**Tabela 10.** Atribuições dos sinais dos espectros de RMN <sup>13</sup>C dos DHPs do álcool coniferílico.

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

**Nota:** e-eterificado, ne não eterificado

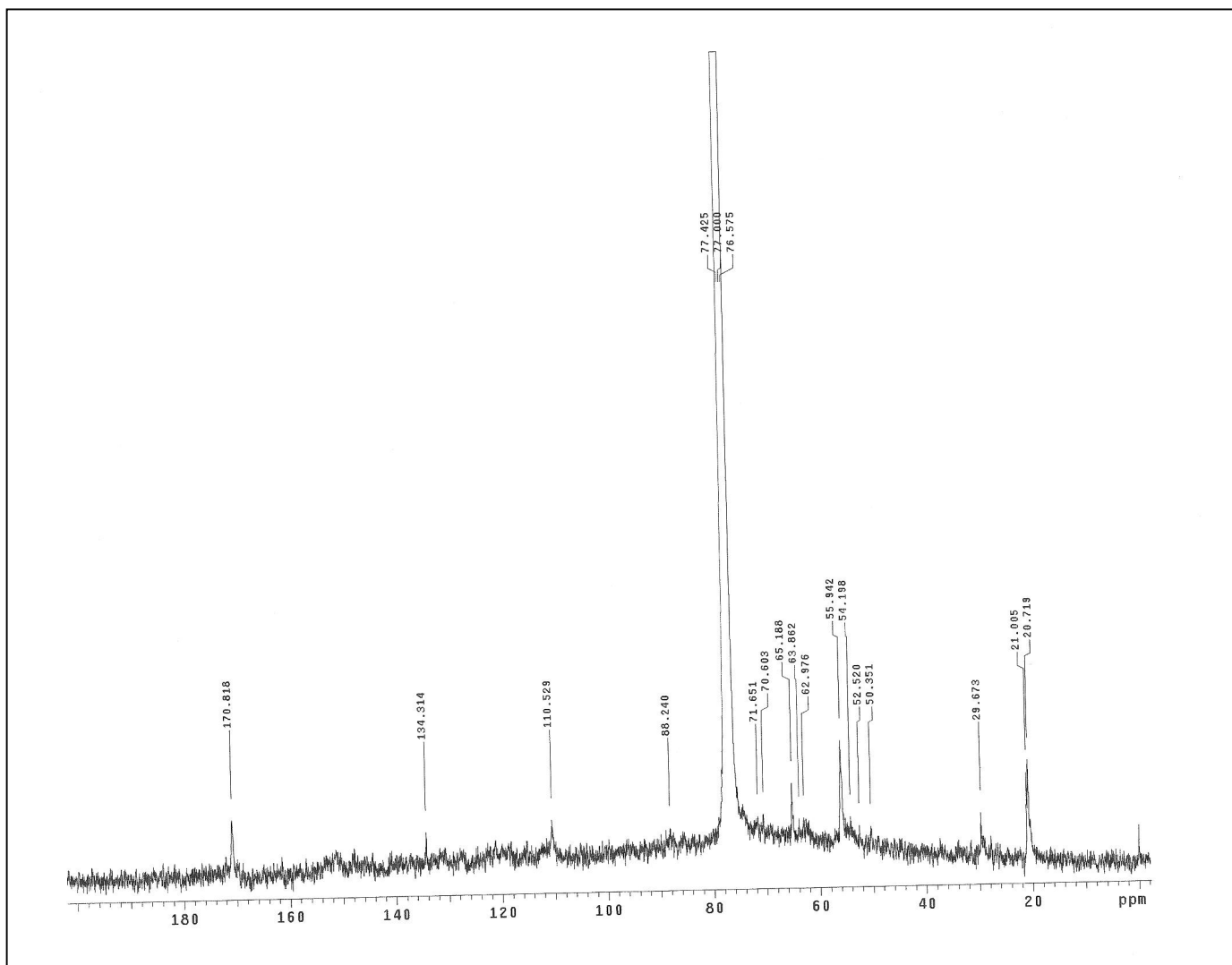


Figura 30. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  da DHP2c

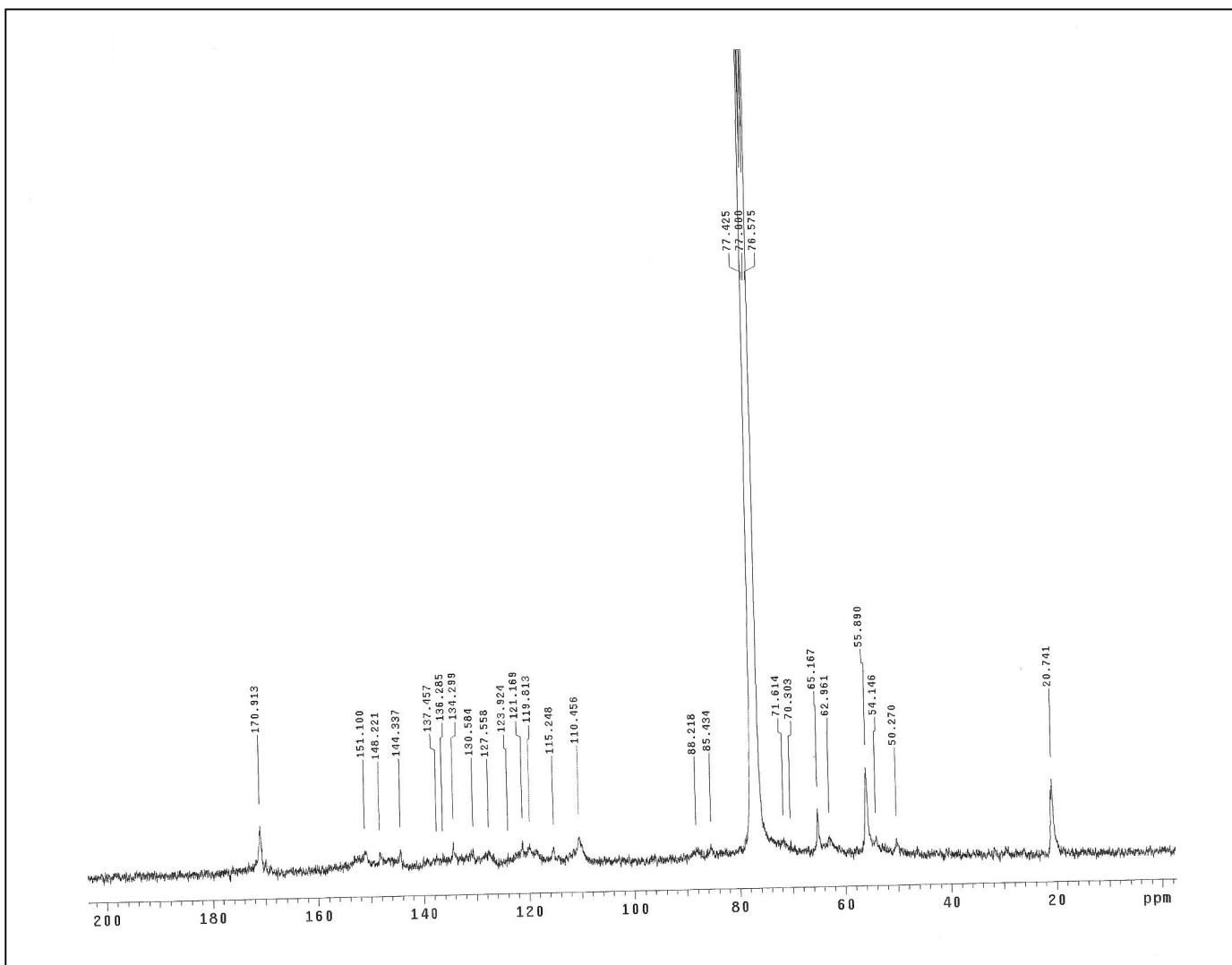


Figura 31. Espectro da RMN <sup>13</sup>C da DHP3c

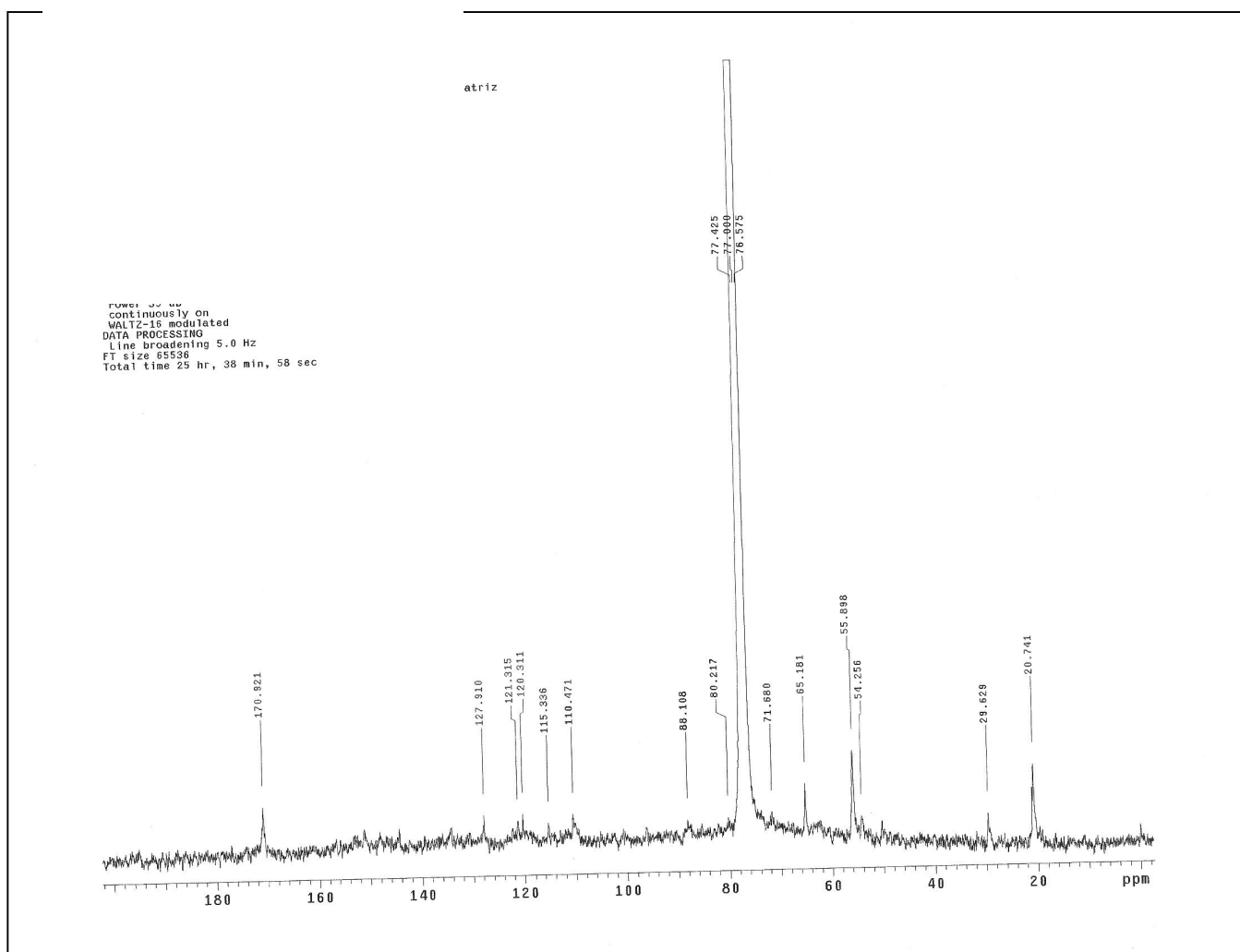


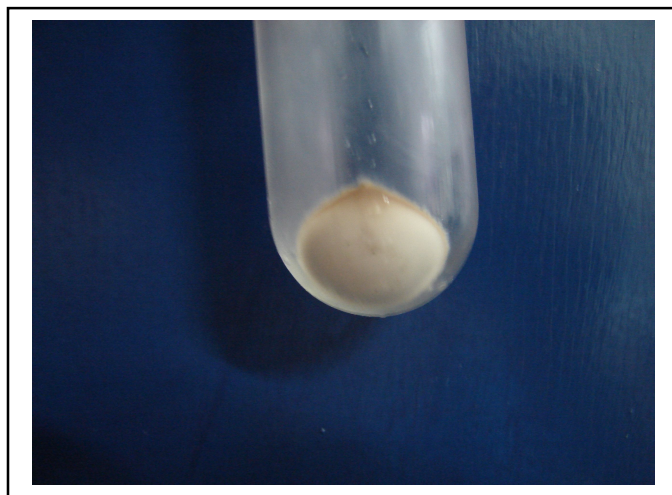
Figura 32. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  da DHP4c



## 4.5 DHPs de álcool sinapílico realizados em meio MS

### 4.5.1 DHP2s

Dos tratamentos DHP1s, DHP2s, DHP3s e DHP4s (Tabela 9) do álcool sinapílico, o único que formou DHP foi o tratamento DHP2s (Figuras 33 e 34), corroborando com o resultado do espectro de RMN H. Os espectros que não apresentaram sinais característicos de DHP estão representados nas Figuras 43-45 (Anexo V). O espectro de RMN<sup>13</sup>C apresentou os sinais característicos para a formação de DHP que foram descritos nos outros tratamentos além de outros (Tabela 10). Já foi relatada em a dificuldade de se trabalhar com álcool sinapílico (HIGUCHI 1997).



**Figura 33.** DHP2s centrifugada e lavada, obtida a partir de álcool sinapílico.

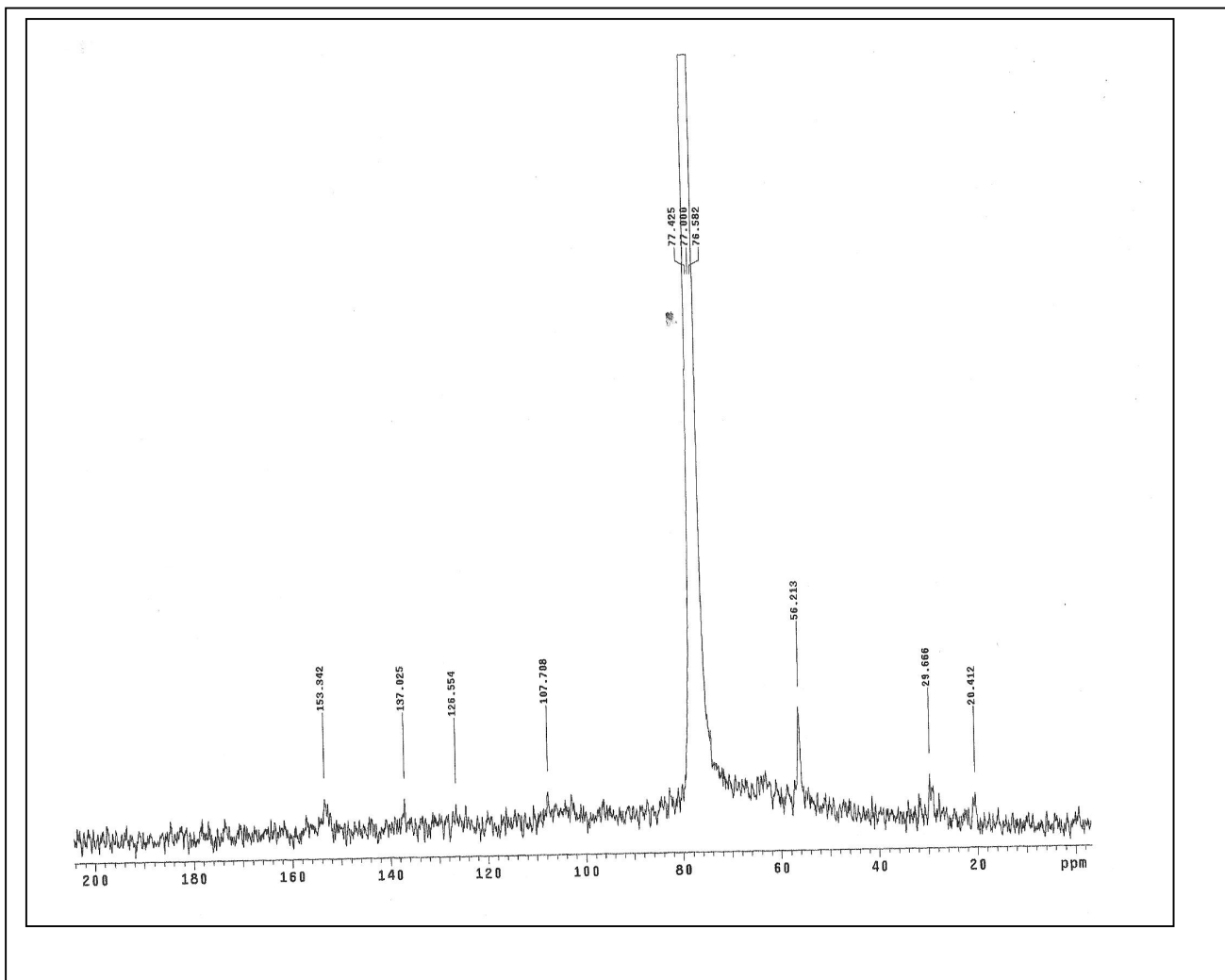


Figura 34. Espectro da RMN <sup>13</sup>C da DHP2s

## 5. CONCLUSÕES

- Os espectros de IV revelaram absorções que evidenciaram presença de materiais extracelulares funcionais tais como amidas que em meio nutritivo podem polimerizar;
- Os dados de IV revelaram também que o  $H_2O_2$  e peroxidase não contribuíram para a formação de polimerização desidrogenativa nas condições experimentais deste trabalho, tendo em vista, provavelmente, a ausência de precursores de lignina;
- O mesmo tratamento com sacarose que inibiu a formação de DHP em meio MS, foi o melhor elicitador, pois, induziu a maior concentração de lignina da parede celular como mostrado no Capítulo II;
- O mesmo tratamento com a combinação de 2,4-D e cinetina que proporcionou a menor concentração de lignina na parede celular e ligninas extracelulares, foi o tratamento que apresentou, em espectro de RMN  $^1H$ , as maiores intensidades na região dos grupos metoxílicos e prótons aromáticos;
- As características das DHPs variam de acordo com as condições expostas para a síntese;
- A sacarose não contribuiu para formação de DHP, e, possivelmente seus sinais encobrem as regiões de análise tanto em RMN  $^{13}C$  quanto em RMN  $^1H$ ;
- A combinação do 2,4-D com cinetina em meio MS com o precursor de lignina álcool sinapílico formou DHP; e
- O estudo de DHPs contribuiu para o entendimento da estrutura de lignina nativa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ADLER, E. Lignin chemistry – past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, p. 169-218, 1977.

