



**CENTRO UNIVERSITÁRIO NILTON LINS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA URBANA**

**MESTRADO ACADÊMICO**

**Dissertação de mestrado**

**"IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE  
MONOTERPENOS EM PAU-ROSA (Aniba rosaeodora)"**

**ENILDA MARTA CARNEIRO DE LIMA MELLO**

**Manaus - AM**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

M476i Mello, Enilda Marta Carneiro de Lima.  
Identificação de genes envolvidos na biossíntese de  
monoterpenos em pausa-rosa. / Enilda Marta Carneiro de Lima  
Mello.- Manaus: [s.n.], 2009.  
41 f.: il.; 30 cm.

Dissertação de Conclusão de Curso (Mestrado Acadêmico  
em Biologia Urbana). Centro Universitário Nilton Lins.

1. Pau-Rosa. 2. Linalol. 3. Terpenos 4. Biotecnologia. I.  
Título. II. Centro Universitário Nilton Lins.

CDU 581

Dedico este trabalho

Ao meu marido e querido esposo,

Walter

por ter se comprometido,

com a vida.

As minhas filhas amadas

Évelin e Érika

**A Deus, toda honra e gloria,  
por me capacitar a desempenhar  
este trabalho, por Seu cuidado,  
amor, graça e misericórdia por**

**todo esse tempo que Ele tem  
cuidado de mim.**

**A Ele toda Honra!!!!**

Aos meus pais Rubem e Nona,

Pela forma com que me educaram

Permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais adotivos, Otávio e Vika,

que na hora em que eu mais precisei de uma família,

me acolheram em minha vida.

A minha querida sogra Tatinha,

por todas as orações feitas por mim.

## **Dedico este trabalho**

**Ao meu amado e querido esposo,**

**Waltinho**

**por tanta compreensão,**

**carinho e força.**

**Às minhas filhas amadas**

**Évelin e Érika**

**que sempre estiveram comigo**

**mesmo nos momentos em que estávamos**

**distantes.**

**Ao Bruno, meu genro querido,**

**obrigada por todo carinho e respeito.**

**Aos meus pais Rubem e Nena,**

**Pela forma com que me educaram**

**Permitindo que eu chegasse até aqui.**

**Aos meus pais adotivos, Otávio e Vika,**

**que na hora em que eu mais precisei de uma família,**

**pude tê-los em minha vida.**

**A minha querida sogra Taninha,**

**por todas as orações feitas por mim.**

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Antônio Serrão Contim, pelo carinho, amizade, paciência que em nenhum momento me negou conhecimentos, por ter estado ao meu lado em todo tempo da realização desta pesquisa. **MUITO OBRIGADA PROFESSOR!!!!!!**

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Sérgio Ricardo Nozawa, pelos momentos dispensados a mim para realização deste trabalho.

Ao prof. Ms. Danival Vieira de Freitas, que em todos os momentos em que foi solicitado, esteve ao meu lado me transmitindo conhecimentos.

Ao Prof. Dr. André Luis Wendt dos Santos, pela disponibilidade em sempre atender os meus chamados.

Ao prof. Dr. Carlos Gustavo Nunes, que em tão pouco tempo, cooperou muito para a realização deste trabalho estando sempre pronto para me ajudar. **Muito obrigada Professor.**

A Jorlana, que esteve presente comigo na bancada todos os dias em que foram necessários estar presente no laboratório para realizar esta pesquisa.

A todas as amigas do laboratório de biotecnologia Suelen, Perla, Grace, Sayara, pela amizade e força nos momentos difíceis.

A Gisane, por estar comigo bem no início desta pesquisa, e por motivo maior precisou se ausentar e não pode estar até o final comigo.

Aos Amigos do curso de Mestrado, Andréa, Alexandre Targino, Derlan, obrigada por todo incentivo e apoio.

**Aos meus queridos amigos e irmãos Débora e Sadon, por tanto carinho e cuidado, comigo e com a minha família durante este tempo de ausência.**

**Aos meus irmãos, que sempre torceram para que tudo desse certo.**

**Ao meu querido irmão Evaldo, por tantas palavras de incentivo, nas horas mais difíceis.**

**Em especial, aos meus pais de Manaus, Otávio e Vika, e toda sua família, por permitirem que eu tornasse parte desse clã.**

**Ao curso de Pós-Graduação por sempre me atender nos momentos em que precisei.**

**Ao Centro Universitário Nilton Lins pelos meios dispensados aos alunos desta primeira turma de mestrado.**

**Ao CNPQ, por fomentar esta pesquisa, colaborando para a realização da mesma e pela bolsa de estudo a mim proporcionada.**

**OBIGADASSSS**

## Agradecimento especial

Ao meu amado marido, Walter Pereira de Mello. Você é, e sempre será um presente de Deus em minha vida. Obrigada por me fazer acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui. Eu amo você com todas as minhas forças, os 26 anos que estamos juntos tem sido pra mim uma eterna felicidade, pois, Deus, em sua graça e misericórdia um dia o separou pra mim.

Obrigada por compreender os meus momentos de ausência sem nunca me cobrar nada, e muito pelo contrário, sempre me dava total apoio para que eu continuasse.

Amo você meu marido, só escrevendo um livro para agradecer tudo que tens feito por mim.

**OBRIGADA!!!!!!**



## SUMÁRIO

## RESUMO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 FAMÍLIA LAURACEAE.....	4
2.2. PAU-ROSA.....	5
2.3. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	9
2.4. SÍNTESE DE TERPENOS E FUNÇÕES EM PLANTAS.....	12
2.5. ENGENHARIA METABÓLICA E BIOSÍNTESE DE TERPENOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. COLETA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS EM BANCO DE DADOS.....	19
3.2. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	19
3.3. ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	19
3.4. MATERIAL VEGETAL.....	19
3.5. EXTRAÇÃO DE DNA.....	20
3.6. CONDIÇÕES DE PCR.....	21
3.7. PURIFICAÇÃO E CLONAGEM DE PRODUTOS DE PCR.....	21
3.8. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E CONFIRMAÇÃO DOS CLONES.....	22
3.9. SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	24
4.2. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA GENÔMICO E CLONAGEM MOLECULAR.....	26
4.3. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	29
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## RESUMO

O pau-rosa, *Aniba rosaeodora*, é uma espécie arbórea de grande porte, membro da família *Lauraceae*, intensamente explorada na Amazônia, devido ao alto valor comercial do seu óleo essencial rico em linalol, um monoterpene envolvido principalmente na interação planta-inseto. Os terpenos em plantas são sintetizados a partir de acetil-coenzima A, principalmente pela via do ácido mevalônico. Com o objetivo de identificar os principais componentes da biossíntese de monoterpenos em pau-rosa, oligonucleotídeos degenerados foram construídos a partir do alinhamento de seqüências disponíveis no GenBank para as enzimas Sintase do difosfato de geranyl, sintase do difosfato de geranyl-geranyl, sintase dos monoterpenos e, especificamente para a Sintase do linalol. Vinte e oito fragmentos foram amplificados a partir do DNA genômico de pau-rosa, sendo que onze destes foram clonados e sequenciados. dez seqüências dos fragmentos amplificados não apresentaram homologia significativa com nenhuma seqüência depositada no GenBank, provavelmente correspondendo a regiões de "DNA não codificante". Uma das seqüências apresentou alta identidade com genes de MAP-quinases de plantas, devido a possível homologia dos oligonucleotídeos com esta seqüência. O insucesso na identificação dos componentes da biossíntese de terpenos em pau-rosa neste trabalho pode ser atribuído à baixa conservação observada nos diversos genes da família em táxons diferentes de plantas, o que demanda a construção e o teste de um número maior de oligonucleotídeos em trabalhos futuros.

## ABSTRACT

The wood-rose *Aniba rosaeodora*, is an tree specie of large volume, member of the *Lauraceae* family, intensively explored in the Amazon due its high commercial value of rich linalol oil, a monoterpeno highly engaged in plant-insect interaction. The plants feathers are synthesized from the acetil-coenzime A, mainly through the mevalonic acid. With the objective of identifying the principle components of the monoterpene biosynthesis in the wood-rose, degenerates primers were built from the sequence of alignments available in the Gene bank for the enzyme geranyl-diphosphate sinthase, geranyl-geranyl-diphosphate sinthase, monoterpene sinthase and specifically for the linalool sinthase. Twenty nine fragments of the wood-rose genomic DNA were amplified, of which eleven were cloned and sequenced. Ten of the amplified fragments did not show any significant homology with no sequence in the Gene Bank, possibly corresponding to the regions of "DNA not coded". One of the sequences was highly identifiable with the MAP-cinase of the plant, due to a high homology of primers. Due to the failure of identifying the components of the biosynthesis of feathers in the wood-rose, this can be attributed to the low conservation of the diverse genes in the family in different parts of the plant, therefore demanding a higher build up in numbers of primers in future tests.

**ENILDA MARTA CARNEIRO DE LIMA MELLO**

**“IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE  
MONOTERPENOS PAU-ROSA (ANIBA ROSAEODORA)”**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biologia  
Urbana, do Centro Universitário Nilton  
Lins, para obtenção do título de mestre  
no curso de Mestrado Acadêmico em  
Biologia Urbana, sob orientação do  
Prof. Luis Antônio Serrão Contim.

**MANAUS, AM**

**2008**

## 1. INTRODUÇÃO

A Amazônia representa o maior patrimônio de biodiversidade conhecida do planeta. Ocupa grande parte hemisfério setentrional da América do Sul, correspondendo a 42% do território brasileiro. Estende-se das margens do Oceano Atlântico no leste, até o sopé da Cordilheira dos Andes no oeste. Espalham-se pelas Guianas, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia, perfazendo mais de 6 milhões de km<sup>2</sup> (Ab'saber, 2002).