AGARWAL, U. P.; TERASHIMA, N. FT –Raman study of dehydrogenation polymer (DHP) lignins. **International symposium on wood and pulping chemistry**. Wisconsin USA, v. III, 2003.

AGARWAL, U. P., RALPH, S. A. In situ quantitation of ring-conjugated ethylenic lignin-units in spruce thermomechanical pulps by FT-Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 51, p. 1648, 1997.

ANDER, P.; ERIKSSON, K. E. Influence of carbohydrates on lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Svensk Papperstidning**, v. 78, p. 643-652, 1975.

ARNALDOS, T. L.; FERRER, M. A.; GARCÍA, A. A. C.; MUÑOZ, R. Changes in peroxidase activity and isoperoxidase pattern during strawberry (*Fragaria × ananassa*) callus development. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 429-435, 2002.

BARAKAT, A.; CHABBERT, B.; CATHALA, B. Effect of reaction concentration on the solubility and the chemical structure of lignin model compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2118-2125, 2007.

BARAKAT, A.; GAILLARD, C.; LAIREZ, D.; SAULNIER, L.; CHABBERT, B.; CATHALA, B. Supramolecular organization of heteroxylan-dehydrogenation polymers (synthetic lignin) nanoparticles, **Biomacromolecules**, v. 9, p. 487-493, 2008.

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.

CATHALA, B., MONTIES, B. Influence of pectins on the solubility and the molar mass distribution of dehydrogenative polymers (DHPs, lignin model compounds). **Biological Macromolecules**, v. 29, p. 45-51, 2001.

CATHALA, B., AGUIÉ-BÉGHIN, V., DOUILLARD, R. Coniferyl alcohol reactivity at the air/water interface. **Comptes Rendu Biologies**, n. 327, p. 777-784, 2004.

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.

DAWSON, J. H. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. **Science**, v.240, p. 433, 1988.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, K-E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, n. 391, p. 144-148, 1996.

EKLUND, L.; ELIASSON, L. Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n. 228, p.863-867, 1990.

ERIKSSON, K-E. L.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer-Verlag, 1990.

EVANS, J. J., HIMMELSBACH, d. s., Incorporation of peroxidase into synthetic lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p. 830-832, 1991.

FAIX, O. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. **Holzforschung**, v.45, p.21-27, 1991.

FREUDENBERG, K. Formation of lignin in plants. **Mitt. Österreichische Gesellschaft Fur Holzforschung** v.4, p. 40, 1952.

FREUDENBERG, K. The hydrogenation of Coniferyl alcohol. In: FREUDENBERG, K., NEISH, A. C. Ed. **Constitution and biosynthesis of Lignin**. Springer-Verlag, Berlin, p.82-92, 1968.

GABALDÓN, C.; LÓPEZ-SERRANO, M.; POMAR, F.; MERINO, F.; CUELLO, J.; PEDREÑO, M. A.; RÓS BARCELÓ, A. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 580, p. 4311-4316, 2006.

GALSTON, A. W. & DALBERG, L. Y. The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. **American Journal Botany**, v.41, p.373-380, 1954.

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. **Chemistry & Biology**, v.6, p.143-151, 1999.

GUAN, S-Y.; MLYNÁR, J.; SARKANEN, S. Dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol on macromolecular lignin templates. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 911-918, 1997.

GRABBER, J. H.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4984-4989, 2003.

HAFRÉN, J.; WESTERMARK, U.; LENNHOLM, H.; TERASHIMA, N. Formation of <sup>13</sup>C-enriched cell-wall DHP using isolated soft xylem from *Picea abies*. **Holzforschung**, v.56, p.585-591, 2002.

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

HIGUCHI, T. Look back over the studies of lignin biochemistry. **Journal of Wood Science**, v.52, p.2-8, 2006.

INGOLD, E.; SUGIYAMA, M.; KOMAMINE, A. L- $\alpha$ -aminooxy- $\beta$ -phenylpropionic acid inhibits lignification but not the differentiation to tracheary elements of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans*. **Physiology Plant**, v.78, p.67-74, 1990.

JUNG, H. G.; CASLER, M. D. Maize stem tissues: cell wall concentration and composition during development. **Crop Science Society of America**, v. 46, 9. 1793-1800, 2006.

KIM, H.; RALPH, J.; LU, F.; PILATE, G.; LEPLÉ, J. C.; POLLET, B.; LAPIERRE, C. Identification of the structure and origin of thioacidolysis marker compounds for cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in angiosperms. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.49, p.47412-47419, 2002.

KIM, H.; RALPH, J. Simplified preparation of coniferyl and sinapyl alcohols. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3693-3695, 2005.

KIRK, T. K. In: **Tappi Research and Development Conference**, TAPPI Proceedings (TAPPI, Atlanta), p. 73-78, 1986.

KISHIMOTO, K.; MATSUI, K.; OZAWA, R.; TAKABAYASHI, J. Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, v. 170, p. 715-723, 2006.

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

LAGRIMINI, L. M.; ROTHSTEIN, S. Tissue-specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, v.84, p. 438, 1987.

LEWIS, N. G.; RAZAL, R. A.; YAMAMOTO, E. Lignin degradation by peroxidase in organic media: a reassessment. **Biochemistry**, v. 84, p.7925-7927, 1987.

LEWIS, N. G.; NEWMAN, J.; JUST, G.; RIPMEISTER, **Journal Macromolecules**, v. 20, p. 1752, 1997.

LEWIS, N. G.; DAVIN, L. B.; SARKANEN, S. Lignin and lignan biosynthesis: distinctions and reconciliations. In: LEWIS, N. G.; SARKANEN, S. Eds. **Lignin and lignan biosynthesis**. ACS Symposium Series 697, (WASHINGTON, DC: American Chemical Society), p. 1-28, 1998.

LEWIS, N. G. A 20<sup>th</sup> Century roller coaster ride: a short account of lignification, *Curr. Opin. Plant Biology.*, v.2, p.153-162, 1999.

MÄDER, M.; UNGEMACH, J.; SCHLOSS, P. The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. **Planta**, v. 147, p. 467-470, 1980.

McDOUGALL, G. J. Cell-wall proteins from Sitka spruce xylem are selectively insolubilised during formation of dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. **Phytochemistry**, v. 57, p. 157-163, 2001.

McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell wall in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.53, p. 625, 1984.

MÉCHIN, V., BAUMBERGER, S., POLLET, B., LAPIERRE, C. Peroxidase activity can dictate the *in vitro* lignin dehydrogenative polymer structure. **Phytochemistry**, v. 68, p. 571-579, 2007.

MERDY, P.; GUILLON, E.; DUMONCEAU, J.; APLINCOURT, M. Characterisation of a wheat straw cell wall residue by various techniques – A comparative study with a synthetic and an extracted lignin. **Analytica Chimica Acta**, v. 459, p. 133-142, (2002)a.

MERDY, P.; GUILLON, E.; DUMONCEAU, J.; APLINCOURT, M.; VEZIN, H. J. *Coll. Interface Science*, v. 245, p. 24, 2002b.

MICIC, M.; JEREMIC, M.; RADOTIC, K.; MAVERS, M.; LEBLANC, R. M. Visualization of artificial lignin supramolecular structures. **Scanning**, v. 22, p. 288-294, 2000.

MICIC, M.; RADOTIC, K.; BENITEZ, I.; RUANO, M.; JEREMIC, M.; MOY, V.; MABROUKI, M.; LEBLANC, R. M. Topographical characterization and surface force spectroscopy of the photochemical lignin model compound. **Biophysical Chemistry**, v. 94, p. 257-263, 2001a.

MICIC, M.; BENITEZ, I.; RUANO, M.; MAVERS, M.; JEREMIC, M.; RADOTIC, K.; MOY, V.; LEBLANC, R. M. Probing the lignin nanomechanical properties and lignin-lignin interactions using the atomic force microscopy. **Chemical Physics Letters**, v. 347, p. 41-45, 2001b.

MICIC, M., RADOTIC, K., JEREMIC, M., LEBLANC, R.M. Study of self-assembly of the lignin model compound on cellulose model substrate. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 2 p. 100-106, 2003.

MICIC, M., ORBULESCU, RADOTIC, K., JEREMIC, M., SUI, G., SHENG, YUJUN, LEBLANC, R. M. **Biophysical Chemistry**, n.99, p.55-62, 2002.

MÜSEL, G.; SCHINDLER, T.; BERGFELD, R.; RUEL, K.; JACQUET, G.; LAPIERRE, C.; SPETH, V.; SCHOPFER, P. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. **Planta**, v.201, p.146–159, 1997.

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, p.71-79, 1995.

OHNISHI, J., WATANABE, T., KOSHIJIMA, T. Synthesis of dehydrogenation polymer-polyose complexes by peroxidase. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1185-1190, 1992.

OLSON, P. D.; VARNER, J. E. Hydrogen peroxide and lignification. **The Plant Journal**, v. 4, n. 5, p.887-892, 1993.

ÖNNERUD, H.; ZHANG, L.; GELLERSTEDT, G. HENRIKSSON, G. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. **The Plant Cell**, v. 14, p. 1953-1962, 2002.

PARKÅS, J.; PAULSSON, M.; WESTERMARK, U.; TERASHIMA, N. **Holzforshung**, v.55, n. 3, p.276, 2001.

RALPH, J., HELM, R. F., QUIDEAU, S. HATFIELD, R. D. Lignin-feruloyl ester cross-links in grasses. Part 1. Incorporation of feruloyl esters into coniferyl alcohol dehydrogenation polymers. **Journal of Chemical Society**, Perkin Trans. 1, p. 2961-2969, 1992.

RANOCHA, P.; McDOUGALL, G.; HAWKINS, S.; STERJIADIS, R.; BORDERIES, G.; STEWART, D.; CABENES-MACHETEAU, M.; BOUDET, A. M.; GOFFNEC, D. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar. **European Journal Biochemistry**, v. 259, p.485-495, 1999.

REID, I. D. Intermediates and Products of Synthetic Lignin (Dehydrogenative Polymerizate) Degradation by *Phlebia tremellosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2834-2840, 1991.

RICHARDSON, A.; STEWART, D.; McDOUGALL, G. J. Identification and partial characterization of a coniferyl alcohol oxidase from lignifying xylem of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). **Planta**, v.203, p.35-43, 1997.



ROS BARCELÓ, A.; GÓMEZ ROS, L.; GABALDÓN, C.; LÓPEZ-SERRANO, M.; POMAR, F.; CARRIÓN, J. S.; PEDREÑO, M. A. Basic peroxidases: the gateway for lignin evolution. **Phytochemistry**, v. 3, p. 61-78, 2004.

ROUHI, A. M. Only facts will end the lignin war. **Chemical & Engineering News**, v.2, p. 52-56, 2001.

SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions** ed. Wiley Interscience, Nova Iorque, 95p., 1971.

RYSER, U.; SCHORDERET, M.; ZHAO, G-F.; STUDER, D.; RUEL, K.; HAUF, G.; KELLER, B. **Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein.** **Plant Journal**, v. 12, n.1, p.97-111, 1997.

SAAKE, B.; ARGYROPOULOS, D. S.; BEINHOFF, O.; FAIX, O. A comparison of lignin polymer models (DHPs) and lignins by P-31 NMR spectroscopy. **Phytochemistry**, v.43, p.499-507, 1996.

SAENZ-CARBONELL, L. A.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; MORENO-VALENZULA, O.; CIAU-UITZ, R.; LOPEZ-MEYER, M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Effect of the medium pH on the release of secondary metabolites from roots of *Datura stramonium*, *Catharanthus roseus*, and *Tagetes patula* cultured in vitro. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.38, p.257-267, 1993.

SHANONN, M. L. Plant isoenzymes. **Annual Review Plant Physiology**, Stanford, v.19, p. 187-210, 1968.

SASAKI, S., NISHIDA, T., TSUTSUMI, Y., KONDO, R. Lignin dehydrogenative polymerization mechanism: a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces in vitro dehydrogenative polymer rich in  $\beta$ -O-4 linkage. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 562, p. 197-201, 2004.

SATO, Y.; SUGIYAMA, M.; KOMAMINE, A.; FUKUDA, H. Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. **Planta**, v. 196, p. 141-147, 1995.

SIEGEL, S. M. On the biosynthesis of lignins. **Physiology Plant**, v. 6, p. 134-139, 1953.

SONOKI, T.; IIMURA, Y.; MASAI, E.; KAJITA, S.; KATAYAMA, Y. Specific degradation of  $\beta$ -aryl ether linkage in synthetic lignin (dehydrogenative polymerizate) by bacterial enzymes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 produced in recombinant *Escherichia coli*. **Journal Wood Science**, v. 48, p. 429-433, 2002.

STERJIADES, R.; DEAN, J. F. D.; GAMBLE, G.; HIMMELSBACH, D. S.; ERIKSSON, K-EL. Extracellular laccases and peroxidases from Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. Reactions with monolignols and lignin model compounds. **Planta**, v. 190, p.75-87, 1993.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v.42, n. 2, p.111-122, 2000.

SWARNKAR, P. L.; TYAGI, V. Peroxidases in tissues cultured *in vitro*. In: SIDDIQUI, B. A., KHAN, S. Eds. **Plant breeding advances & in vitro culture**. 1996

TERASHIMA, N., SEGUCHI, Y. Heterogeneity in formation of lignin. IX. Factors influencing the formation of condensed structures in lignins. **Cellulose Chemistry & Technology**, v. 22, p. 147-154, 1988.

TERASHIMA, N.; ATALLA, R. H. Formation and structure of lignified plant cell wall - factors controlling lignin structure during its formation. In: **Proceedings of the 8<sup>th</sup> International symposium on wood and pulping chemistry**. Helsinki, Finland, v. 1, p.77-84, 1995.

TERASHIMA, N.; ATALLA, R. H.; RALPH, S. A.; LANDUCCI, L. L. LAPIERRE, C.; MONTIES, B. New preparations of lignin polymer models under conditions that approximate cell wall lignification. 2. Structural characterization of the models by thiacidolysis. **Holzforschung**, v. 50, p. 9-14, 1996.

THORPE, T. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. **International Review of Cytology**, v.11, p.71-112, 1980.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science**, n. 221, p. 661-663, 1983.

TOBIMATSU, Y.; TAKANO, T.; KAMITAKAHARA, H.; NAKATSUBO, F. Studies on the dehydrogenative polymerizations of monolignol? Glycosides. Part 2: Horseradish peroxidase-catalyzed dehydrogenative polymerization of isoconiferina. **Holzforschung**, v. 60, p. 513-518, 2006.

TOLLIER M, LAPIERRE C, MONTIES B, FRANCESH C, ROLANDO, C. Structural variations in synthetic lignins (DHPs) according to the conditions of their preparation. In: **Proceedings of the 6th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry**, Melbourne, v. 11, p 35-40, 1991.

WELINDER, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, p.388-393, 1992.

WERSHAW, R. L. 2004. Evaluation of conceptual models of natural organic matter (humus) from a consideration of the chemical and biochemical processes of humification. **Scientific de Investigacions Reporte**, Reston, Virginia: U.S. Geological Survei.

WINK, M. The cell culture medium: A functional extracellular compartment of suspension-cultured cells. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.38, p.307-319, 1994.

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

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. P. 1-32. In: JUNG, H. G. Eds. **Forage cell wall structure and digestibility**. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, 1993.

WYCOFF, K. L.; POWELL, P. A.; GONZALES, R. A.; CORBIN, D. R.; LAMB, C. ; DIXON, R. Stress activation of a bean hydroxyproline- rich glycoprotein promoter is superimposed on a pattern of tissue-specific developmental expression. **Plant Physiology**, v.109, p.41-52, 1995.

VAN SOEST, P. J. (Ed) **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994.

XIE, Y.; YASUDA, H.; LIU, H. Analysis of the structure of lignin-carbohydrate complexes by the specific <sup>13</sup>C tracer method. **Journal of Wood Science**, v.46, n.2, p.130-136, 2000.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

A técnica *in vitro* de cultura de tecidos para a calogênese possibilitou uma experimentação de reguladores de crescimento variada e uma quantidade expressiva de calos para trabalhar. Além disso, o sistema de cultura *in vitro* oferece uma exposição uniforme dos calos e de células de *Eucalyptus grandis* devido ao controle de temperatura, luminosidade, nutrientes entre outros. Dessa forma, foi possível concluir que sucessivos subcultivos para meios frescos possibilitaram a recuperação e desenvolvimento de calos compactos e marrons para calos viáveis.

As células de *E. grandis* liberaram precursores de lignina para o meio nutritivo extracelular, onde, ficou concluído que o ácido *p*-cumárico foi o elicitador mais eficiente, pois induziu a maior concentração lignina na amostra do material extracelular e a segunda maior concentração de lignina na amostra da parede celular.