Apesar de considerada o mais rico reservatório da diversidade biológica do planeta, a Amazônia tem sofrido constantes incursões que visam a bioprospecção ilegal de sua biodiversidade. Podemos observar ainda, nesta região, um franco processo de desmatamento, ameaçando um número inestimável de espécies à extinção, provocado principalmente pela exploração florestal desordenada e pela carência de tecnologia e fiscalização. Várias espécies arbóreas de grande importância para a região amazônica estão em processo de extinção ou já foram, praticamente, extintas (Rosa *et al.*, 1997). O pau-rosa, *Aniba rosaeodora* Ducke var. *amazônica* Ducke, sinônimo *Aniba duckei* Kostermans, é um membro da família *Lauraceae*, intensamente explorada, principalmente entre as décadas de 1960 e 1980 (May & Barata, 2004). O pequeno número de indivíduos remanescentes da espécie limita as fontes de variabilidade genética para serem utilizadas em programas de seleção e melhoramento genético. As informações disponíveis sobre a estrutura genética da espécie e sua diversidade são raras (Contim *et al.*, 2005). Dentre estas espécies ameaçadas estão alguns membros do gênero *Aniba*, espécies com alto valor econômico e grande importância ecológica.

O pau-rosa se destaca por seu alto valor econômico e aplicação de seu óleo essencial à indústria de cosméticos. Outras espécies relacionadas também são erroneamente chamadas de pau-rosa, como a *A. canelilla* (casca preciosa) e a *A. riparia*, também de grande importância econômica. As espécies aromáticas e as que produzem óleos essenciais alcançam alto valor no mercado, pois são fontes de matérias-primas para alguns setores industriais, constituído em grande parte de linalol, um monoterpene utilizado principalmente como fixador de perfumes finos na indústria de cosméticos (Alencar & Fernandes, 1978).

A cadeia de exploração de pau-rosa inicia-se com a identificação e o corte das árvores na floresta, feita pelos próprios ribeirinhos. Os troncos, donde tradicionalmente é extraído o óleo, são transportados até as destilarias, onde são moídos e processados. Deste modo, esta tecnologia antiga e destrutiva de exploração contribuiu de modo decisivo para o desaparecimento da espécie de grandes áreas da floresta. Há muito já é sabido que a maior concentração de óleo está presente nas folhas e ramos juvenis, 2,4%, em contraste com baixas concentrações encontradas na madeira, 1,1% (Araújo *et al.*, 1971). Uma tonelada de folhas e galhos jovens produz aproximadamente 24 litros de óleo essencial, enquanto que uma tonelada de madeira produz somente de 9 a 12 litros de óleo (Alencar e Fernandes, 1978; Prance, 1987).

O Óleo essencial de pau-rosa apresenta alta complexidade química, rico em terpenos, principalmente o linalol, um monoterpeneo tradicionalmente utilizado como fixador de perfumes finos, além de outros terpenos como o  $\alpha$ -terpineol, o 1,8-cineol e o  $\alpha$ -pineno. O linalol tem um centro quiral no C<sub>3</sub> e é encontrado em duas formas enantioméricas na natureza: S-linalol e L-linalol (Siani *et al.*, 2002). Cada enantiômero provoca respostas neurais diferentes em humanos, e são classificados com propriedades olfativas distintas (Sugawara *et al.*, 2000). Adicionalmente as indústrias químicas e farmacêuticas também têm mostrado interesse pelo óleo essencial de pau-rosa, devido principalmente às suas características anestésica (Ghelardini *et al.*, 1999), antimicrobiana (Inouye *et al.* 2001; Rosa *et al.*, 2003) e fungicida (Simic, 2004).

Os Óleos essenciais têm sua estrutura química composta por elementos básicos como o carbono, oxigênio e hidrogênio, sua classificação química é difícil, tendo em vista serem formadas por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis e outras. A grande maioria, no entanto, é constituído de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, preponderando os últimos. Nas espécies vegetais, os óleos apresentam-se em misturas de diferentes concentrações, tendo, normalmente um composto majoritário (Cardoso, 2002).

Os monoterpeneos têm sido avaliados no controle de várias espécies de insetos-praga de grãos armazenados, apresentando ações de contato, ingestão, ovicida, fumegante e repelente, além de afetarem a biologia reprodutiva dos insetos (Karr & Coats, 1988; Rice & Coats, 1994; Lee *et al.*,

2003). Muitos sesquiterpenóides também são voláteis e, assim como os monoterpenos, estão envolvidos na defesa contra pragas e doenças. Dois exemplos são o gossipol (dímero de C15), o qual está associado à resistência a pragas em algumas variedades de algodão, e as lactonas, presentes na família Compositae e responsáveis pelo gosto amargo de suas folhas. Alguns sesquiterpenos são considerados fitoalexinas, como a rishitina de tomateiro. Contudo, a maior parte das fitoalexinas é na verdade um composto fenólico (isoflavonóides) (Peres, 2002).

A quantidade tanto como a qualidade e a composição enantiomérica particular contribuem para a atividade biológica da mistura de terpenos na proteção contra patógenos e herbívoros potenciais (Martin *et al.*, 2003). Em milho, o ataque de insetos herbívoros induz a síntese de  $\beta$ -farneseno,  $\alpha$ -bergamoteno, e mais sete sesquiterpenos em uma proporção relativa fixa, atraindo parasitóides e fornecendo um sistema eficiente de controle biológico natural (Schnee *et al.*, 2006).

Deste modo, a identificação dos componentes da biossíntese de terpenos em pau-rosa pode auxiliar no entendimento desta rota biossintética na espécie e fornecer possíveis ferramentas de interesse biotecnológico.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Família Lauraceae

Muitas espécies vegetais são consideradas aromáticas e utilizadas em diversas atividades econômicas, como alimentação, perfumaria, decoração e medicina. Apesar de poucos produtos fazerem parte da pauta comercial de exportação, devido ao alto valor econômico, a procura por essas espécies tem aumentado e colocado algumas sob risco de extinção, entre elas alguns membros da família Lauraceae, como é o caso do pau-rosa e de outras famílias, como a copaíba (*Copaifera ducke*, *C. reticulata* e *C. multijuga*). (Martins & Santos, 1995).

A família Lauraceae é considerada uma das famílias mais primitivas de plantas superiores pertencentes à divisão Magnoliophyta (Cronquist, 1988). Suas características anatômicas e morfológicas incluem flores e sementes grandes, em pequeno número por árvore, caracterizando uma baixa eficiência reprodutiva. (Barros *et al.* 2000). Possuem distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo, especialmente nas florestas centro e sul-americanas, a qual é representada por 49 gêneros, dentre eles o gênero *Aniba*, e 2.500 - 3.000 espécies (Werff & Richter, 1996). A grande maioria das espécies é constituída por plantas arbóreas de grande porte, de alto valor econômico e produtoras de óleos essenciais.

As espécies da família Lauraceae apresentam características morfológicas marcantes: porte geralmente arbóreo ou arbustivo, raramente lianescente; folhas alternas, inteiras, penínervas ou 3-5 nervas, glabras ou pilosas; inflorescências paniculadas e fruto do tipo baga, drupa ou núcula (Barroso *et al.*, 1999; 2002). A família destaca-se pelo grande número de espécies economicamente importantes, entre as quais podem ser mencionadas *Aniba rosaeodora* Ducke e *Sassafrás albidum* (Nutt.) Nees, por seu uso em perfumaria e na indústria farmacêutica.

Na medicina popular, a família Lauraceae apresenta utilização variada contra diversas doenças. As principais espécies da família Lauraceae são constituídas por cerca de 30 gêneros, com distribuição marcadamente tropical



e subtropical em todo o mundo, especialmente nas florestas centro e sul-americanas e, em sua maioria por espécies lenhosas arbóreas (Joly 1966). Possui considerável importância econômica, pois suas madeiras são usadas em construções leves e pesadas e em móveis de luxo; algumas são frutíferas, oleaginosas, fornecedoras de óleos essenciais e condimentos, além de muitas outras serem usadas na medicina popular, destacando-se o gênero *Aniba* (INPA, 1991; Moura, 1993; Rizzini & Mors 1995; Berg, 1993; Brito & Brito, 1993).

As aproximadamente 40 espécies de *Aniba* ocorrentes no Brasil podem ser divididas em 3 grupos, de acordo com a natureza química do constituinte predominante no óleo essencial: o grupo do linalol (*A. rosaeodora*); o grupo do benzoato (*A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri* (Meiss.) Mez, *A. burchelli* Kostermans., *A. parviflora*, *A. permolis* (Nees) Mez, *A. guianensis* (Aubl.) e o grupo do alibenzeno (*A. canellita*, *A. hostmanniana* (Nees) Mez, *A. pseudocoto* (Reesby) Kosterm.) (Moraes *et al.*, 1972; Gottlieb *et al.*, 1981). Alvarenga *et al.* (1977) afirmam que *A. burchelli* apresenta, além do benzoato de benzila, alto teor de alibenzenos e até um propenilbenzeno. Cabe ressaltar que o Benzoato de benzila foi anteriormente localizado em *Cinnamomum zeylanicum* (Gottlieb, 1972) e *Ocotea teleiandra*. *Sassafrás albidum* Nutt é uma espécie típica da América do Norte, muito utilizada na indústria farmacêutica, em perfumaria e também na indústria química, tendo como componente principal do safrol.