A representação de polimerização desidrogenativa *in vitro* mostrou que é possível usar a síntese de DHP para modelar a lignina em meio com diferentes substâncias possibilitando diversas combinações e manipulações. Assim, foi possível concluir que o álcool coniferílico foi mais eficiente na síntese de DHP em meio nutritivo (sem o prévio cultivo de células) que o álcool sinápico. Concluir também que o peróxido de hidrogênio e a peroxidase utilizados para a polimerização em meio nutritivo (com o prévio cultivo de células) não contribuiu para a formação de DHPs.

Os protocolos elaborados para a alteração do teor de lignina na parede celular; para a formação de lignina em meio extracelular e para a formação de DHPs, mostraram que as formas de manipulação da lignificação não é somente por alterações genéticas, mas, também é possível, no momento, objetivando principalmente novas abordagens com promissoras futuras aplicações.

## **8. ANEXOS**

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

**ANEXO II.** Tabelas de Análises de Variância

**ANEXO III.** Peso dos produtos formados do meio extracelular com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase

**ANEXO IV.** Espectros do Infravermelho do meio extracelular com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase e peroxidase

**ANEXO V.** Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs do álcool sinapílico

**ANEXO VI.** Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do <sup>13</sup>C das DHPs do álcool coniferílico e sinapílico

**ANEXO VII.** Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do H dos produtos formados em meio extracelular com os filtrados das células após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase

**ANEXO VIII.** Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do <sup>13</sup>C da Lignina Extracelular

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

**Tabela 11.** Valores das medições de absorvância (280nm) e concentração de lignina da parede celular

<b>Tratamentos (repetições)</b>	<b>Absorvância (280nm)</b>	<b>Concentração de Lignina na parede das Células em Suspensão (ppm)</b>
EG1	0,705	361,77
EG1	0,696	356,11
EG1	0,760	396,38
EG2	0,321	120,11
EG2	0,316	116,96
EG2	0,343	133,96
EG3	0,653	329,05
EG3	0,640	320,87
EG3	0,627	312,69
EG4	0,546	261,71
EG4	0,515	242,20
EG4	0,525	248,50

**Nota:** EG1 – Sacarose; EG2 – 2,4-D + cinetina; EG3 – *p*-cumárico; EG4 - Controle

**Tabela 12.** Valores das medições de absorvância (280nm) e concentração de lignina extracelular

<b>Tratamentos</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Concentração da Lignina Extracelular nas Células em Suspensão (ppm)</b>
EG1	0,245	110,52
EG1	0,249	112,77
EG1	0,246	111,89
EG2	0,154	59,37
EG2	0,158	61,62
EG2	0,150	57,12
EG3	0,292	136,94
EG3	0,287	134,13
EG3	0,283	131,88
EG4	0,269	124,01
EG4	0,266	122,33
EG4	0,263	120,64

**Nota:** EG1 – Sacarose; EG2 – 2,4-D + cinetina; EG3 – *p*-cumárico; EG4 - Controle

## ANEXO II. Tabelas de Análises de Variância

**Tabela 13.** Análise de Variância do teor de lignina da parede celular

<b>Fontes de Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Soma de Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Teste F</b>	<b>Significância</b>	<b>Coefficiente de Variação</b>
Tratamentos	3	103827.1	34609.04	191.448	0.00000	5.041
Resíduo	8	1446.205	180.7756			

**Tabela 14.** Análise de Variância do teor de lignina extracelular

<b>Fontes de Variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Soma de Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Teste F</b>	<b>Significância</b>	<b>Coefficiente de Variação</b>
Tratamentos	3	9816.145	3272.048	838.213	0.00000	1.848
Resíduo	8	31.22880	3.903600			

**ANEXO III. Tabela de pesos dos produtos formados do meio extracelular com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase**

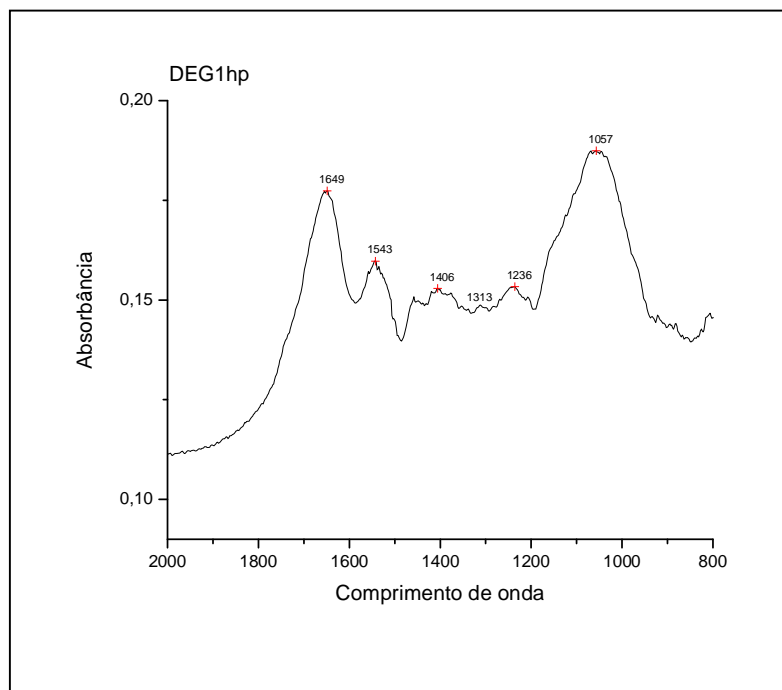
**Tabela 15.** Peso dos produtos formados com o meio extracelular suplementado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase após centrifugação e liofilização

<b>Tratamentos</b>	<b>Peso seco dos produtos formados com o meio extracelular (g)</b>
EG1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Peroxidase	0,1947
EG1 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0633
EG1 Peroxidase	0,0800
EG2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Peroxidase	0,1127
EG2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0612
EG2 Peroxidase	0,0434
EG3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Peroxidase	0,0496
EG3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0907
EG3 Peroxidase	0,0888
EG4 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Peroxidase	0,0726
EG4 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,0460
EG4 Peroxidase	0,0671

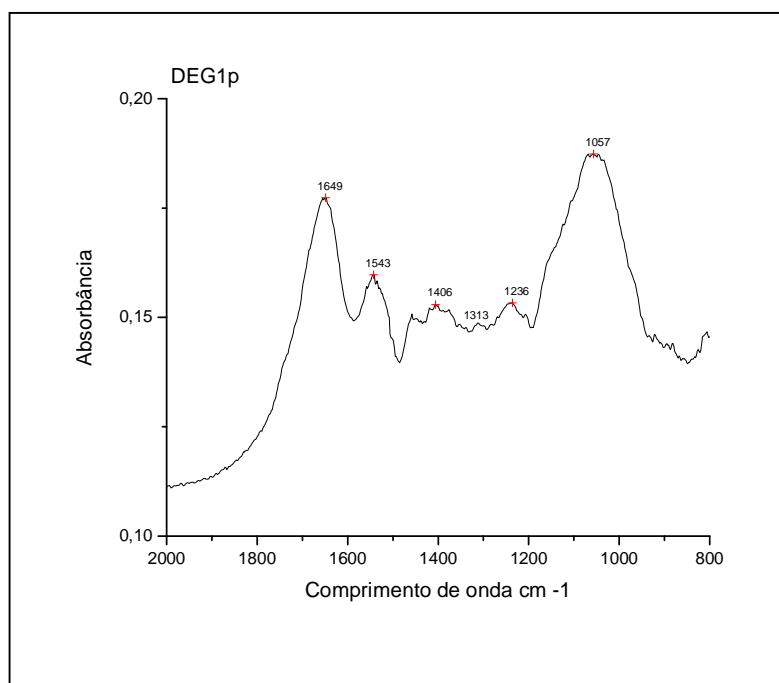
**Nota:** EG1 – Sacarose; EG2 – 2,4-D + cinetina; EG3 – *p*-cumárico; EG4 - Controle



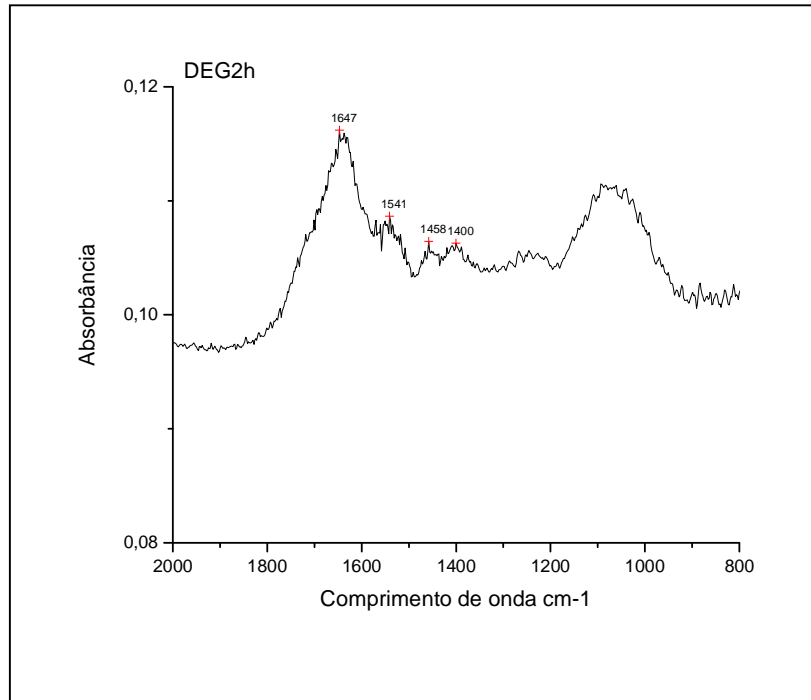
**ANEXO IV. Espectros do Infravermelho do meio extracelular com  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  + peroxidase e peroxidase**



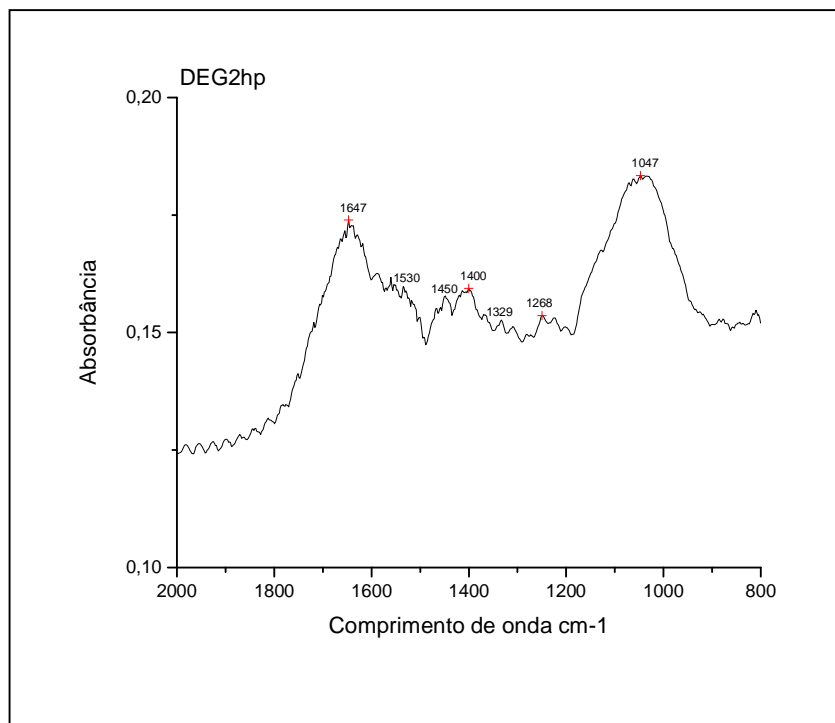
**Figura 35.** Infravermelho do tratamento DEG1hp do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*



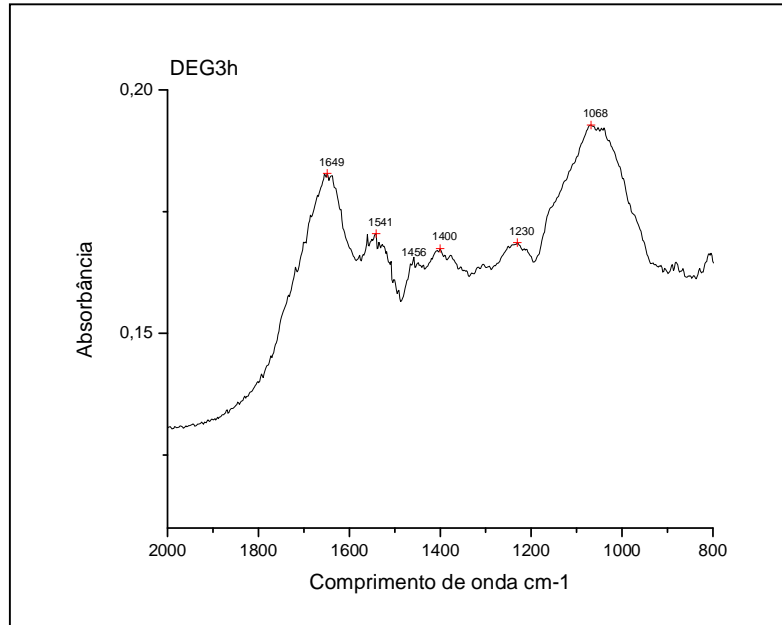
**Figura 36.** Infravermelho do tratamento DEG1p do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*



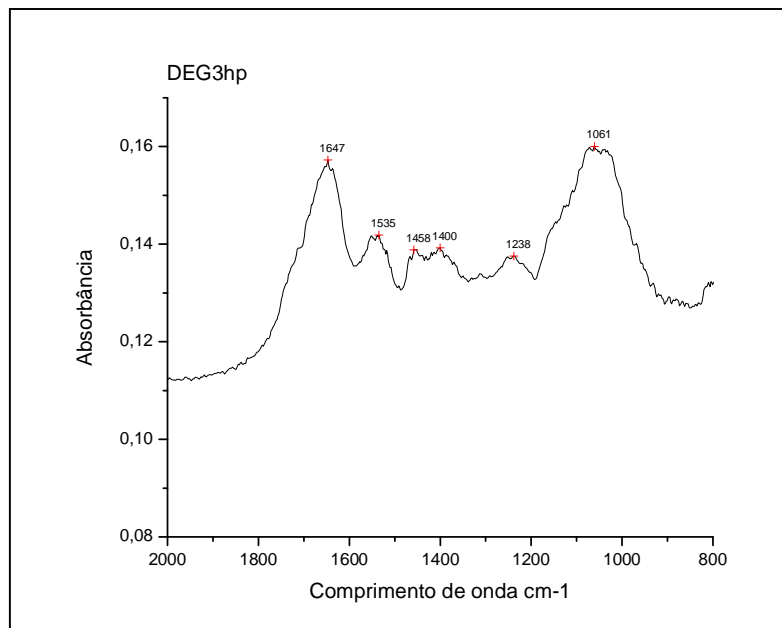
**Figura 37.** Infravermelho do tratamento DEG2h do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*



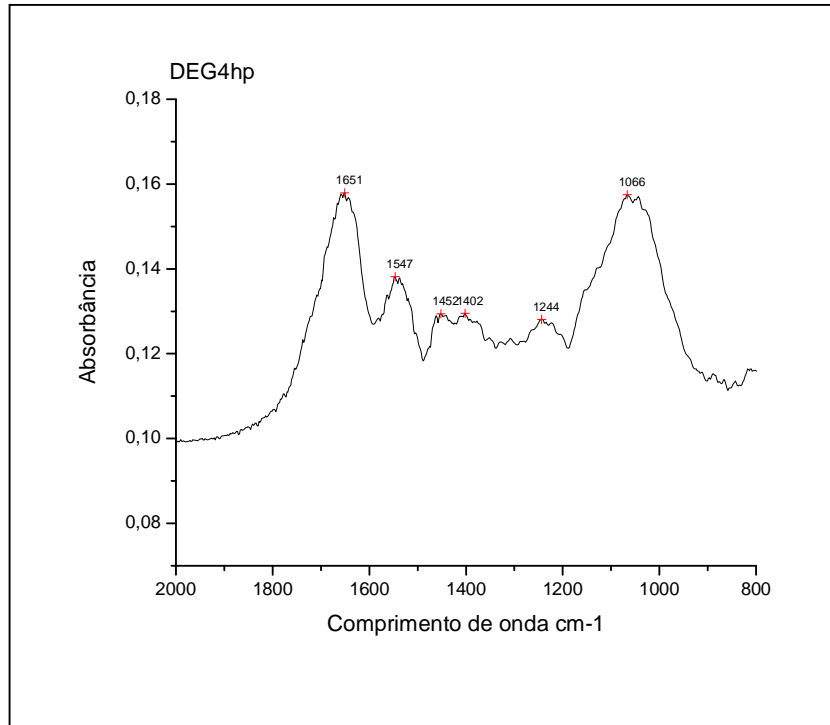
**Figura 38.** Infravermelho do tratamento DEG2hp do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*