O pau-rosa, *Aniba rosaeodora* (Lauraceae), é uma espécie nativa da Amazônia. O óleo essencial é volátil (óleo de pau-rosa) e de grande interesse econômico, pois é tradicionalmente extraído da madeira e amplamente utilizado pelas indústrias de perfumaria e cosméticos. A derrubada sistemática das árvores da floresta nativa tem conduzido à diminuição acentuada do número de indivíduos nas populações naturais (May & Barata, 2004).

## **2.2. Pau rosa**

O pau-rosa é uma espécie arbórea de grande porte, chegando a 30 metros de altura, reproduzem-se por alogamia, com ciclos de floração bastante irregulares, produzindo em torno de apenas 400 sementes por florada. Somado

a este fato, esta espécie possui padrão irregular de frutificação e, quando frutifica, os seus frutos são consumidos por animais. (Spironelo, 2003). Deste modo possui baixa capacidade reprodutiva, o que limita de forma marcante seu poder de regenerar as populações naturais dizimadas pela ação antrópica. O pau-rosa (*Aniba rosaeodora*) apresenta um significativo valor econômico na região amazônica, usado desde o século passado para extração do óleo essencial, empregado como fixador de perfumes finos pela indústria de perfumaria. Devido ao processo tradicional de exploração da espécie, que consiste no corte raso de árvores adultas, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), por meio da Portaria N.37-N, de 3 de abril de 1.992, considerou a espécie ameaçada de extinção, justificado pela redução de suas populações naturais (Handa *et al.*, 2002, Spironello *et al.*, 2004).

A constituição do óleo essencial é basicamente de origem terpênica, com presença de alfa-terpineol além do linalol (Alencar & Fernandes, 1978). O linalol é uma substância caracterizada pelo forte odor, é incolor e com densidade inferior à da água, sendo geralmente solúvel em solventes orgânicos usuais e em álcool 70% (Azeredo, 1958). O rendimento do óleo depende do tempo transcorrido entre a coleta e a destilação, da procedência da árvore, da variedade das subespécies, de questões sazonais, geológicas, etc. (Cunha, 2002).

Adicionalmente, as indústrias químicas e farmacêuticas também têm mostrado interesse pelo óleo essencial de pau-rosa, principalmente pelas características anestésicas (Ghelardini *et al.*, 1999), antimicrobianas, pela inibição da difusão de colônias de bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococo spp*, e bactérias gram-negativas *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli* (Mazzandi *et al.*, 1997; Inouye *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2003), assim como atividade fungicida (Simic, 2004).

A espécie foi altamente explorada entre as décadas de 1960 a 1980, com queda gradativa de produção nos anos subseqüentes devido à drástica redução das populações nativas pela exploração desordenada (May & Barata, 2004). Apesar da baixa produção na atualidade, o óleo essencial de pau-rosa ainda é muito demandado pela indústria de cosméticos, mesmo após o desenvolvimento do linalol sintético pela indústria química. A substância

sintética não substituiu por completo o óleo essencial de pau-rosa, principalmente para os perfumes mais finos, devido ao seu *bouquet* de óleos de alta complexidade, cujo linalol sintético não apresenta (May & Barata, 2004).

O processo de esgotamento dos estoques de pau-rosa fez com que o IBAMA editasse a Portaria 01/98, em 18 de agosto de 1998, regulamentando a exploração, industrialização e comercialização do pau-rosa, no Estado do Amazonas (Brasil, 1998). Esta Portaria estabeleceu o abate de árvores com DAP superior a 20 cm e o plantio de 4 árvores por metro cúbico de matéria prima (madeira) explorada em 1998, de 8 árvores a partir de 1999 e, a partir de maio de 2000; as empresas que industrializam pau-rosa deverão ter implantados plantios equivalentes ao consumo anual. Atualmente, estima-se que existem cerca de 40 mil mudas de pau-rosa plantadas no Estado do Amazonas. Adicionalmente, para evitar a extinção da espécie, atualmente existe um esforço de instituições de pesquisa e ensino para gerar informações técnicas sobre os óleos voláteis de pau-rosa, provenientes dos galhos finos e folhas (Maia et al.2001). Bem como outras fontes vegetais desse óleo.

Devido a este processo contínuo de grande pressão de exploração, as populações naturais de pau-rosa foram praticamente dizimadas na floresta Amazônica, existindo um pequeno número de indivíduos remanescentes, principalmente em reservas florestais. Este pequeno número de indivíduos limita as fontes de variabilidade genética da espécie para serem utilizadas em programas de seleção e melhoramento genético. As informações disponíveis sobre a estrutura genética da espécie e sua diversidade são raras. Contim *et al.* (2005) determinaram que o genoma de pau-rosa é representado por aproximadamente  $2.3 \times 10^9$  pares de bases, distribuídos em 12 pares de cromossomos, número conservado para a maioria das espécies da família *Lauraceae*. Santos (2004) encontrou níveis significativos de variabilidade genética entre os indivíduos que compõem a população da Reserva Adolpho Ducke. Adicionalmente, informações coletadas com pesquisadores e técnicos de campo em reservas florestais indicam a existência de três grupos de indivíduos (ecotipos), que seriam fenotipicamente distintos, devido tanto a alterações fisiológicas, na morfologia de alguns órgãos e quanto ao teor de óleo. Deste modo, os possíveis grupos de indivíduos são identificados como “Mulatinho”, “Preciosa” e “Itaúba”, respectivamente, do grupo com maior ao

com menor teor de óleo (Bastos, 1943), mas nenhum estudo confirmou esta hipótese até hoje. Outra limitação para a implantação do plantio, reposição das reservas naturais e exploração da espécie em modelos extrativistas racionais são as limitações naturais de reprodução da espécie. O pau-rosa se propaga naturalmente por sementes, que são severamente predadas por pássaros e insetos antes da maturação (Magalhães e Alencar, 1979) e por roedores após a maturação (Spironello *et al.*, 2004). Uma árvore em frutificação produz aproximadamente 400 frutos, porém apenas poucas sementes podem ser coletadas, germinando entre 60 e 120 dias após o plantio, sendo que a porcentagem de germinação varia entre 37 a 91% (Alencar e Fernandes, 1978; Loureiro *et al.*, 1979). A propagação vegetativa por estaquia também é limitada, estudos revelaram que o índice de sobrevivência de estacas de pau-rosa é de 50% a 70%, quando obtidas de ramos juvenis, mas há pouca disponibilidade de matrizes para a produção de mudas em grande escala (Sampaio, 1987, Freitas 2005).

Mais de 30 anos após a publicação do trabalho de Araújo *et al.* (1971), o qual relata a possibilidade de obtenção do óleo essencial das folhas, o pau-rosa tem se tornado cada vez mais raro em muitas áreas da Amazônia devido à coleta destrutiva de sua madeira. Este valioso recurso natural merece um manejo intensivo em lugar de sua total extinção. A opção pela poda da copa das árvores de pau-rosa nos plantios da Reserva Ducke, em Manaus, levou em consideração a capacidade de rebrota de árvores adultas (Sampaio, 1987), a produtividade de óleo a partir de galhos (2,4%), folhas (1,6%) e troncos (1,2 %) (Gottlieb *et al.* 1964). Estudos mais recentes, como os de Chaar (2000) e Oashi *et al.* (1997), também indicam que folhas e galhos finos produzem mais óleo que o lenho e, ressaltam que o rendimento de óleo na região de Manaus, é maior na estação seca. (Sampaio *et al.*, 2005).

A extração do óleo essencial de pau-rosa representa uma importante atividade econômica para a Amazônia, à custa da extração seletiva de ~ 4.000 árvores/ano, contribuindo para a devastação das populações nativas. Cabe salientar, que o óleo de pau-rosa já chegou a ocupar o terceiro lugar Na pauta de exportação da região Amazônica, cabendo a borracha e à castanha, o primeiro e segundo lugares, respectivamente (Marques 2001).

Como na situação atual após 36 anos do plantio, a copa das árvores de pau-rosa na reserva Ducke, representa apenas 14,5% do peso total da árvore é visível que árvores de outras espécies florestais deixadas nas parcelas de pau-rosa para sombreamento parcial dos plantios em 1968 na reserva Ducke, deveriam ter sido desbastadas progressivamente, diminuindo a competição por luz, água e nutrientes, fato que possibilitaria maior biomassa de galhos e folhas das árvores de pau-rosa. Assim, tratos silviculturais simples, como limpezas, adubação e podas periódicas certamente contribuiriam para maximizar a produtividade de biomassa de galhos e folhas destes plantios. Atualmente, os extrativistas de óleo de pau-rosa, são obrigados pelo IBAMA, a fazer a reposição de 80 mudas para cada tambor de 180 kg exportado. Este fato aumentou a demanda por mudas e sementes desta espécie na Amazônia central (Spironello, 2005). A quantificação da biomassa de galhos e folhas de pau-rosa será um instrumento útil na avaliação da produtividade de óleo desta espécie. A indústria de óleos aromáticos está novamente em expansão no Amazonas e demandam produtos com qualidade que atendam às exigências do mercado. O uso de técnicas de manejo que aliem incremento da biomassa aérea (galhos e folhas) aos menores custos, estimulará os produtores a investirem em plantios comerciais. Entretanto, para a implementação de plantios *ex situ*, é necessário conhecimentos sobre a auto-ecologia da espécie. (Mudas de pau-rosa apresentam maior crescimento e sobrevivência em ambientes parcialmente sombreados como os de clareiras naturais e artificiais) (Useche, 2003).