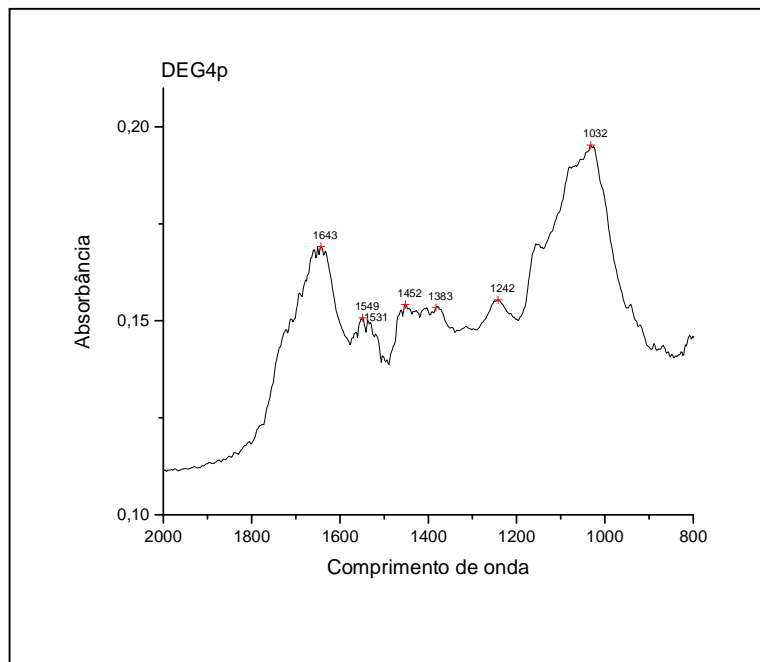
**Figura 39.** Infravermelho do tratamento DEG3h do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*



**Figura 40.** Infravermelho do tratamento DEG3hp do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*

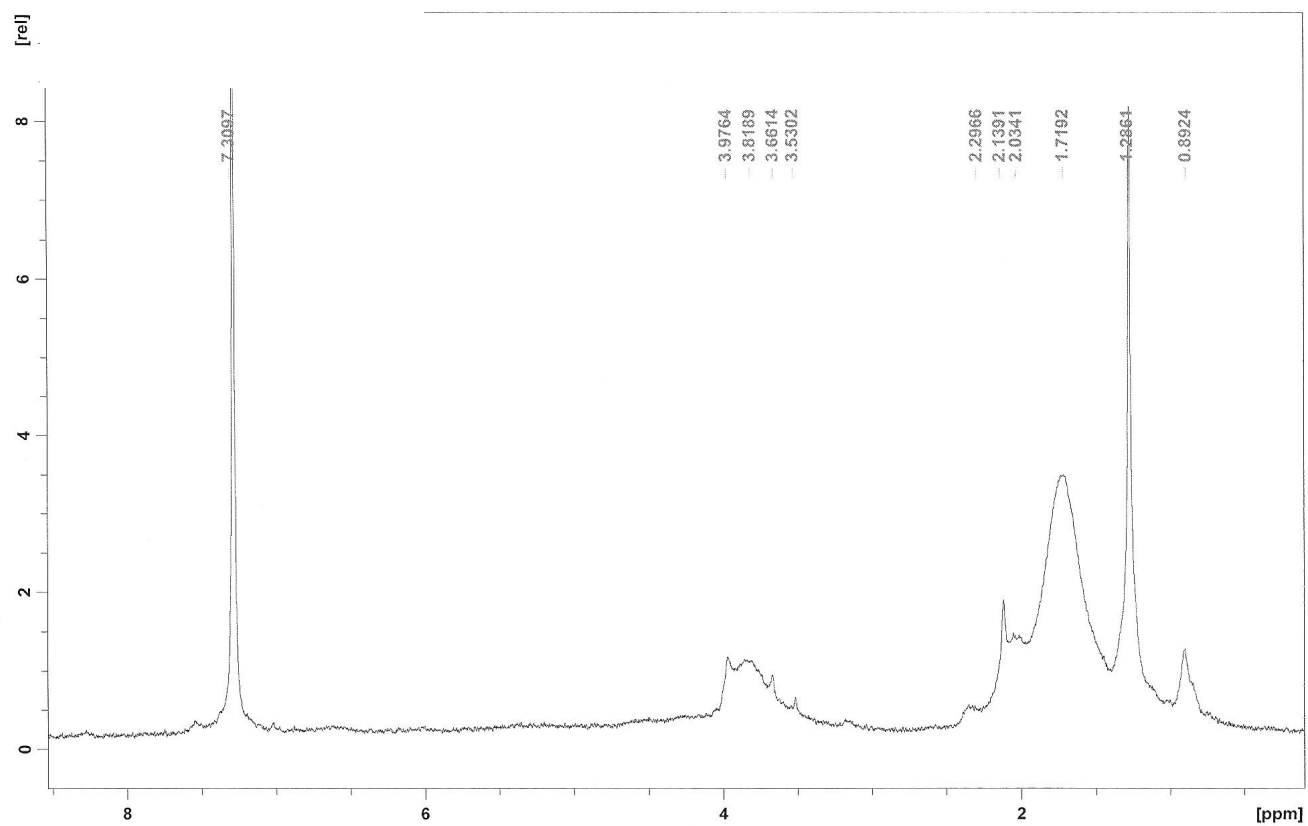


**Figura 41.** Infravermelho do tratamento DEG4hp do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*

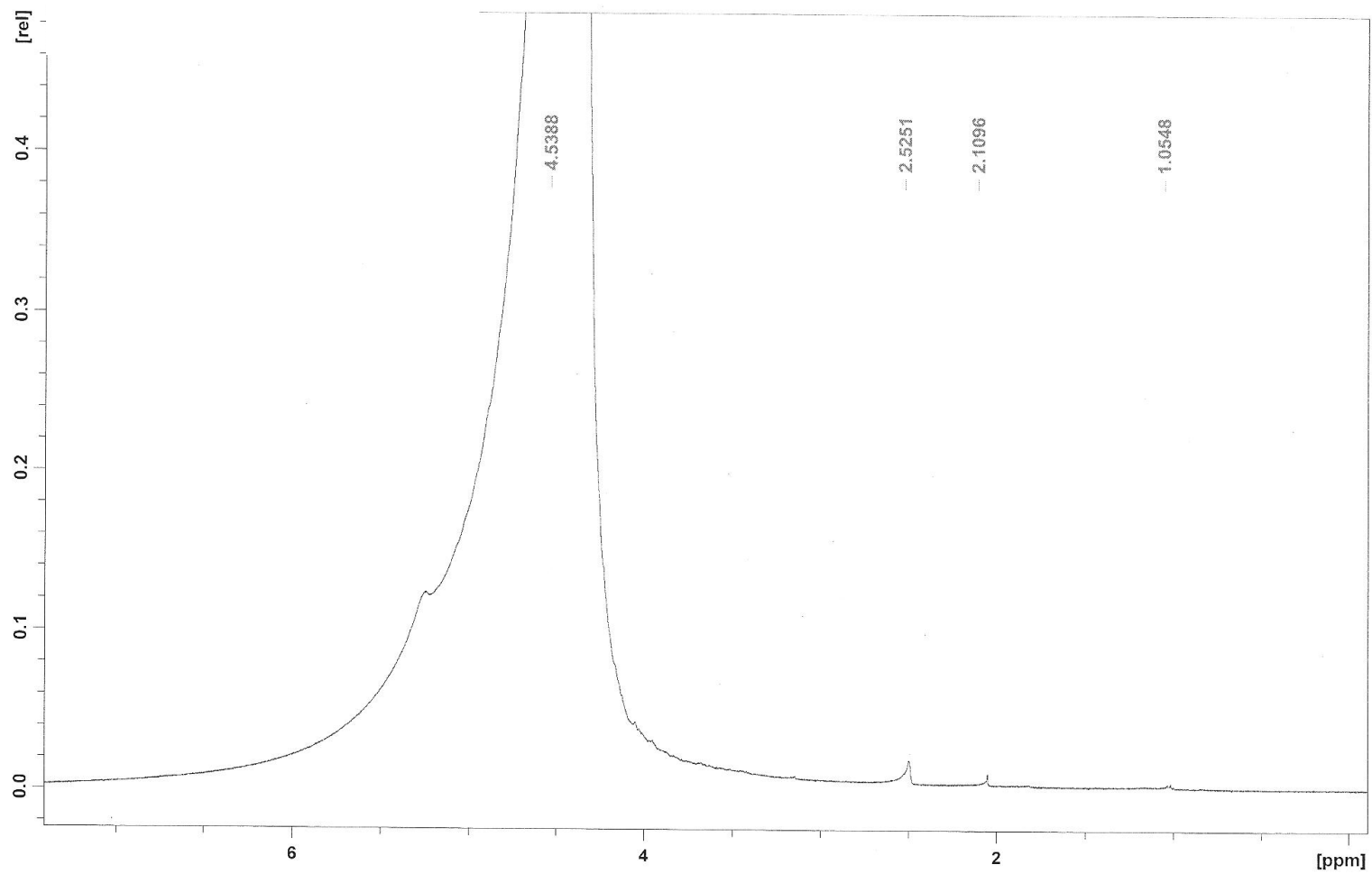


**Figura 42.** Infravermelho do tratamento DEG4p do filtrado da suspensão de *Eucalyptus grandis*

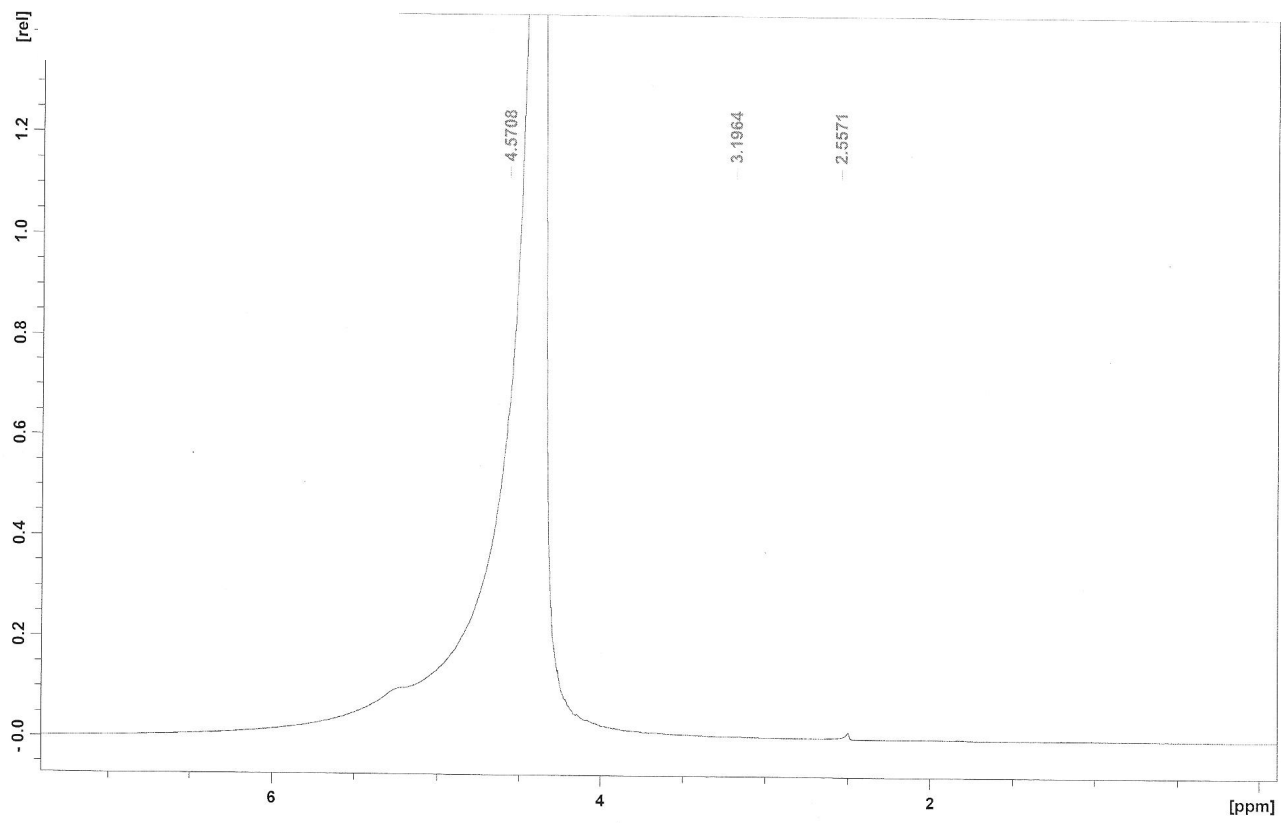
## ANEXO V. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do H das DHPs do álcool sinapílico



**Figura 43.** Espectro da RMN H da DHP1s



**Figura 44.** Espectro da RMN H da DHP3s



**Figura 45.** Espectro da RMN H da DHP4s

ANEXO VI. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do  $^{13}\text{C}$  das DHPs do álcool coniferílico e sinapílico

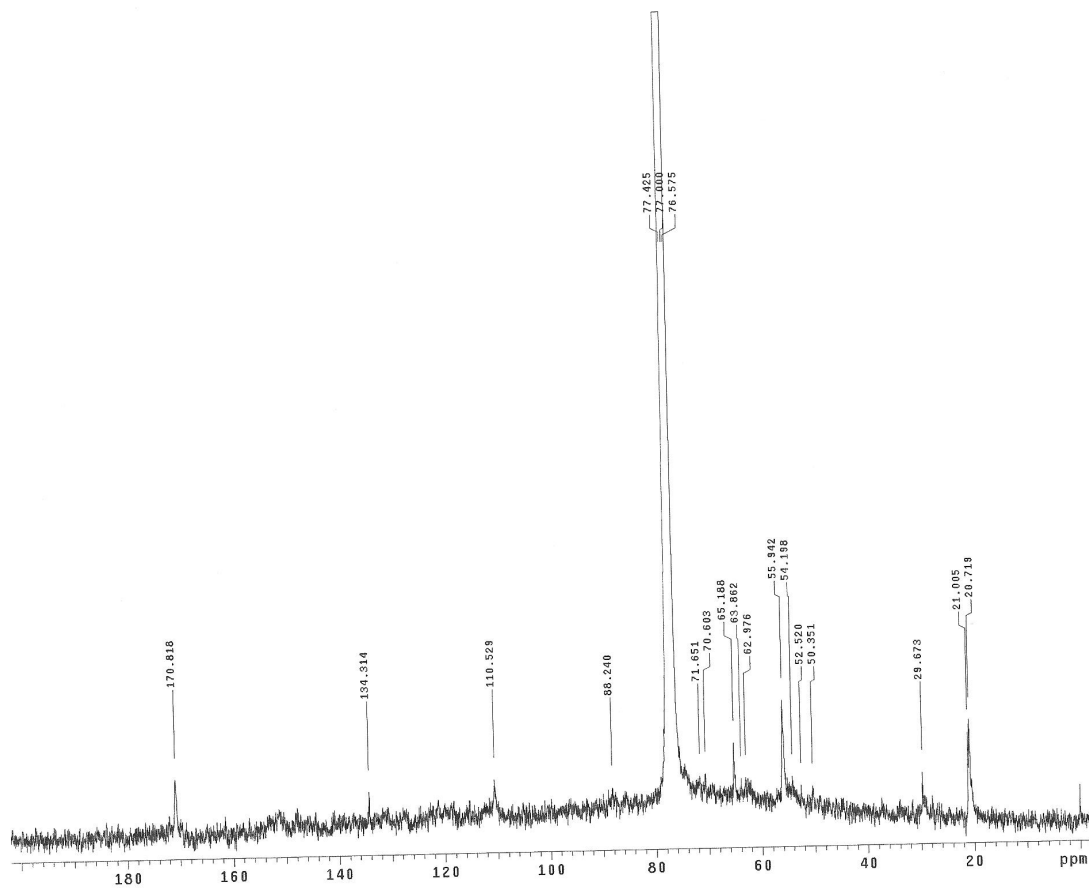


Figura 46. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  da DHP2c



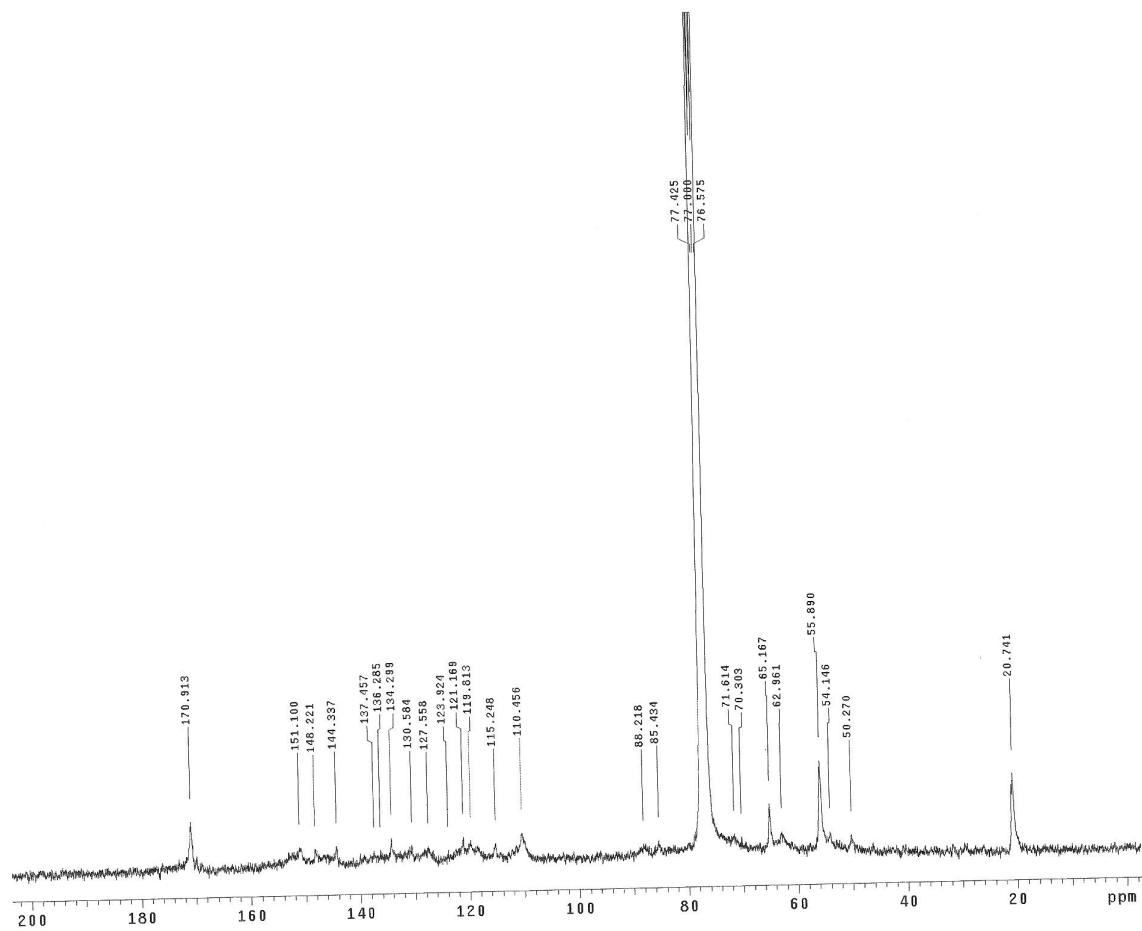


Figura 47. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  da DHP3c

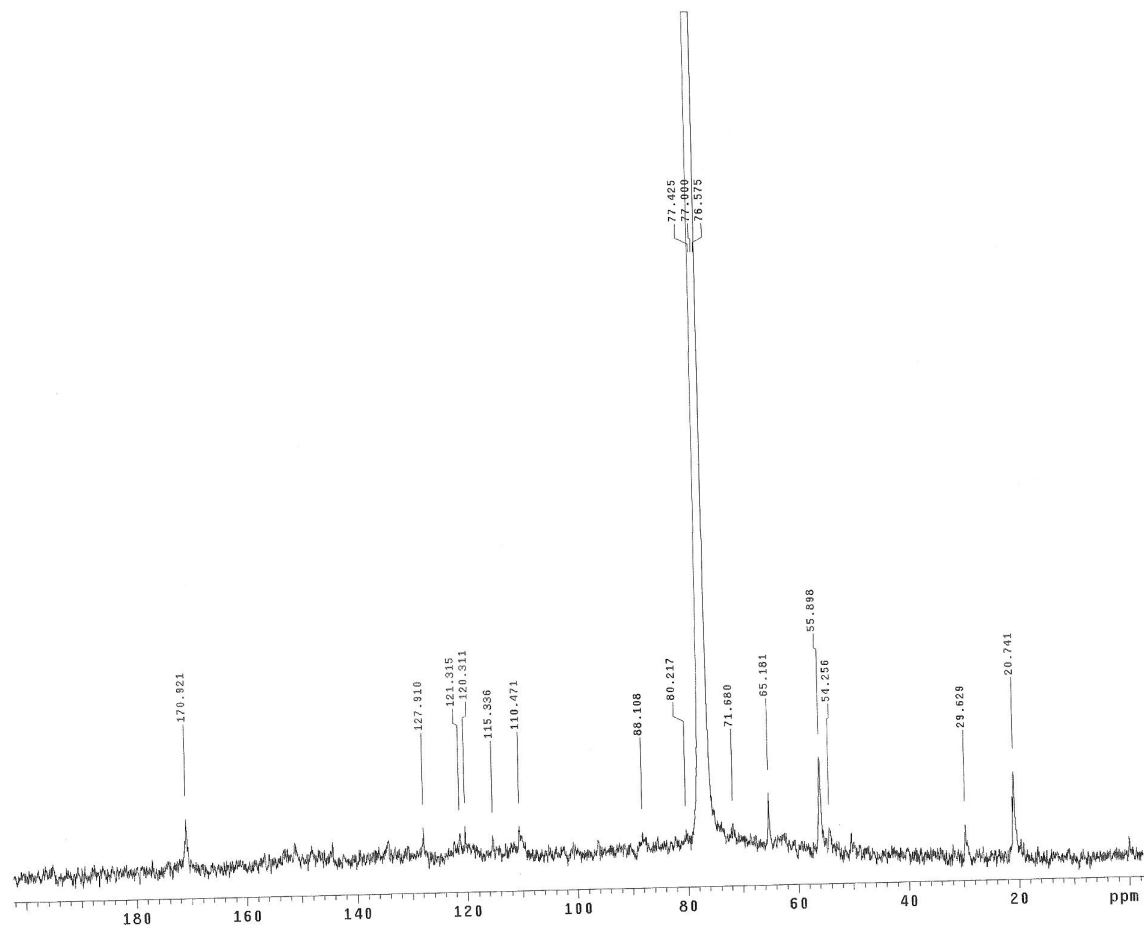


Figura 48. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  da DHP4c

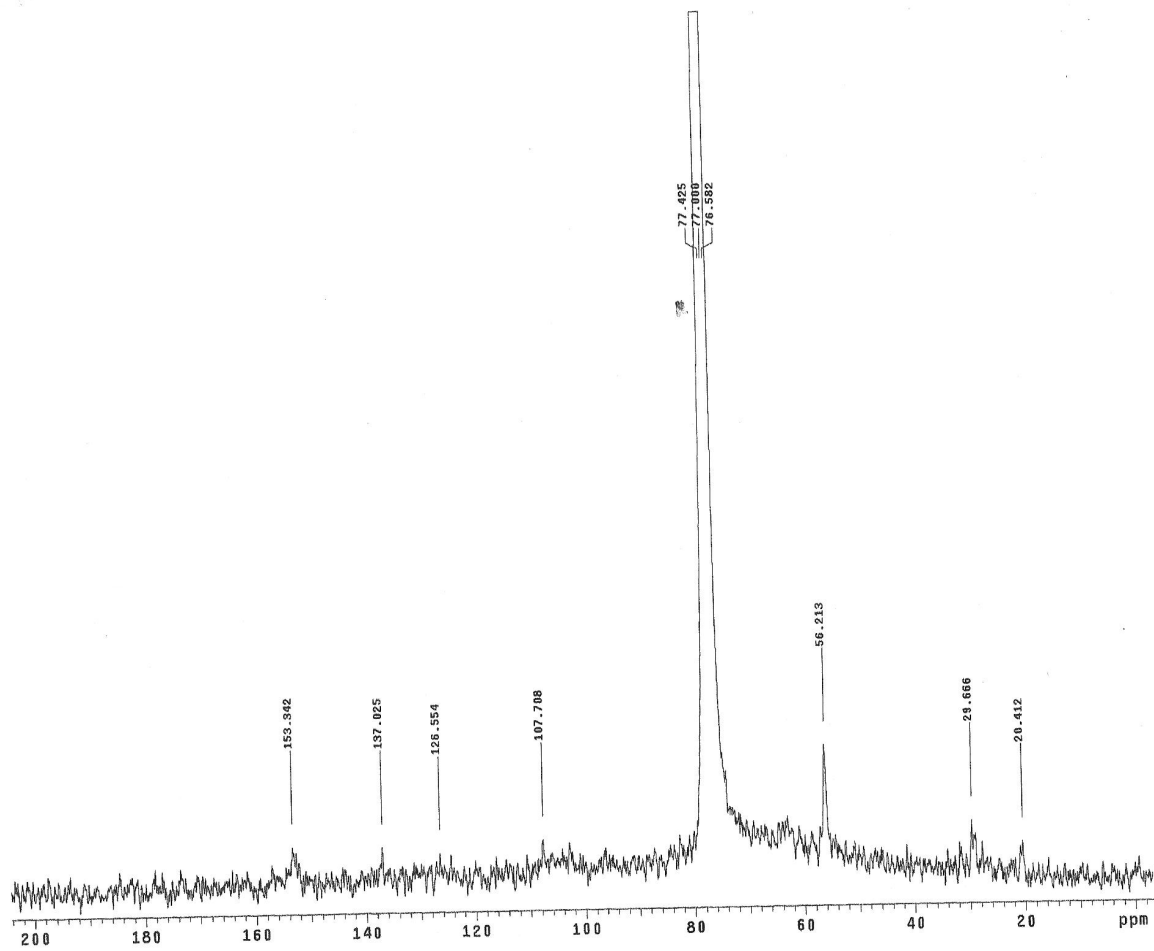
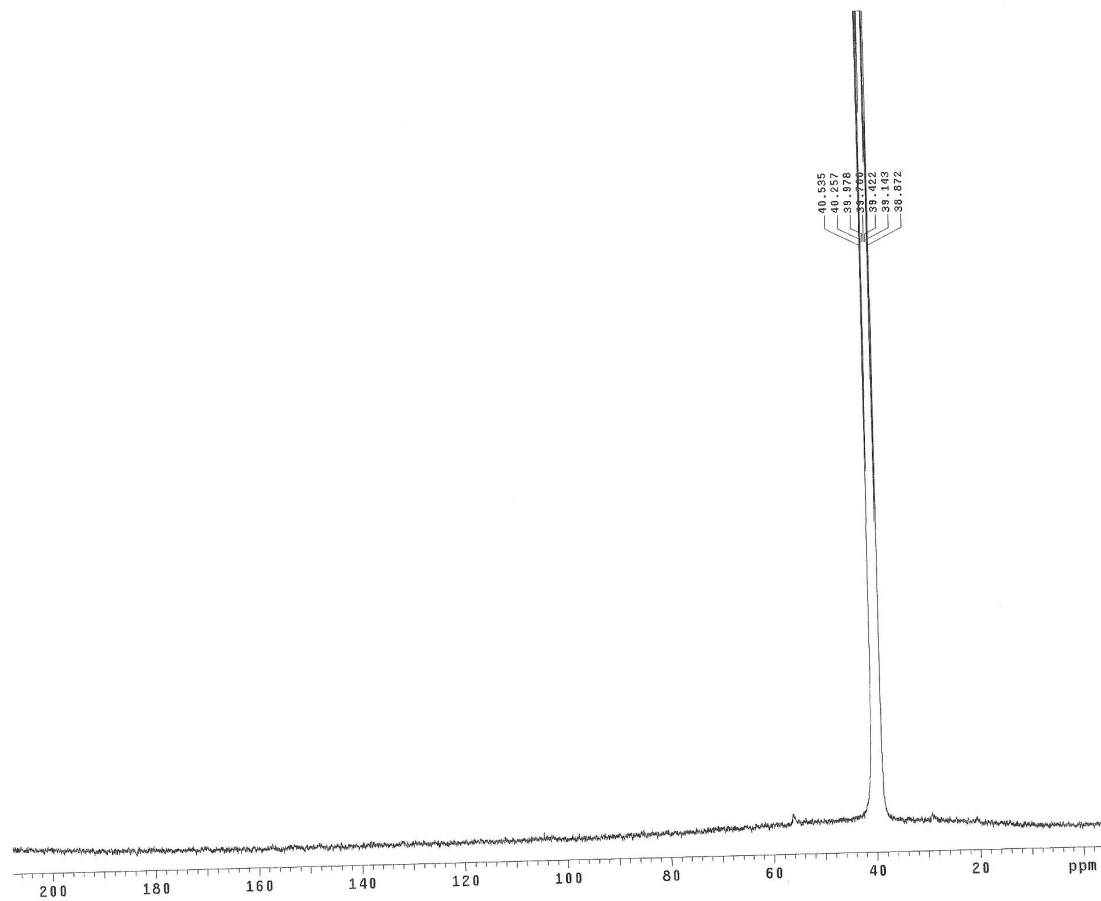
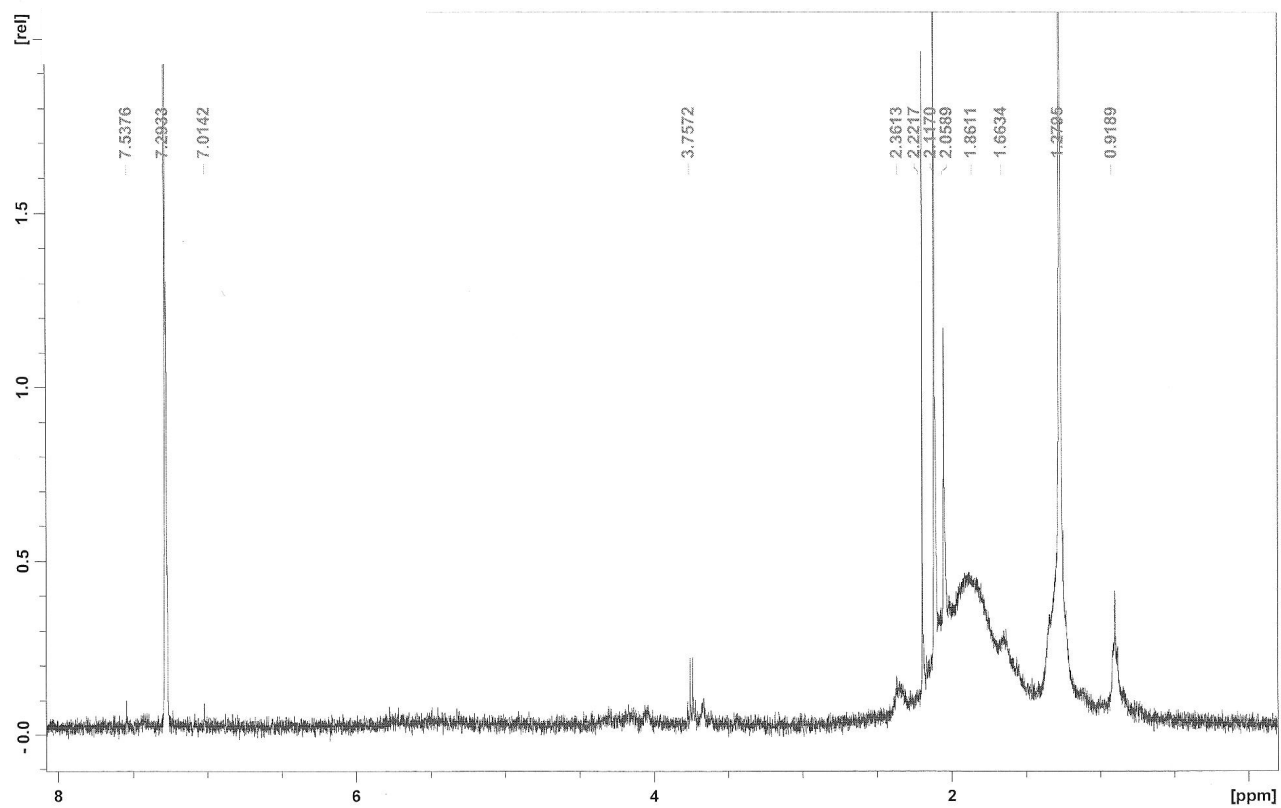


Figura 49. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  da DHP2s



**Figura 50.** Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  da DHP3s

**ANEXO VII. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do H dos produtos formados em meio extracelular com os filtrados das células após adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + peroxidase**