### **2.3. Óleos essenciais.**

Os óleos essenciais são substâncias voláteis extraídas de plantas, conhecidas como aromáticos amplamente utilizados na indústria de cosméticos, farmacêutica, alimentícia e de produtos de higiene (Cardoso 2002). Óleo essencial é um termo que designa substâncias aromáticas, geralmente de odor agradável e intenso, na maioria em forma líquida, encontradas em diferentes órgãos vegetais, são solúveis em solventes polares, por exemplo, óleos fixos e com solubilidade limitada em água, por isso as águas aromáticas

(hidrolatos) apresentam o aroma da essência. Evaporaram rapidamente, quando expostos ao ar à temperatura ambiente, por isso também são chamados de óleos voláteis ou etéreos. Apresentam sabor acre (ácido) e picante; quando extraídos recentemente são incolores ou ligeiramente amarelados. (De La Cruz, 1997). À temperatura ambiente, os óleos essenciais (ou voláteis) apresentam-se como líquidos oleosos de alta volatilidade. De uma maneira geral os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais (Simões et al. 1999).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de compostos derivados do metabolismo secundário das plantas, com representantes de muitas funções químicas, como álcoois (linalol, geraniol, citronelol, borneol, mentol, etc.), aldeídos (citral, benzaldeído, aldeído cinâmico, citronelal, aldeído cumínico, vanilina, etc.), hidrocarbonetos (cimento, estireno, etc), terpenóides (linalol, pineno, limoneno, felandreno, cedreno, etc.), lactonas (cumarina), ésteres (cineol, éter interno, eucaliptol, anethol, safrol, etc.), cetonas (carvona, cânfora, irona, mentona, pulegona, etc.), fenóis (eugenol, timol, carvocrol, etc.), entre outras. Na maioria das espécies aromáticas, os óleos essenciais são compostos principalmente por mono e sesquiterpenos (Mattos, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que os metabólitos secundários eram de ocorrência exclusiva em vegetais, porém, todos os organismos vivos podem sintetizar compostos classificados como secundários (Hadacek, 2002). A composição complexa dos óleos essenciais apresenta, na maioria das vezes, centenas de diferentes compostos químicos, com ação sinérgica ou complementar entre si, modulando sua atividade, sendo um predominante e os demais aparecendo como elementos-traço. Esses componentes, mesmo representando apenas traços, têm importância fundamental na atividade biológica do óleo essencial.

Dentre as diversas classes de metabólitos secundários estão os isoprenóides (também conhecidos como terpenóides ou terpenos), assim denominados em referência à unidade básica de formação, a molécula de 5 carbonos isopentenil pirofostato (IPP). Os terpenos constituem uma extensa classe de produtos secundários do metabolismo vegetal e compreendem o mais diverso conjunto de produtos naturais conhecidos. Possuem estruturas cíclicas ou acíclicas que resultam de transformações das cadeias isoprenóides

que lhes dão origem. Estas transformações compreendem um grande número de reações, tais como reduções, oxidações, ciclizações, rupturas de anel ou rearranjos, as quais conferem uma enorme diversidade estrutural a estes metabólitos. (Cardoso, 2002). Isoprenóides podem ser encontrados em plantas como metabólitos primários, como ubiquinonas, plastoquinonas, giberelinas, brassinosteróis, carotenóides e outros, ou como extensas classes de moléculas do metabolismo secundário (Rodríguez-Concepcion e Boronato, 2002). Os isoprenóides classificados como metabólitos secundários são de grande importância em virtude de suas funções ecológicas como atração de polinizadores e dispersores de sementes, proteção contra herbívoros (Paré e Tumlinson, 1999) e alelopatia (Wink, 2003). O linalol é um monoterpeneo alcoólico terciário de cadeia aberta. Pode ser encontrado normalmente sob a forma de uma mistura de isômeros de posição da primeira ligação dupla. Possui um átomo de carbono assimétrico e, desta forma, possui enantiômeros (Silva, 2003).

O papel dos óleos essenciais encontrados nas plantas está relacionado com a sua volatilidade, pois, por meio dessa característica, agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e como arma de defesa, força de atração e repelente no reino animal (Cardoso, 2004). Na maioria das vezes são frutos do metabolismo secundário. A produção de metabólitos secundários não deve ser entendida como produção de material desprovido de significado, conceito que imperou até meados do século XX (Castro et al., 2004). Apenas em passado recente, compreendeu-se que os metabólitos secundários são o resultado da especialização celular e que suas manifestações durante certas fases do desenvolvimento do organismo produtor se devem à expressão diferencial dos genes (Gottlieb et al., 1996).

Os óleos essenciais são produzidos e armazenados pelas plantas em estruturas especializadas, independentemente da composição química, tais como idioblastos, cavidades, canais e tricomas glandulares (Fahn, 1975; Gottlieb & Salatino, 1987). Na família Lauraceae, o óleo essencial é armazenado em células secretoras que podem ser encontradas na folha, na casca e no lenho (Barros et al. 1997).

## 2.4. Síntese de Terpenos e funções em plantas

Os terpenos possuem uma estrutura comum, suas fórmulas representam a união de duas, três, quatro, seis, oito ou mais unidades do isopreno (2-metil-1, 3-butanodieno ou metilbutanodieno). Os terpenóides são formados por várias ciclizações, rearranjos e perdas ou adição de átomos de carbono e são classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, sendo os dois primeiros encontrados principalmente em óleos essenciais (DEY; HARBORNE, 1997). Os monoterpenos fazem parte da classe mais simples dos terpenóides, sendo constituídos por 10 átomos de carbono, ou seja, duas unidades de isopreno. Os monoterpenos mais comuns encontrados nos óleos voláteis são: linalol (Figura 1), geraniol, tujona, cânfora, limoneno e outros. Já entre os sesquiterpenos mais comuns encontramos o farnesol, nerolidol, bisaboleno e outros (Simões et al, 2001). Os componentes químicos dos óleos voláteis podem ser divididos em duas classes, com base na sua biossíntese encontram-se os derivados dos terpenóides, formados pela via do ácido mevalônico-acetato e derivados do fenilpropanóide, compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico (Strapazzon, 2004).

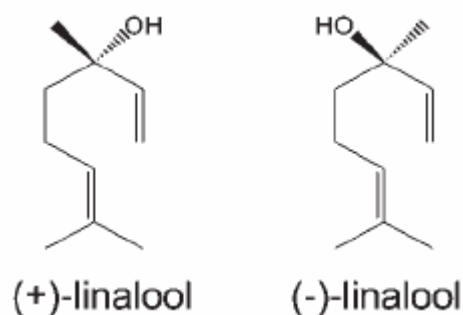


Figura 1: Estrutura química do S -linalol e L-linalol, respectivamente (Silva *et al.*, 2003)

Terpenos são lipídeos sintetizados a partir de acetil-coenzima A, principalmente pela via do ácido mevalônico (Leite 2004). Os terpenos possuem uma estrutura comum, suas fórmulas representam a união de duas, três, quatro, seis, oito ou mais unidades do isopreno (2-metil-1, 3-butanodieno



ou metilbutanodieno). Os terpenóides são formados por várias ciclizações, rearranjos e perdas ou adição de átomos de carbono. As estruturas podem ser lineares ou cíclicas e neste tipo de moléculas aparecem ligações conjugadas. As ligações químicas podem ser excitadas pela luz ou pela temperatura, e ao mudar em sua posição emitem um sinal. Por isto, estas moléculas estão relacionadas com a recepção de estímulos luminosos ou químicos (Melo 2005).

Todos os terpenos são derivados da fusão de elementos de cinco carbonos ( $C_5$ ) que possuem o esqueleto carbônico do isopreno. Os terpenos são classificados pelo número de unidades  $C_5$  que contém. Terpenos com dez carbonos que contém duas unidades  $C_5$  são chamados monoterpenos, terpenos com 15 carbonos (três unidades  $C_5$ ) são sesquiterpenos e, terpenos de 20 carbonos (quatro unidades  $C_5$ ) são diterpenos. Desta forma, os terpenóides são sintetizados a partir da unidade isoprênica ( $C_5H_8$ ) ou hemiterpeno, que por sua vez origina-se do ácido mevalônico. Por meio da condensação de unidades pentacarbonadas, ocorrendo a formação dos compostos terpênicos: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ); sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ); diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ); triterpenos ( $C_{30}H_{48}$ ); tetraterpenos ( $C_{40}H_{64}$ ) (Taiz & Zeiger, 2004). Os terpenos apresentam-se em uma enorme escala de diversidade nos esqueletos de carbono e em grupos funcionais (Kollner, 2004).

As sínteses dos terpenos convertem difosfatos lineares do prenil de comprimentos cadeias diferentes aos representantes preliminares de cada tipo esqueleto de terpeno (Bastão, 1999; McMillan e Beale, 1999; Sábio e Croteau, 1999). Para o exemplo, o  $C_{10}$  intermediário, o difosfato geranyl (GPP), é convertido aos monoterpenos, e  $C_{15}$  o intermediário, difosfato do farnesil (FPP), é convertido aos sesquiterpenos. Frequentemente, os intermediários individuais têm destinos múltiplos na reação catalisada por uma única síntese de terpeno, conduzindo à formação de produtos múltiplos. Apesar de uma alta diversidade entre as seqüências das sínteses de terpenos, as enzimas compartilham de diversos resíduos conservados de aminoácidos nos sítios ativos (Kollner, 2004).