**Figura 51.** Espectro da RMN H do DEG1h

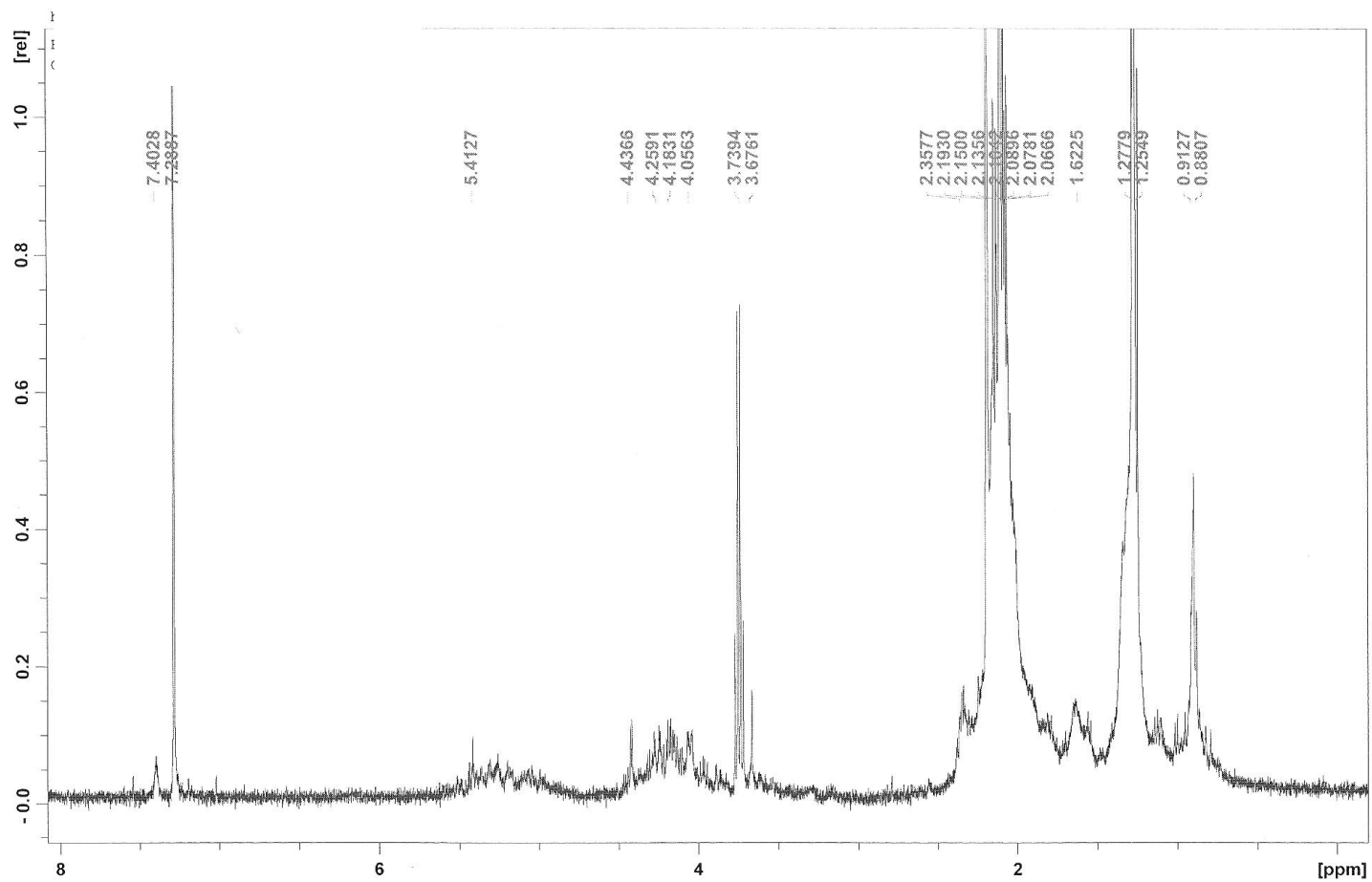


Figura 52. Espectro da RMN H do DEG1hp

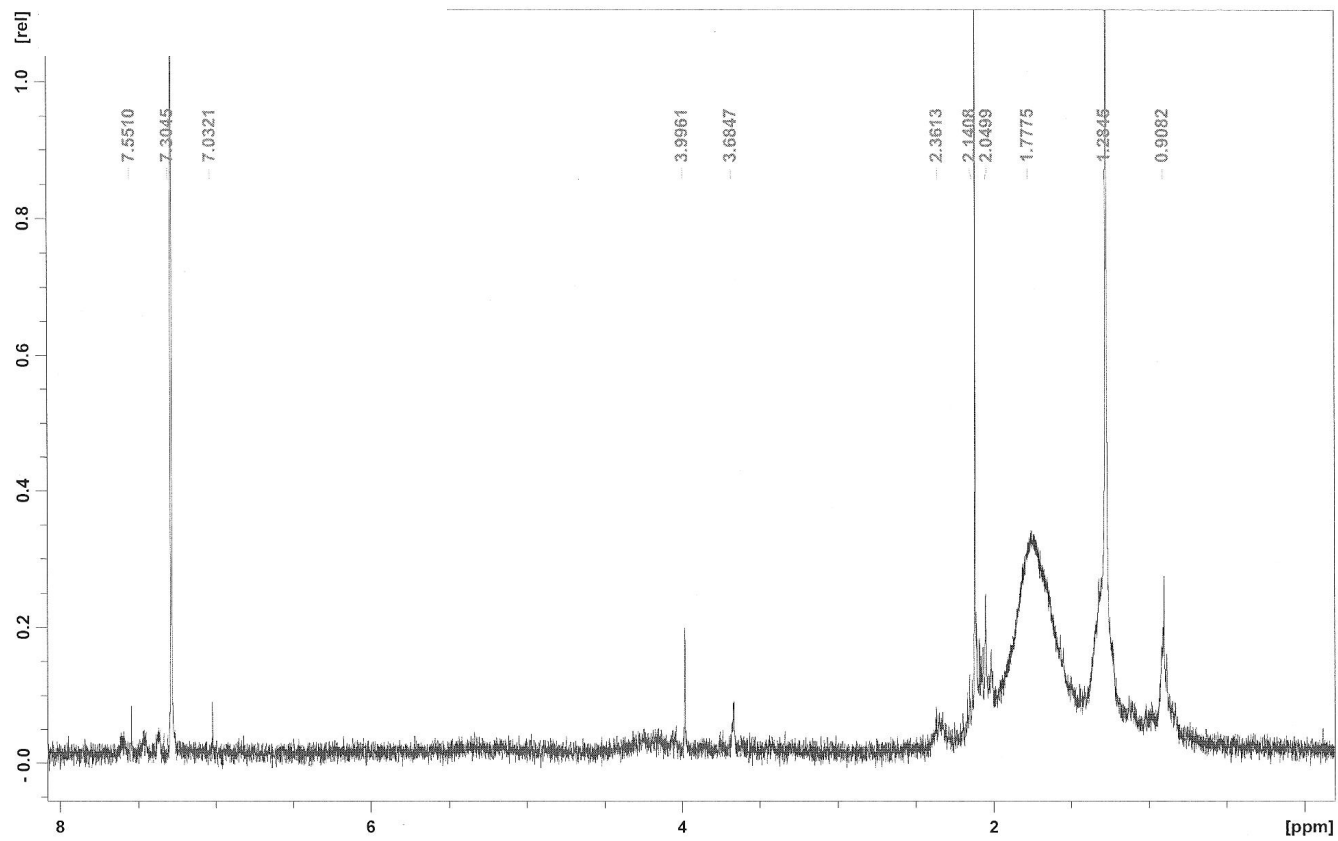


Figura 53. Espectro da RMN H do DEG1p

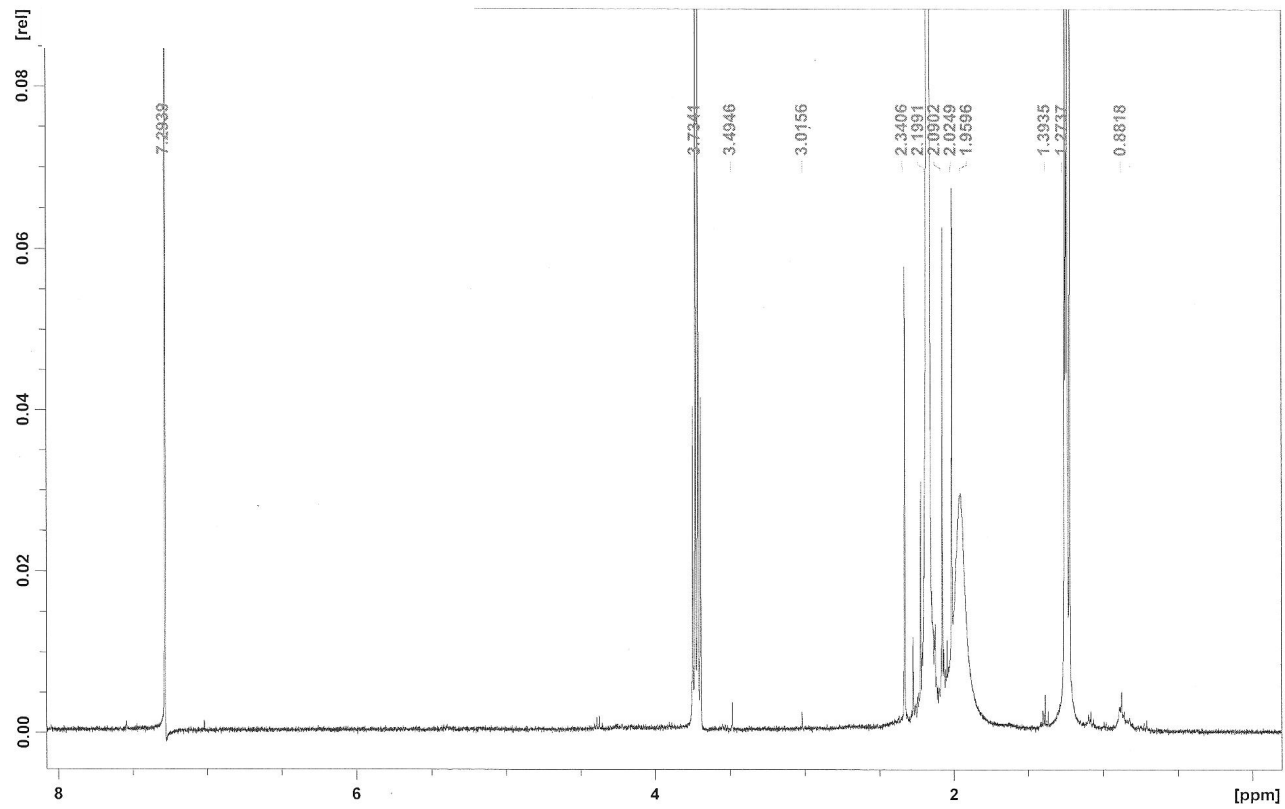


Figura 54. Espectro da RMN H do DEG2h



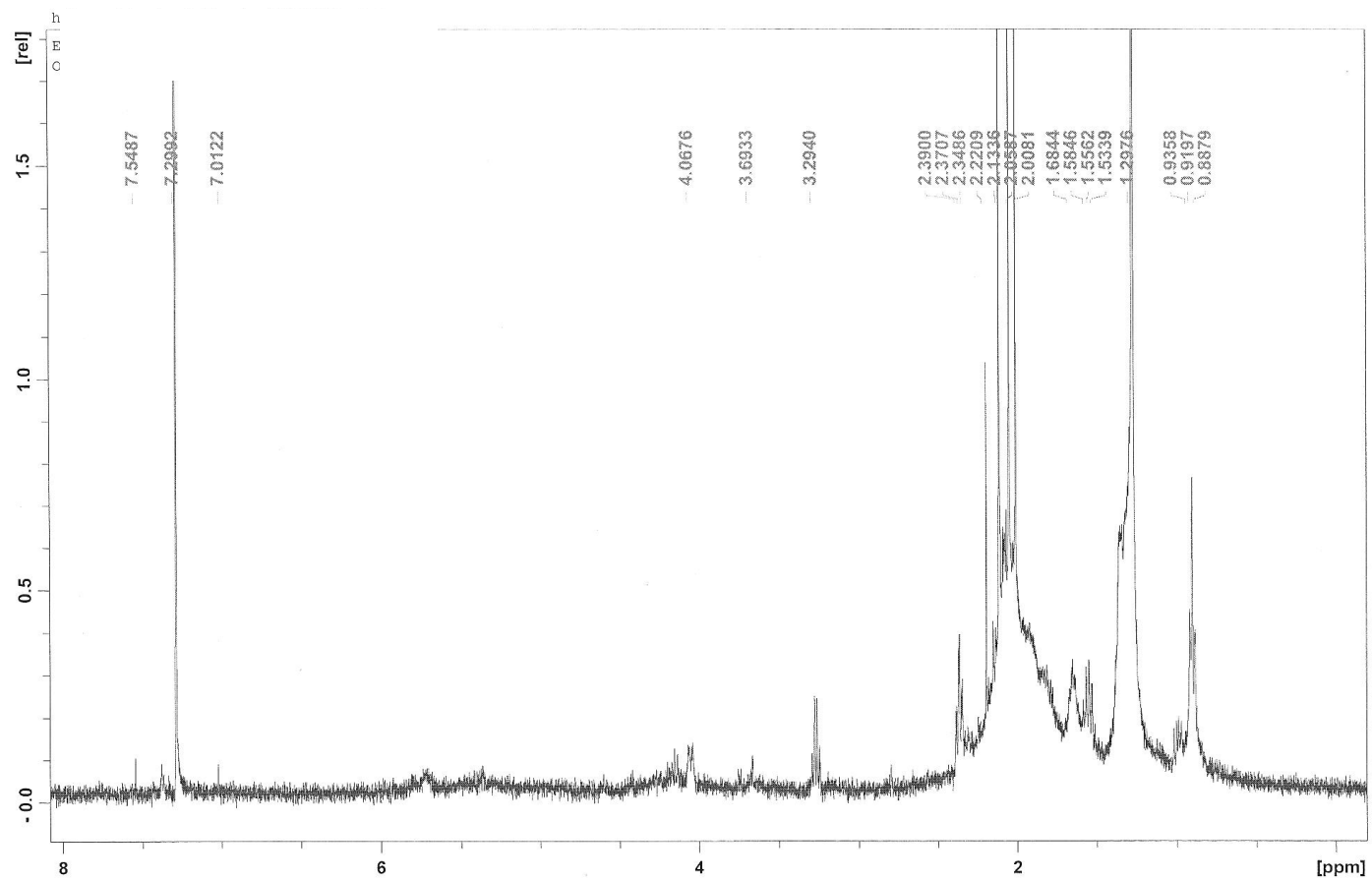


Figura 55. Espectro da RMN H do DEG2hp