A biossíntese de terpenos (Figura 2) ocorre a partir de metabólitos primários em pelo menos duas rotas distintas, a rota citoplasmática do ácido mevalônico, onde três moléculas de Acetil-CoA são fundidas para formar o ácido mevalônico e a rota biossintética plastídica, a partir da fusão de

fosfoglicerato e piruvato para formação de isopentenil pirofosfato (IPP) através da formação de uma molécula intermediária. Uma molécula de IPP funde-se a outra de dimetilalil pirofosfato (DPP) formando geranyl pirofosfato (GPP), o precursor comum dos monoterpenos (C<sub>10</sub>). GPP pode então se ligar a outra molécula de IPP para formar o composto farnesil pirofosfato (FPP), o precursor de todos os sesquiterpenos C<sub>15</sub>. A adição de outras moléculas de IPP produz o composto (C<sub>20</sub>) geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), o precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar e formar triterpenos (C<sub>30</sub>) e os tetraterpenos (C<sub>40</sub>). Essas duas rotas têm sido elucidadas em plantas e microrganismos, e os genes que codificam as enzimas de ambas as rotas tem sido identificados (Rodriguez-Concepcion and Boronato, 2002; Lange and Ghassemian, 2003).

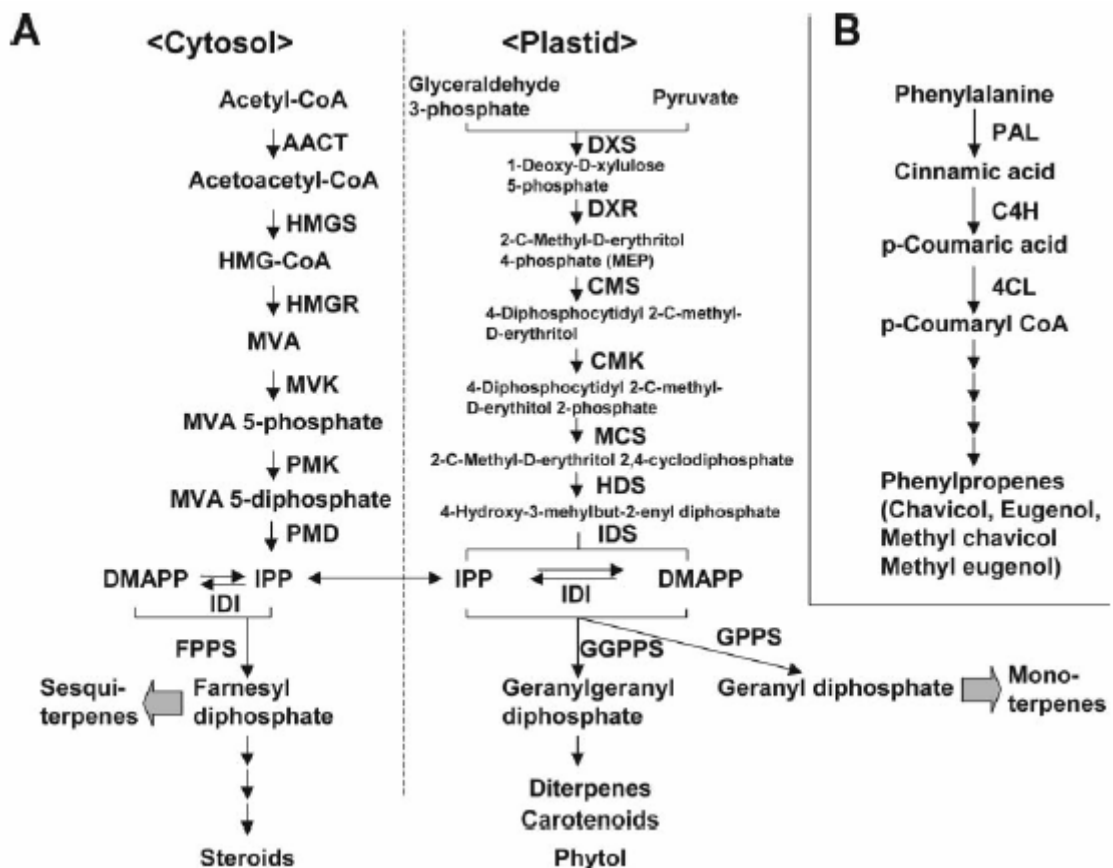


Figura 2: Rota biossintética de terpenos. Os terpenóides são sintetizados a partir de duas rotas biossintéticas distintas e cooperativas, a rota citoplasmática e a rota plastídica. Os sesquiterpenos são sintetizados a partir de difosfato de farnesil, pela via citoplasmática, enquanto os diterpenos e os monoterpenos são sintetizados a partir de difosfato de geranyl-geranyl e difosfato de geranyl,

respectivamente, pela via plastídica. As reações finais da via plastídica, e, ambas reações com a via citoplasmática, competem pelo substrato pirifosfato de isoprenil (IPP) (Ijima, 2004).

As funções de monoterpenos e sesquiterpenos em plantas e seu papel biológico estão relacionados com a sua volatilidade, pois, por meio dessa característica, agem como sinais de comunicação química com o reino vegetal e interação com o reino animal. Deste modo, as funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, a atração de polinizadores, a proteção contra a perda de água e o controle de temperatura são creditados a ação de muitos terpenos. Terpenos são as principais moléculas envolvidas na composição de aromas voláteis intensos em plantas com polinização noturna ou crepuscular, já que o estímulo visual não é possível. Espécies de *Datura* e *Brugmansia* (Solanaceae), conhecidas como trombeta ou dama-da-noite, apresentam perfume notável à noite e podem atrair morcegos e mariposas. As espécies *Eucalyptus globulus* Lasbill. *E. camaldulensis* Dehnh, *Artemisia absinthium* L. e outras, geram um efeito inibitório na germinação de sementes por meio de seus óleos, de forma que outras plantas são totalmente inibidas de se desenvolver num raio de 1 a 2 metros delas. Estudos indicam que o 1,8-cineol e a cânfora, entre outras substâncias, seriam uma das responsáveis por esse efeito.

Um grande número de óleos essenciais ricos em terpenos possui propriedade repelente a insetos, frequentemente encontrados em glândulas foliares que se projetam sobre a epiderme foliar e servem como um “aviso” da toxicidade da planta, repelindo herbívoros potenciais. (Taiz & Zeiger, 1998). Sesquiterpenos em *Picea abies* em conjunto com o monoterpeno linalol, são os principais constituintes das emissões voláteis induzidas. A quantidade tanto como a qualidade e a composição enantiomérica particular contribuem para a atividade biológica da mistura de terpenos na proteção contra patógenos e herbívoros potenciais (Martin et al. 2003).

Várias espécies vegetais são ricas em compostos secundários com ação inseticida, destacando-se os monoterpenos e seus análogos, que estão presentes em grande abundância em óleos essenciais de muitas plantas superiores. Estes compostos são tipicamente lipofílicos, tendo alto potencial

para interferências tóxicas em processos bioquímicos básicos, com conseqüências fisiológicas e comportamentais em insetos (Prates & Santos, 2002). Os compostos monoterpênóides têm sido avaliados no controle de várias espécies de insetos e pragas de grãos armazenados, apresentando ações de contato, ingestão, ovicida, fumigante e repelente, além de afetarem a biologia dos insetos (Karr & Coats, 1988; Rice & Coats, 1994; Lee et al. 2003).

## **2.5. Engenharia metabólica da Biossíntese de Terpenos**

A Engenharia Metabólica pode ser conceituada como uma metodologia integrada de análise e síntese, com o objetivo de aprimorar os fluxos metabólicos para a produção de um dado bioproduto. Os bioprocessos são sistemas multi-hierárquicos que se estendem de níveis macroscópicos até níveis microscópicos (Shimizu, 2002). Apesar dessa definição poder variar de autor para autor, um dos principais livros editados nesse tema conceitua a Engenharia Metabólica como "o melhoramento específico da formação do produto ou das propriedades celulares através da modificação de uma ou mais reações bioquímicas específicas ou da introdução de novas reações utilizando a tecnologia do DNA recombinante" (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

O emprego da Engenharia Metabólica tem sido possível graças ao desenvolvimento de técnicas auxiliares, quais sejam: procedimentos matemáticos de análise de fluxos metabólicos (MFA), modelagem reacional e programação linear, técnicas analíticas que empregam carbono marcado e ressonância magnética nuclear (NMR), cromatografia gasosas com espectrometria de massas (GC-MS). Esse conjunto de técnicas permite obter uma análise da distribuição de fluxos metabólicos mais precisa, devido à possibilidade de efetiva determinação de metabólitos intra e extracelulares, permitindo validar ou não o modelo metabólico proposto. A combinação de métodos analíticos para a quantificação de fluxos metabólicos e o seu controle permite identificar as possíveis limitações que impedem ou restringem a produção do produto alvo. A partir dessas informações e com o uso de técnicas da Biologia Molecular, podem ser implementadas as modificações genéticas necessárias para eliminar "gargalos" metabólicos e obter-se o almejado incremento da produção do bioproduto alvo. Esse enfoque constitui a essência

da Engenharia Metabólica (Stephanopoulos *et al.*, 1998). Um excelente exemplo nesse contexto é a tecnologia desenvolvida pela *Roche Vitamins Ltda.*, que empregou a Engenharia Metabólica para incrementar rotas específicas da produção de riboflavina (vitamina B2) em detrimento de rotas que levam à geração de subprodutos. Essa abordagem permitiu aumentar tão significativamente a produção da vitamina, que a mesma passou a cristalizar no próprio meio de cultivo (Hohmann, 2002).

O uso das sintases de terpenos na engenharia metabólica da biossíntese de terpenos tem sido descrito para diversas espécies de plantas. O cDNA da linalol sintase de *Clarkia breweri* foi expresso com sucesso em tomate (Lewinsohn *et al.*, 2001), em petúnia (Lucker *et al.*, 2001) e canola (Lavy *et al.*, 2002). Adicionalmente, a expressão de um cDNA da sintase do limoleno de *Perilla frutensis* em plantas de tabaco conduziu ao acúmulo deste monoterpreno na planta (Ohara *et al.*, 2003). Lucker *et al.* (2004) produziu três linhagens de plantas de tabaco, cada uma delas expressando uma monoterpreno sintase:  $\gamma$ -terpineno sintase, limoneno sintase e  $\beta$ -pineno sintase, respectivamente, e a obtenção de uma linhagem híbrida expressando de forma funcional as três enzimas simultaneamente. A confirmação dos produtos enzimáticos foi confirmado por CG-MS. Estratégias de silenciamento gênico também foram possíveis com a utilização dos genes das sintases dos terpenos. A supressão anti-senso do gene para a  $\delta$ -cardineno sintase em algodão preveniu a indução da resposta de defesa durante infecção bacteriana, mas não a expressão constitutiva de  $\delta$ -cardineno (Townsend *et al.*, 2005). Recentemente a aplicação de um novo mecanismo de silenciamento gênico baseado no fitovírus TRV mostrou-se eficiente para o silenciamento de genes de síntese de terpenos em petúnia (Spitzer *et al.*, 2007). Coletivamente estes trabalhos demonstram que a engenharia metabólica das rotas de síntese de terpenos é uma poderosa ferramenta biotecnológica para obtenção de linhagens de plantas com fenótipos alterados para o conteúdo de terpenos.

O acúmulo do monoterpreno em plantas acontece com melhor eficiência em folhas de 12 a 20 dias da idade em *Ocimum Basilicum*, o período da expansão máxima da folha. A taxa da biossíntese de monoterprenos pode ser determinada pela incorporação de  $^{14}\text{CO}_2$ , acompanhada por análise de cromatográfica gasosa, e parecia ser o fator principal que controla o nível do

monoterpeno. Nenhuma perda catabólica significativa da biossíntese de monoterpenos foi detectada durante o período de desenvolvimento da folha, e a volatilização de monoterpenos foi observada em uma taxa muito baixa, que em uma base mensal, representasse menos de 1% do total de monoterpenos armazenados (Gershenzon 2000).

Existe um grande potencial de uso biotecnológico para as rotas biossintéticas de terpenos em plantas, principalmente pela enorme variedade de metabólitos secundários produzidos. Existe pelo menos 35.000 metabólitos secundários diferentes em plantas, segundo estimativas recentes (Gershenzon 2000). Os metabólitos secundários individuais têm geralmente uma distribuição muito restrita entre os táxons de plantas (Giannasi e Crawford, 1986), entretanto, os mecanismos genéticos e bioquímicos moleculares responsáveis para gerar essa diversidade metabólica notável são ainda, em sua maioria, desconhecidos (Pichersky et al, 2000).

### **3. Material e Métodos**

### **3.1. Coleta e análise das seqüências no banco de dados**

As seqüências de nucleotídeos e/ou de aminoácidos de três grupos de genes que codificam os produtos sintase do difosfato de geranyl, sintase do difosfato de geranyl-geranyl e as síntases de monoterpênicos, de diferentes táxons, foram obtidas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### **3.2. Alinhamento de seqüências e construção de oligonucleotídeos**

As seqüências coletadas foram alinhadas com seus pares, de acordo com o grupo a que pertencem, de modo a permitir a identificação das regiões com maior nível de homologia, com o auxílio do programa para microcomputador BioEdit (<http://www.bioedit.com>). A partir das regiões de homologia identificadas foram construídos oligonucleotídeos degenerados nas orientações *forward* e *reverse*, para posterior utilização em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies Corp.).

### **3.3. Análises filogenéticas**

As seqüências obtidas a partir de fragmentos amplificados por PCR, que apresentaram homologia com genes funcionais conhecidos, foram utilizadas para a análise filogenética e construção de uma árvore filogenética. As análises e a construção da árvore filogenética foram efetuadas por meio do método Dendroscope (DANIEL et al 2007) que considera um ponto médio ideal entre os alinhamentos. Valores percentuais, relacionados ao grau de homologia entre seqüências, estão apresentados junto a cada ramo da árvore filogenética.

### **3.4. Material vegetal**

Sementes de pau-rosa (*A. rosaeodora*), coletadas de uma população natural da Reserva Adolfo Ducke, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA foram germinadas no Laboratório de Biotecnologia vegetal e cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da UniNilton Lins. Folhas jovens das plântulas de pau-rosa foram utilizadas para extração de DNA genômico.

### **3.5. Extração de DNA**

Todos os experimentos envolvendo técnicas de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro Universitário Nilton Lins. O DNA genômico de pau-rosa foi extraído segundo o método CTAB (brometo de cetitrimetilamonio), como descrito por Doyle & Doyle, 1991, com modificações. Ao tampão de extração foram adicionados 0,1 % p/v de detiotritol (DTT) e 10 mg/mL de proteinase K. Aproximadamente 1g de material vegetal foi macerado em N<sub>2</sub> líquido e imediatamente colocado em microtubo com 700 µL de tampão de extração (CTAB 2%, Tris HCl 1 M, pH 8,0, EDTA 0,5 m pH 8,0 e 10µg de RNase) pré-aquecido a 60°C. A mistura foi agitada em vortex por 1 minuto e incubado em banho-Maria por 30 min a 60°C, sendo que, de 10 em 10 min, os tubos foram invertidos para homogeneizar a suspensão. Logo após os tubos foram retiradas do banho-Maria e resfriados à temperatura ambiente. Foram adicionados 600µl de CIA (clorofórmio: álcool isoamilico 24:1) e os tubos foram agitados por 5 min por inversão manual. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 8 min a temperatura ambiente e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. À fase aquosa foram adicionados 400µl de isopropanol gelado (-20°C) e os tubos foram incubados a -20° C por 1 hora e meia. Os ácidos nucléicos foram precipitados por 10 minutos a 600 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 1 ml de etanol 70% gelado (-20° C) e a mistura incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 600 x g, o sobrenadante descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente por uma hora. Os ácidos nucléicos foram ressuspendidos com 50 µl de tampão TE acrescido de RNase e incubado a 37°C por 1 hora. O DNA foi novamente precipitado em isopropanol e lavado



com etanol 70%, como descrito anteriormente. O DNA genômico foi ressuspensionado em 100 µl de água deionizada e armazenado a -20° C.

Para avaliação da integridade do DNA, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris HCl 1 M pH 8, EDTA 0,5 m pH), contendo brometo de etídio (EtBr) 0,2 µg/ml, como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a eletroforese, o DNA foi visualizado em transluminador UV (302nm) e fotografado.

### **3.6. Condições de PCR**

As reações de amplificação de DNA foram conduzidas em termociclador Endurance Techne TC-512, com o DNA genômico de pau-rosa como *template*, os oligonucleotídeos construídos como descrito previamente e pré-mix *GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix* (Promega), segundo orientações do fabricante. As temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos nas reações foram estabelecidas de acordo com as temperaturas médias de anelamento ( $T_m$ ) informadas pelo fabricante, com modificações quando necessárias, num total de 40 ciclos por reação.

### **3.7. Purificação e clonagem dos produtos de PCR**

Os fragmentos amplificados pela PCR foram separados em gel de agarose 1% (como descrito anteriormente), as bandas correspondentes aos fragmentos excisadas com o auxílio de lâminas e o DNA purificado com o auxílio do *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega), segundo orientações do fabricante. Os fragmentos de PCR purificados foram então clonados em vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy com o auxílio do *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I* (Promega), como descrito pelo fabricante. A reação de ligase ocorreu a 4° C por 12 horas. A reação de ligase foi então adicionada a um microtubo contendo células competentes DH5α, previamente descongeladas, incubadas por 30 minutos no gelo em seguida foram submetidas a choque térmico em banho Maria a 42°C por 1 minuto e colocadas imediatamente para o gelo. Foi

adicionado 1 mL de meio LB (*Luria Bertani*) líquido sem antibiótico e as células incubadas por 1 hora a 37° C em banho-Maria. Após o crescimento bacteriano as células foram concentradas para aproximadamente 100 µl e plaqueadas em meio LB suplementado com 100 mg/L de Ampicilina, X-Gal (5 bromo-4-cloro-3 indol-β-D-galactosídeo e IPTG (Isopropil-β-D-tio-galactopiranosídeo) e incubadas em BOD por 12 a 16 horas a 37°C. As colônias transformantes foram selecionadas pela coloração branca característica e seu DNA plasmidial purificado para o diagnóstico da clonagem.

### **3.8. Extração do DNA plasmidial e confirmação dos clones**

As colônias transformantes isoladas foram cultivadas em 1,5 ml de meio LB com ampicilina a 37°C, a 180 rpm, por 12 a 16 horas. Após o cultivo, as células foram precipitadas e o DNA plasmidial purificado pelo Kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo orientações do fabricante. O DNA plasmidial purificado foi eluído em 100 µl de água deionizada e armazenado -20°C. A confirmação dos clones foi realizada através da digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, cujos sítios no vetor pGEM®-T Easy, que flanqueiam o sítio de clonagem de produto de PCR no plasmídeo. O DNA das reações foi separado em gel de agarose 1%. Bactérias recombinantes contendo os produtos de PCR clonados foram estocados a -80° em 50% de glicerol.