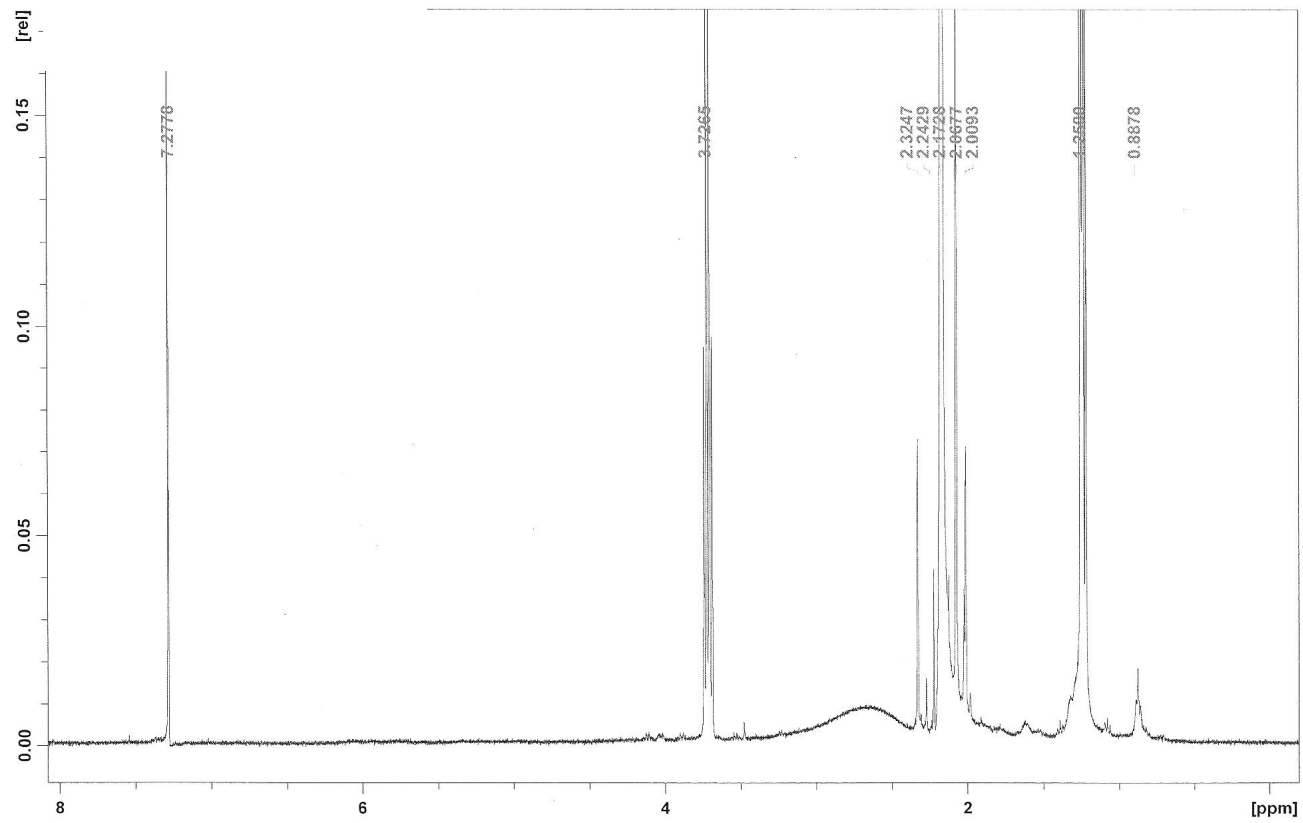


Figura 56. Espectro da RMN H do DEG2p

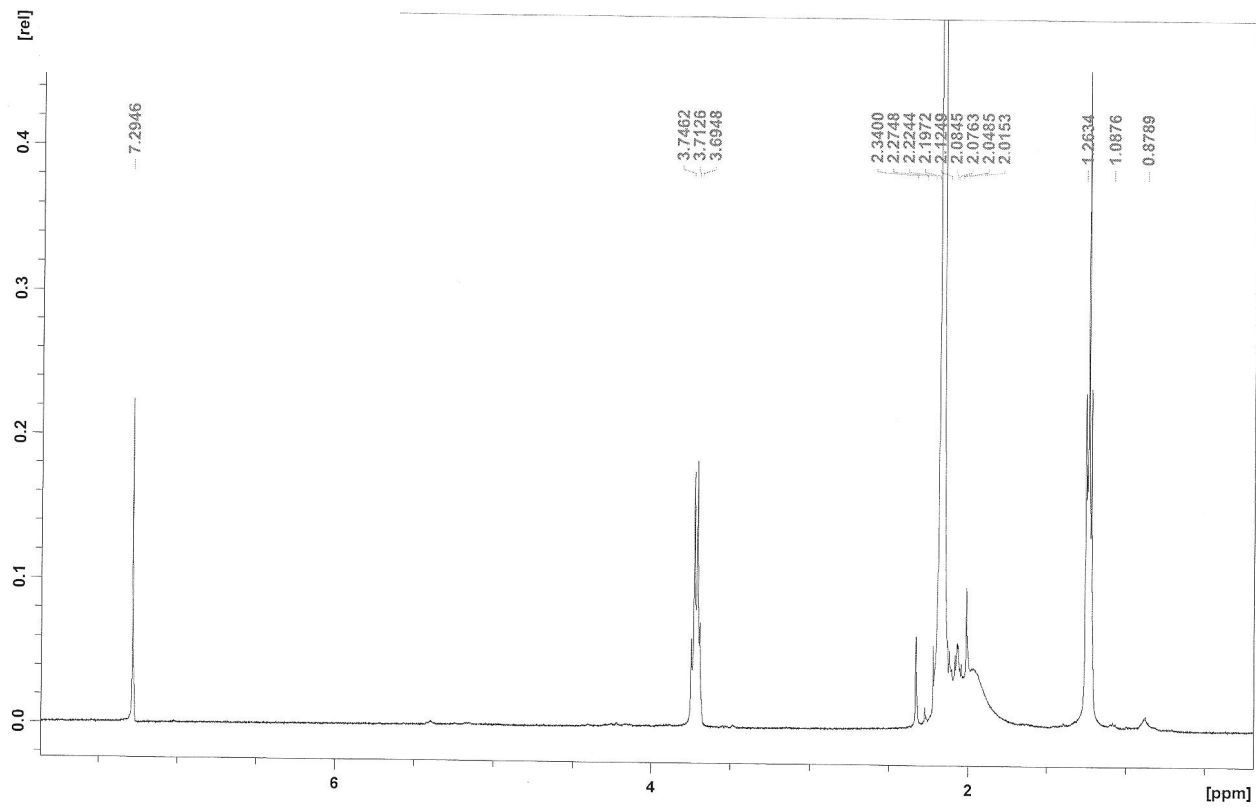


Figura 57. Espectro da RMN H do DEG3h

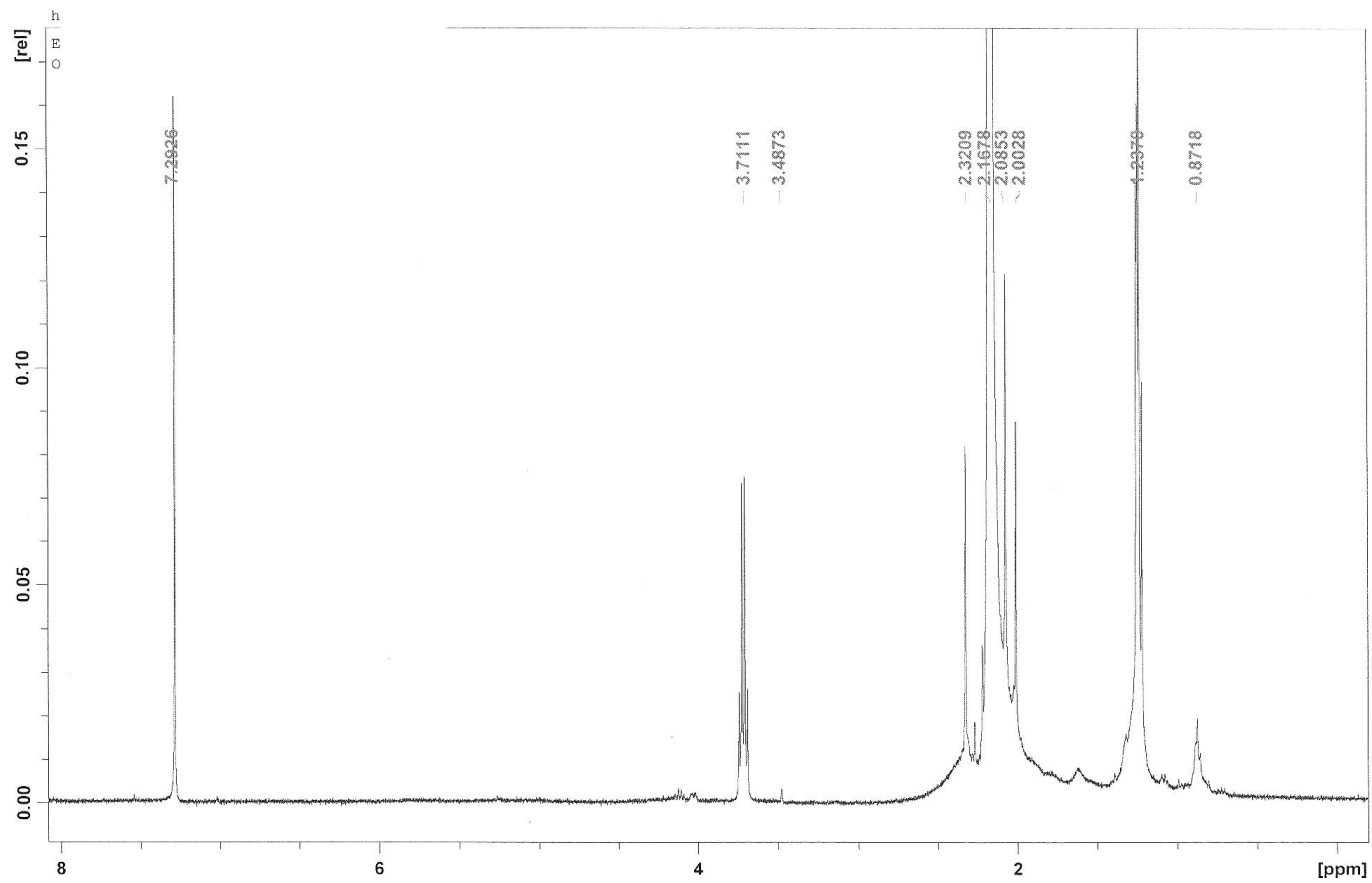


Figura 58. Espectro da RMN H do DEG3hp

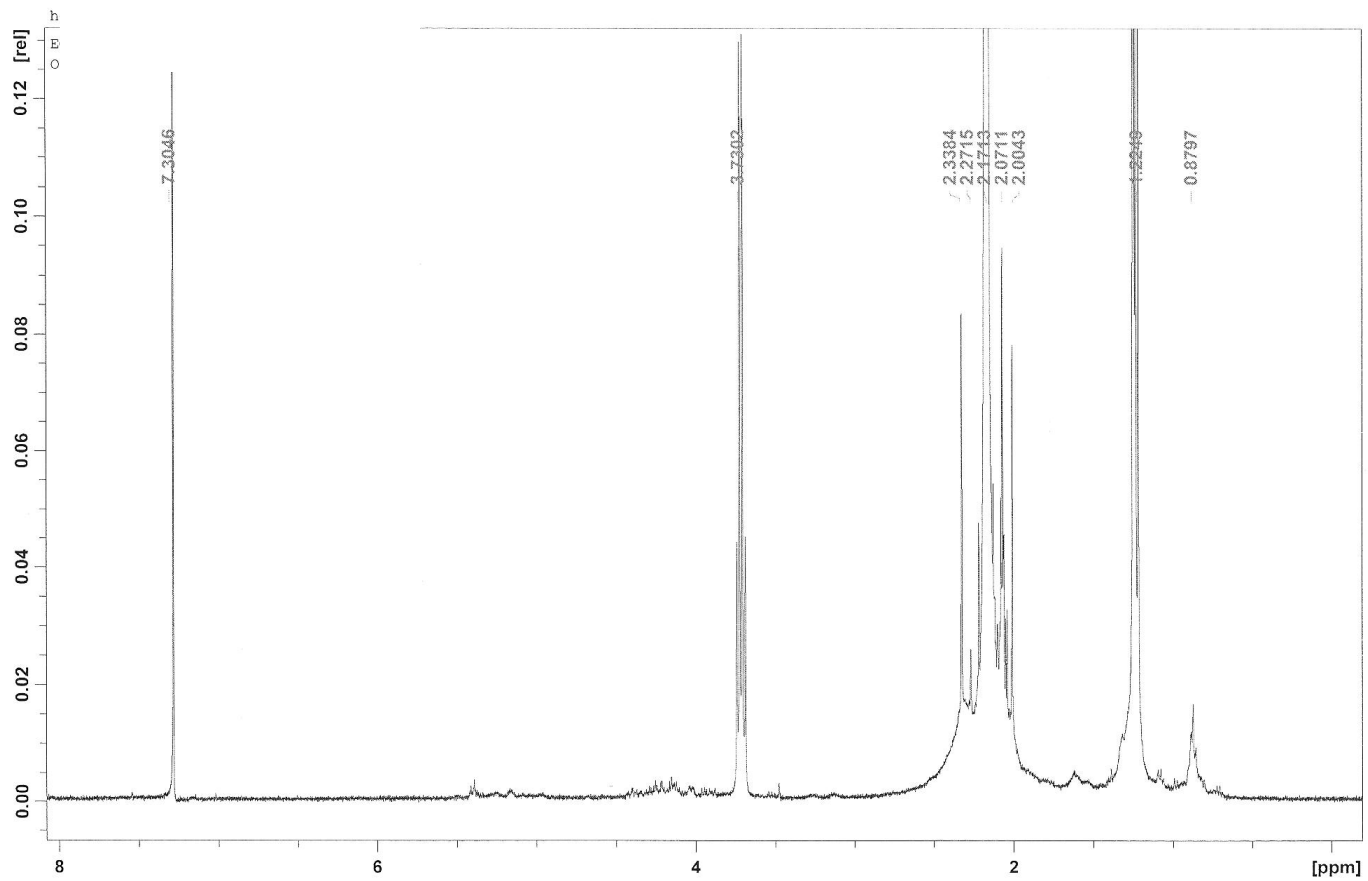


Figura 59. Espectro da RMN H do DEG3p

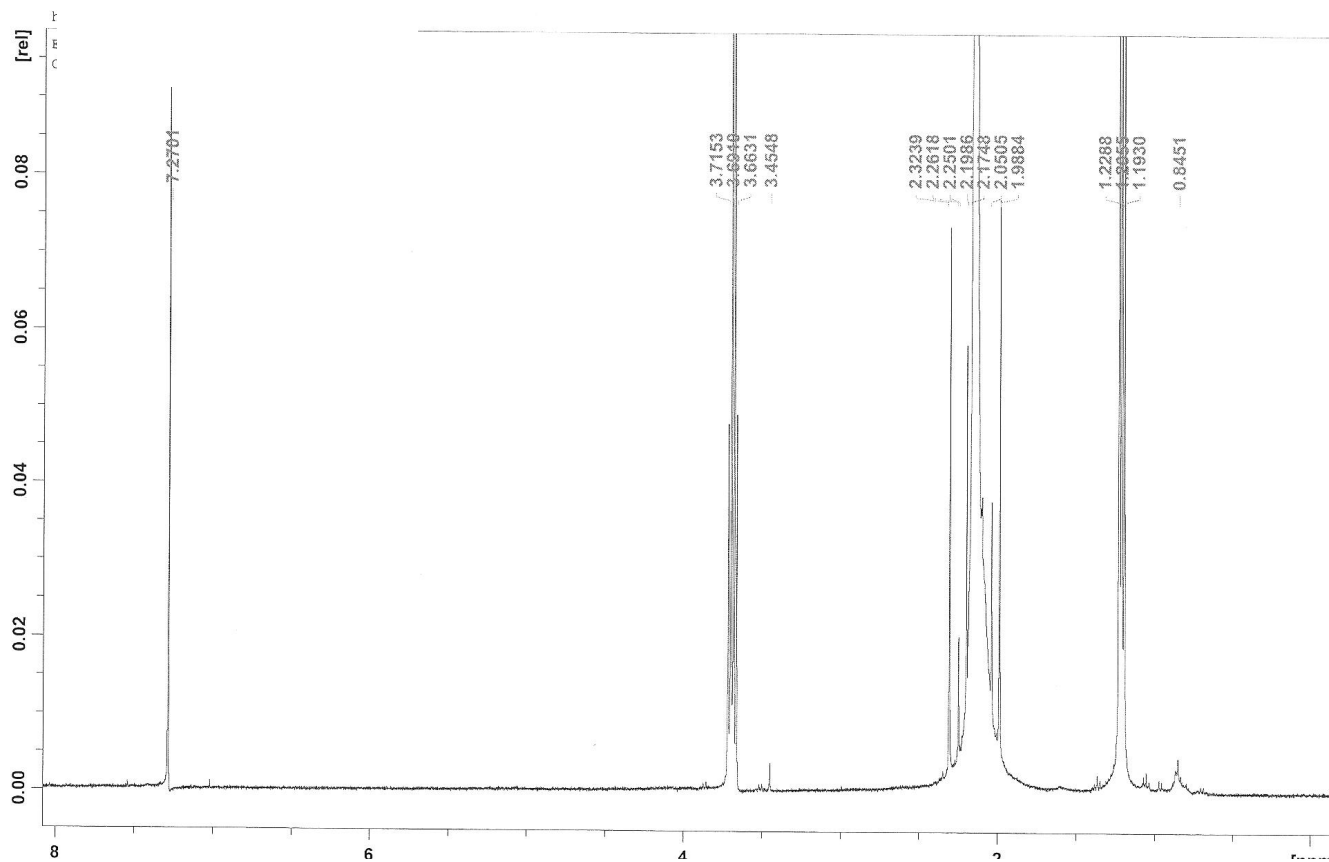
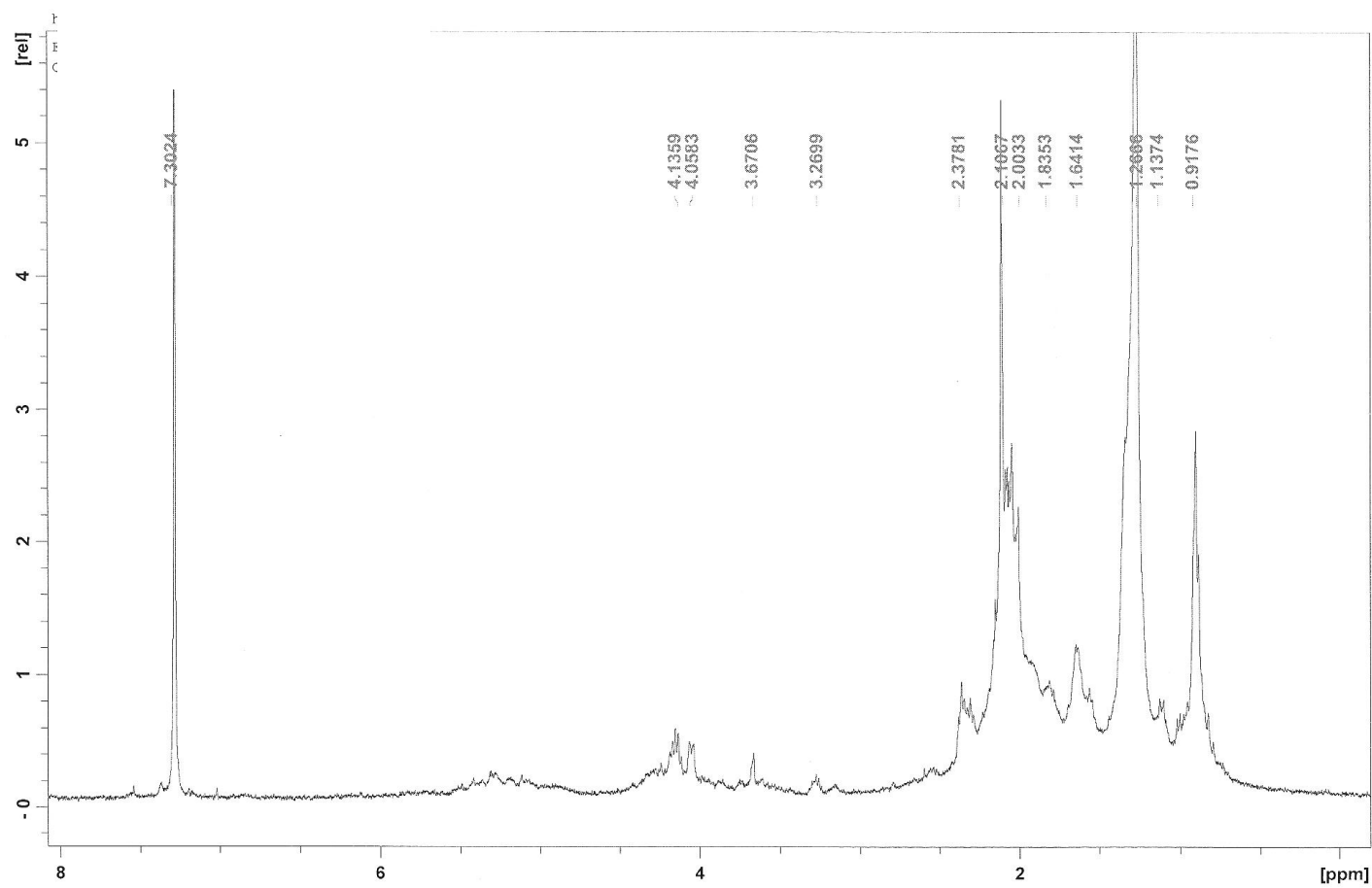