### **3.9. Sequenciamento dos fragmentos**

A reação de sequenciamento constou de 1 µL de Big Dye V3. 1, 1,5 µL de tampão big dye 5X, 3 µL de DNA, 1µL primer M13 reverso (3,2 pmol/µL) e água deionizada estéril q.s.p. 10 µL com as seguintes temperaturas: 96°C por 2 minutos e 39 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. Em seguida, foi realizada a precipitação adicionando 40 µL de isopropanol 65% a temperatura ambiente, deixando 15 minutos ao abrigo da luz. Centrifugou-se durante 30 minutos a 3000 x g a temperatura ambiente. O

sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Em cada poço foram adicionados 200 µl de etanol 60% (v/v) à temperatura ambiente, seguido de 5 minutos de centrifugação a 3000 x g. O sobrenadante foi descartado e as amostras secadas por 30 minutos a 37°C, protegido da luz. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), aquecida a 95°C por 5 minutos e levadas ao gelo por mais 2 minutos. As placas foram seqüenciadas com uso do equipamento MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare). Para cada uma das amostras estudadas a região correspondente ao DNA alvo, foi seqüenciada no mínimo duas vezes para aumentar a confiabilidade nos resultados obtidos. As seqüências eram correspondentes às reações de sequenciamento na orientação 5'- 3', e as outras seqüências eram correspondentes às reações na orientação 3'- 5'.

#### **4. Resultados e discussão**

#### 4.1. Alinhamento de seqüências e construção de oligonucleotídeos

A partir do banco de dados do GenBank, foram selecionadas um total de 189 seqüências, em três grupos distintos, sendo 55 identificadas como Sintases do Difosfato de Geranil, 58 de Sintases do Difostato de Geranil-geranil e 76 referentes a Sintases de Monoterpenos, originadas de um número diverso de espécies de plantas (Tabela 1). Os três grupos de enzimas desempenham um papel chave no metabolismo de terpenos em plantas, podendo ser utilizadas na engenharia metabólica da biossíntese de terpenos, principalmente em estratégias de visem o superexpressão do produto gênico, a inibição metabólica (supressão ou silenciamento gênico) e/ou a retroinibição catabólica (citações), o que justifica nosso interesse específico nestes três grupos especificamente. As seqüências de cada um dos grupos foram alinhadas, gerando desta forma, três grupos de alinhamentos. Em cada grupo, as seqüências que não apresentaram regiões de homologia significativas foram descartadas arbitrariamente, considerando-se no alinhamento final somente as seqüências com níveis satisfatórios de homologia (dados não mostrados).

O Alinhamento das seqüências consenso obtidas e as depositadas no GenBank revelou tanto a presença de remoções e inserções de nucleotídeos (indels) e de substituições de base do tipo transição e transversão (dados não mostrados). Durante o processo de análise e edição das seqüências utilizadas, foram retiradas as extremidades da região 5' e 3' para que as seqüências ficassem aproximadamente do mesmo tamanho, permitindo a obtenção de valores mais aproximados de homologias entre as seqüências (Phillips *et al.*, 2000; Page & Holmes, 2001).

Tabela 1: Representação dos produtos gênicos seguido do número de seqüências que foram coletadas no banco de dados GenBank e relação das espécies pertencentes a cada produto gênico.

<b>Produto gênico</b>	<b>nº de seqüências</b>	<b>Espécies</b>
Sintase do difosfato de geranil	55	<i>Arabidopsis Thaliana</i> <i>Capsicum annuum</i> <i>Adonis palestina</i> <i>Arnébia eucroma</i> <i>Vitis Vinífera</i>
sintase do difosfato de geranil-geranil	58	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>Hevea Brasiliense</i> <i>Adonis Palestina</i>
sintase dos monoterpenos	76	<i>Abies grandis</i> (sintase do limoleno) <i>Mallus doméstica</i> (sintase do linalol) <i>Mentra citrata</i> (sintase do linalol) <i>Perilla frutiscente</i> (sintase do linalol) <i>Clarkia breweri</i> (sintase do s-linalol) <i>Picea abies</i> (sintase do linalol) <i>Solanum lycopersicum</i> (sintase de monoterpeno) <i>Perila Frutis</i> (sintase do mirceno) <i>Arabidopsis Thaliana</i> (terpeno sintase - atividade desconhecida) <i>Eucaliptus globulus</i> (sintase de monoterpeno) <i>Picea sitchenses</i> (sintase do pineno) <i>Lavandula augustifolia</i> (sintase do limoneno) <i>Pinus taeda</i> (sintase do alfa-pineno) <i>Citrus Lemon</i> (sintase do beta-pinene) <i>Artemisea annua</i> (sintase do beta-pinene) <i>Sálvia pomífera</i> (sintase do sabinene)

As regiões que apresentaram maior conservação de nucleotídeos em um maior número de seqüências em cada grupo foram utilizadas para a construção dos oligonucleotídeos. Nucleotídeos altamente conservados foram mantidos nas seqüências dos oligonucleotídeos e as posições com menor grau de conservação foram substituídas pelo nucleotídeo trifosfato de inosina (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição dos oligonucleotídeos construídos a partir do alinhamento das sequências dos genes alvo.

Oligo-nucleotídeo	Sequência	Gene alvo
F terp1	GGA TTA CCA ACC CTC TCT TTG G	Sintase do difosfato de geraniil-geraniil
F terp2	CTT ATG GGG AAC TCG CTT ACC G	Sintase do difosfato de geraniil-geraniil
F terp3	GAA CGG TIG GGA ATC GAT AGG C	Sintase do difosfato de geraniil-geraniil
R terp4	CCG CCG TTA TTA TIA CTT TC	Sintase do difosfato de geraniil-geraniil
R terp5	GGC TAI GGG AGG TGG CAC	Sintase do difosfato de geraniil-geraniil
F terp6	AAC CCI CTT ACC AGG AAC G	Sintase do difosfato de geraniil
F terp7	GGI GAT AGA TAG ACA TTT CC	Sintase do difosfato de geraniil
R terp8	CAC IAT TAT TGT ITT AGC	Sintase do difosfato de geraniil
R terp9	CGI CAA CAT CAA CGI AAT GG	Sintase do difosfato de geraniil
F terp10	GTT ATC TIT CCA ACC TGT G	Sintase de monoterpreno
F terp11	ACG GAT GAA ACA TAC AGA AG	Sintase de monoterpreno
F terp12	TGG CAT GCC IGA CAG ATC C	Sintase de monoterpreno
R terp13	CCA GTC CCT CCA TTG TTC C	Sintase de monoterpreno
R terp14	CCG CTC AGI AAC GAA GTT G	Sintase de monoterpreno
Lis F1	AGA AAA ACC AAA CCA CCT TA	Sintase do linalol
Lis F2	ACA AGA CAA CCA TGC AGC	Sintase do linalol
Lis F3	TTT CTC CTC ACT ATC ATC	Sintase do linalol
Lis F-int 1	CCA TCA TTC TAT CCT GTT	Sintase do linalol
Lis R1	ATA GCA GAT GAG TTT GGA A	Sintase do linalol
Lis R2	CTG GTG ACA TCT TCT AAT AA	Sintase do linalol
Lis R3	CCC TTG GAT TCA TTG TAC	Sintase do linalol
Lis R-int 1	GTT TTA TGT ATG TTT CCT G	Sintase do linalol

#### 4.2. Amplificação dos fragmentos de DNA genômico e clonagem molecular

O DNA genômico de pau-rosa foi extraído pelo método do CTAB, como descrito por Doyle & Doyle (1991), com modificações. Ao tampão de extração foram adicionados 0,1 % p/v de detiotritol (DTT) e 10 mg/mL de proteinase K, o que permitiu a completa inibição da oxidação fenólica no macerado, permitindo a purificação de DNA genômico de boa qualidade e em quantidade satisfatória (dados não mostrados). Santos (2005) obteve DNA de pau-rosa de boa qualidade utilizando o método CTAB, como descrito originalmente, utilizado em reações de amplificação por PCR em análises de RAPD (*Random Amplification Polymorphic DNA*), mas também observou a ocorrência de oxidação fenólica em parte das amostras. A adição de uma segunda molécula antioxidante (DTT) parece ter tido efeito aditivo na prevenção da oxidação dos ácidos nucléicos de

pau-rosa. Muitos autores tem descrito modificações no protocolo original de extração de DNA por CTAB, ajustando sua metodologia para condições especiais (WINNEPENNINCKZ *et al.*, 1998; STEINER & DREYER, 2002; LIMA, 2003; LOPES, 2004). O protocolo de extração de DNA apresentado neste trabalho pode servir de referência para a extração de ácidos nucléicos de pau-rosa e outras espécies de lauráceas, que, pelo alto teor de substâncias fenólicas presentes em seus óleos essenciais, apresentam alta atividade de oxidação fenólica.

Foram obtido um total de 26 fragmentos de DNA, amplificados com a utilização de diferentes combinações de oligonucleotídeos, para cada grupo de genes (Tabela 3). Os fragmentos foram purificados a partir da excisão em gel de agarose 1% e inseridos no sítio de clonagem para produtos de PCR do plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega). Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para a transformação da bactéria *E. coli*, estirpe DH5 $\alpha$ , e as bactérias plaqueadas em meio de cultura LB suplementado com o antibiótico Ampicilina para a seleção de colônias transformantes. A seleção das colônias também foi auxiliada pela coloração branca característica, resultante da interrupção do gene *lacZ* (que codifica para a enzima  $\beta$ -galactosidase) do plasmídeo pela inserção do fragmento de DNA e a conseqüente inabilidade de metabolizar o 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal).