Figura 60. Espectro da RMN H do DEG4h



**Figura 61.** Espectro da RMN H do DEG4hp

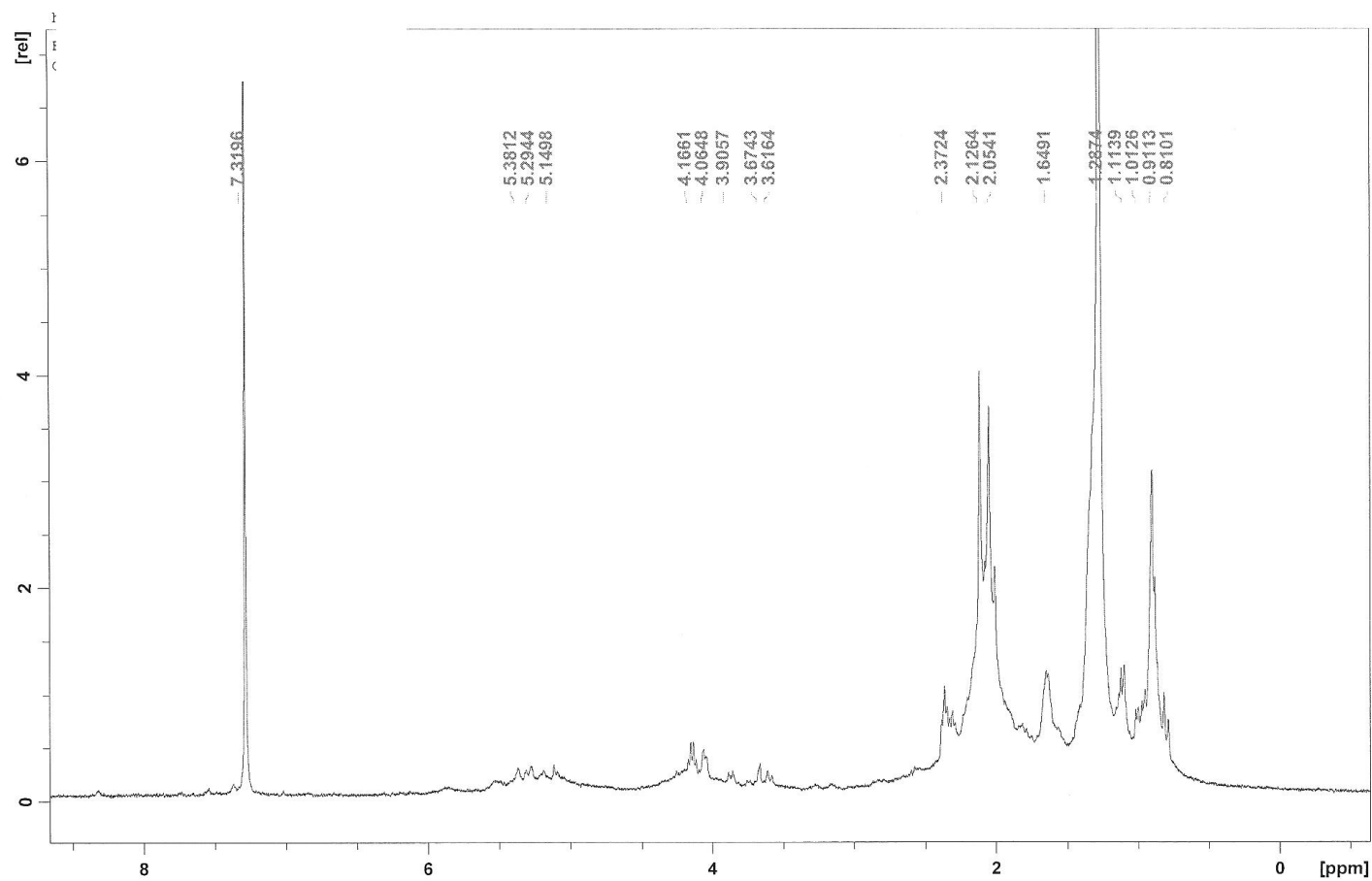


Figura 62. Espectro da RMN H do DEG4p



## ANEXO VIII. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear do $^{13}\text{C}$ da Lignina Extracelular

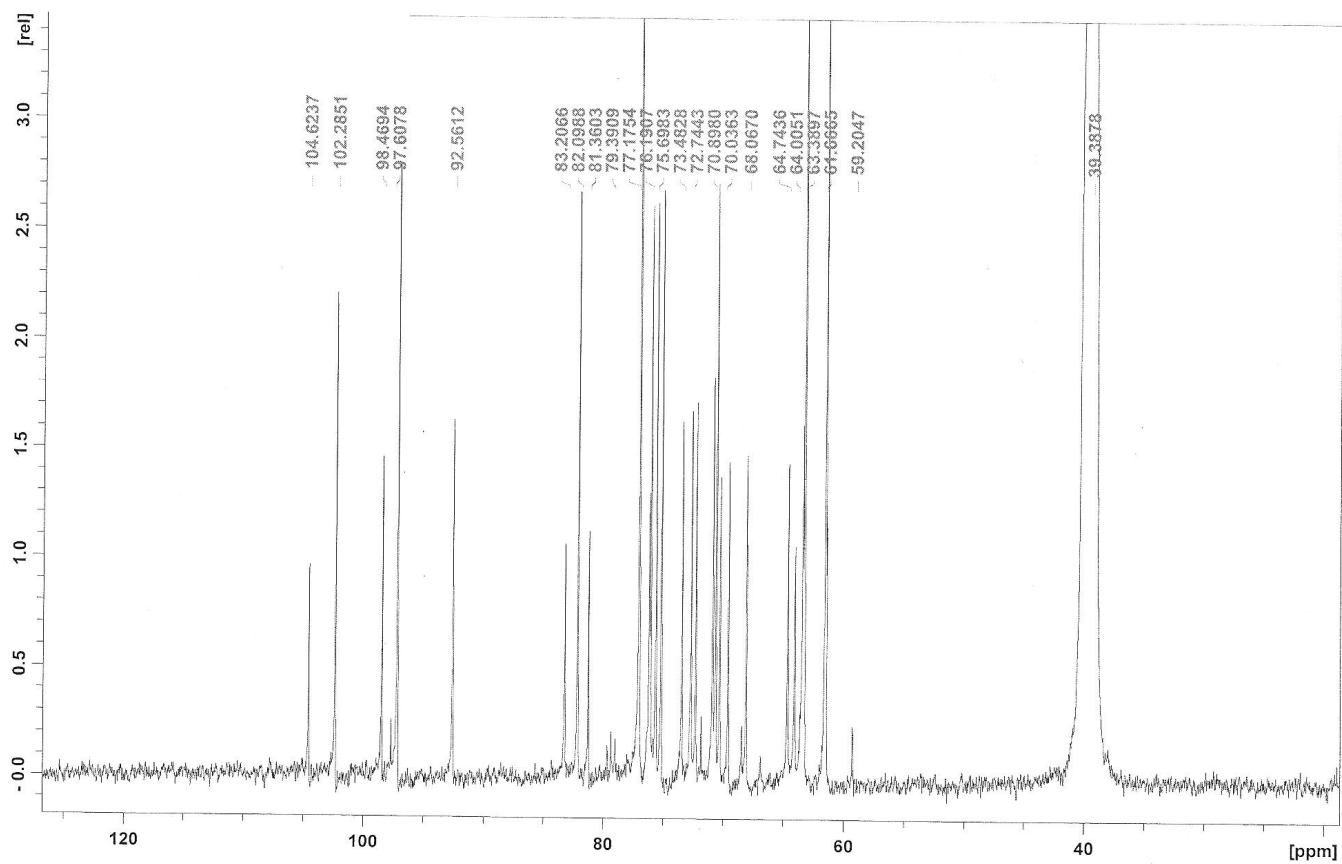
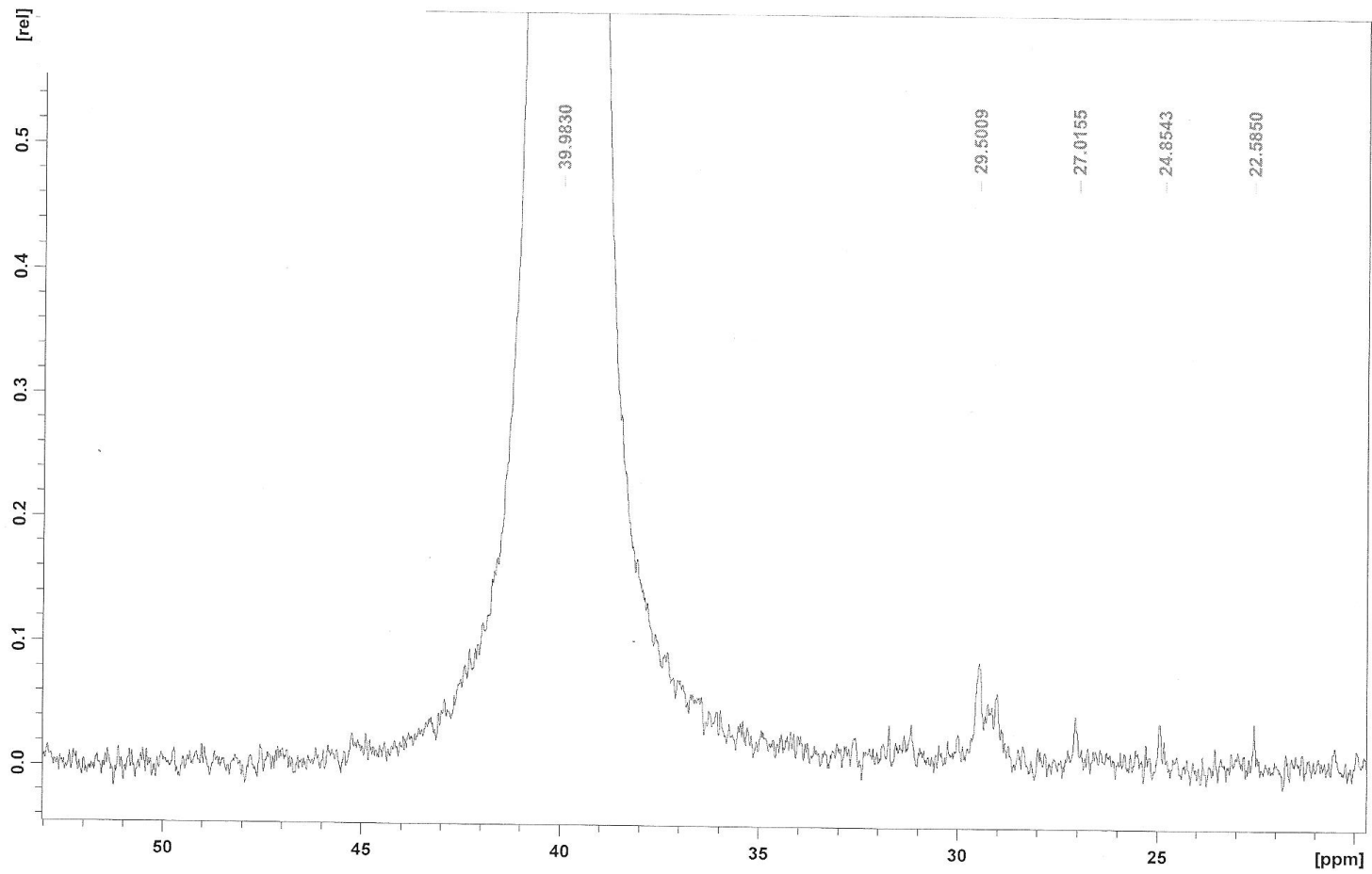
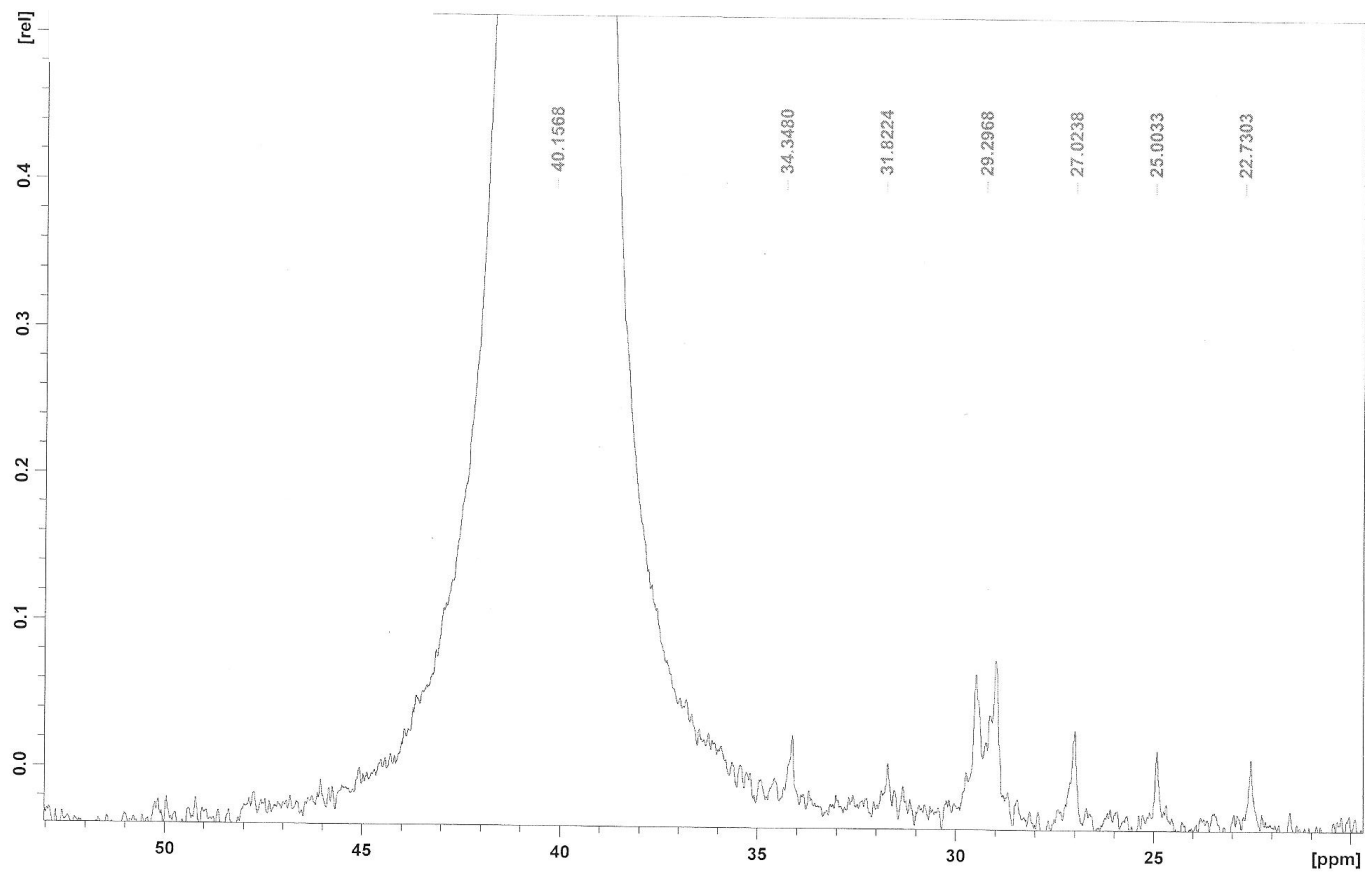


Figura 63. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  do EG1 da lignina extracelular



**Figura 64.** Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  do EG2 da lignina extracelular



**Figura 65.** Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  do EG3 da lignina extracelular

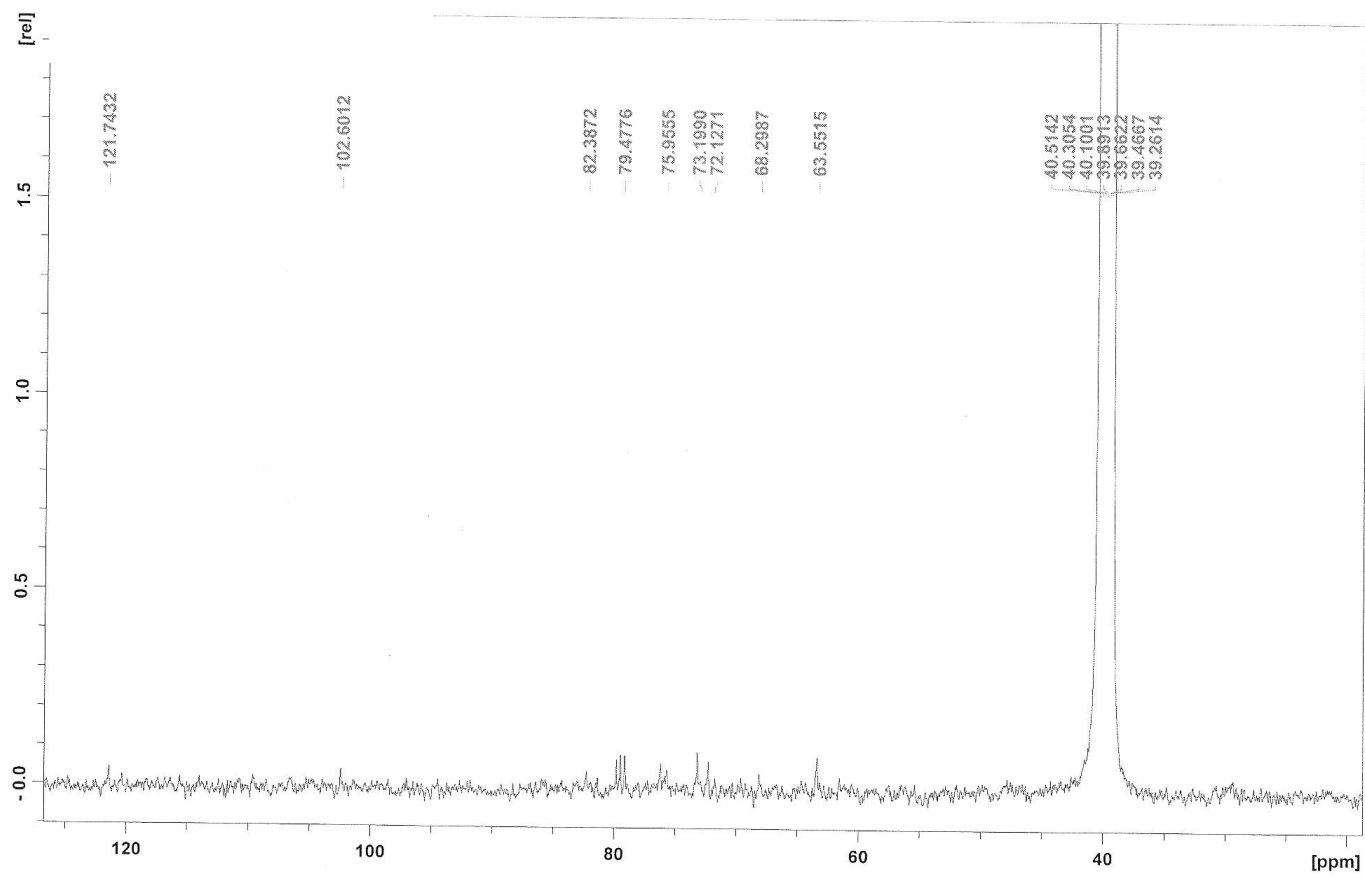


Figura 66. Espectro da RMN  $^{13}\text{C}$  do EG4e da lignina extracelular