Tabela 3: Relação dos fragmentos amplificados por PCR com os oligonucleotídeos utilizados. A estimativa do tamanho dos fragmentos é dada em pares de bases (pb).

	Oligonucleotídeos	Tamanho (pb)*		Oligonucleotídeos	Tamanho (pb)	
1	Fterp1 x Rterp5	1700	15	Fterp11 x Rterp13	1600	
2		1300	16		1200	
3		900	17		960	
4		750	18		850	
5	Fterp2 x Rterp5	1750	19		750	
6		1400	20		400	
7		950	21		350	
8		760	22		300	
9	Fterp10 x Rterp13	2000	23	Fterp11 x Rterp14	1600	
10		900	24			1350
11		800	25			330
12		700	26	FarnF x FarnR	1400	
13		650	27	LisF2 x Lis-int1	1900	
14		350	28		1400	
			29		400	

\* A estimativa dos tamanhos dos fragmentos de DNA, em pb, foi realizada pela comparação da migração dos fragmentos amplificados em gel de agarose 1% em contraste com o padrão *100 Base-Pair Ladder* (GE Healthcare).

As colônias transformantes foram isoladas e o DNA plasmidial foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*, que flanqueia o sítio de clonagem de produtos de PCR no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy, para a confirmação da presença do inserto. Onze fragmentos foram clonados e as bactérias transformantes correspondentes foram estocadas em glicerol 50% a -80° C (Tabela 4).

Tabela 4: Representação dos fragmentos clonados e estocados em glicerol.

Clone*	Tamanho (pb)**	Oligonucleotídeos	Clone	Tamanho (pb)	Oligonucleotídeos
pNL001	350 pb	Fterp11 x Rterp13	pNL008	760 pb	Fterp2 x Rterp5
pNL002	1300 pb	Fterp11 x Rterp13	pNL009	1900 pb	Lis F2 X Lis R-int1
pNL003	1600 pb	Fterp11 x Rterp13	pNL010	1400 pb	Lis F2 X Lis R-int1
pNL004	800 pb	Fterp10 x Rterp13	pNL011	400 pb	Lis F2 X Lis R-int1
pNL005	750 pb	Fterp11 x Rterp13			
pNL006	750 pb	Fterp1 x Rterp5			
pNL007	1700 pb	Fterp11 x Rterp3			

\* Nome de identificação do clone no estoque de glicerol.

\*\* Tamanho do fragmento em pb, estimado pela comparação do padrão de restrição do clone com a enzima *EcoRI*, em contraste com o padrão *100 Base-Pair Ladder* (GE Healthcare).



### 4.3. Sequenciamento de análise das seqüências obtidas

Os fragmentos clonados foram seqüenciados em seqüenciador automático *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* (GE Healthcare), utilizando-se oligonucleotídeos para os promotores dos genes *T7* e *SP6 RNA polimerase* (Promega), que flanqueiam o a região de clonagem do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy. As seqüências obtidas foram comparadas com os dados disponíveis no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)), com o auxílio da ferramenta *Blast*, que informa o nível de homologia entre seqüências distintas. Nenhuma das quatorze seqüências analisadas apresentou níveis de homologia significativos com nenhuma outra seqüência de nucleotídeos depositada do *GenBank*. As seqüências foram então analisadas na ferramenta *Blast-X* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)), que converte a seqüência de nucleotídeos em seqüência de aminoácidos e executa o alinhamento das seqüências. Das quatorze seqüências analisadas, treze delas também não apresentaram homologia significativa com nenhuma seqüência de aminoácidos depositada no GenBank. A seqüência do clone pNL005 apresentou 66% de homologia com a seqüência de aminoácidos da proteína tipo cinase MAP3K de *Arabidopsis thaliana* (Figura 3) e com outras proteínas cinases de outras espécies vegetais.

```

pNL005 447  KWIRGALLGRGSFGTVNLA FNLT KRDLRAPKIMAVKSAILSQSSSLEKEREVLEKLQDCP 268
              +WIR  +G GSF TV+LA          P +MAVKS+ +  S++L ER+VL+ L DC
MAP3K  2     EWIRRETIGHGSFSTVSLATTSGSSSKAFPSLMAVKSSGVVCSAALRNERDVLDDLGDSC 61

pNL005 267  QILSCFGHDVNVVNGKLFYNLFLEYASGGSLAELGK-----LPESEVRRRYTSAVLKGLSF 103
              +I+ CFG  V NG+  YNLFLEYASGGSLA+ K      LPE EVRR+T +++KGL
MAP3K  62     EIVRCFGEGRTVENGEEIYNLFLEYASGGSLADRIKSSGEALPEFEVRRFTRSIVKGLCH 121

pNL005 102  MHLKGLVHCDVKLQNL L L F 46
              +H  G  HCD+KL+N+L+F
MAP3K  122  IHGNGFTHCDIKLE NV L V F 140

```

Figura 3: Alinhamento da seqüência de aminoácidos estimada do clone pNL005 a seqüência de aminoácidos da MAP3-cinase de *A. thaliana* (CAB16796.1)

A seqüência de aminoácidos obtida a partir do clone pNL005 foi alinhada com as seqüências de MAP-cinases de outras espécies, utilizando-se a ferramenta de alinhamento múltiplo Clustaw Bioedit ([www.bioedit.com](http://www.bioedit.com)). A partir do alinhamento fornecido pelo programa foi gerada a relação de similaridade filogenética, apresentada como árvore filogenética (Figura 4).



Figura 4: Relação filogenética entre as seqüências de aminoácidos do clone pNL005 (A05. abd) e as famílias de MAP-cinases depositadas no *GenBank*. A árvore filogenética apresenta nós e ramos, que ilustram as relações de parentesco entre organismos. Os ramos ou galhos fazem a ligação entre os nós e são, geralmente, proporcionais ao tempo ou ao número de mutações ocorridas até o surgimento de um novo táxon (Hipólito 2005).

As proteínas quiinases (MAPKs) possuem um importante papel na transdução de diversos estímulos extracelulares, incluindo divisão e diferenciação celular e a resposta a vários tipos de estresse, entre outros. Essas proteínas compõem uma família que possui uma região de resíduos de aminoácidos serina/treonina altamente conservada, sendo encontradas durante a evolução em vários organismos, como mamíferos, xenopus e leveduras (GALDINO 2005). As quiinases (MAP) Mitogen-ativado proteína estão envolvidas na regulação de diversos aspectos do crescimento, desenvolvimento, stress e resposta em todos os eucariotos. O genoma de *Arabidopsis* apresenta 20 seqüências homólogas a MAP-quiinases e um esforço experimental têm sido dedicados na determinação dos processos biológicos que são regulados por cada uma destas kinases. A MAP quinase isoformas MPK3 particular, MPK4, e MPK6 têm sido a mais amplamente estudadas até a presente data (Susan 2007). Apesar do conhecimento extensivo sobre a caracterização molecular e bioquímica das MAPKs nos vertebrados e nas leveduras, poucas informações são conhecidas sobre essas respectivas proteínas em plantas e fungos, assim como suas respectivas funções. A presença de seqüências homólogas às MAPKs de vertebrados e leveduras em plantas foi verificada em diversas espécies (Wilson et al., 1993, 1995; Duerr et al., 1993; Jonak et al., 1993, 1994, 1995; Mizoguchi et al., 1993, 1994; Stafstrom et al., 1993; Decroocq-Ferrant et al., 1995). Os genes homólogos clonados até o momento indicam que as proteínas de plantas compartilham características moleculares típicas da família de MAPK de outros eucariontes (GALDINO 2005).

Em plantas, alguns dados mostram a associação da expressão de MAP-quiinases com ação de auxinas. Tem-se relatado que células em suspensão de tabaco (*Nicotiana tabacum*) tratados com 2,4-D exibem atividade cinase em proteínas recombinantes MPK2, sugerindo que auxina pode funcionar como um ativador de MAPK de plantas (Daí, 2006). A amplificação de seqüências relacionadas a MAP-Cinases em pau-rosa a partir dos oligonucleotídeos gerados neste trabalho pode ser explicada pela existência de homologia entre os oligos Fterp2 e Rterp5 e a seqüência do clone pNL005. Outro fator relevante é a baixa homologia verificada entre as seqüências dos genes envolvidos com a biossíntese de terpenos entre táxons distintos, o que limita a construção de

oligonucleotídeos específicos. Trabalhos adicionais serão necessários para a identificação dos componentes da biossíntese de terpenos em pau-rosa. A construção de uma biblioteca de cDNAs de folhas fisiologicamente ativas de pau-rosa e o sequenciamento de um número significativo de cDNAs poderá ser mais efetivo para se atingir este objetivo. Como o acúmulo de terpenos, principalmente o linalol, nas folhas de pau-rosa, espera-se que a rota biossintética seja bastante ativa e os mRNAs correspondentes bastante abundantes.

## CONCLUSÕES

A partir do banco de dados GenBank foram selecionadas as seqüências depositadas que apresentam atividade na biossíntese de terpenos em plantas. O alinhamento destas seqüências conduziu à construção de conjuntos de oligonucleotídeos e a amplificação de fragmentos a partir de DNA genômico de pau-rosa, que foram inseridos no sítio de clonagem de produtos de PCR do plasmídeo pGEM<sup>®</sup>-T Easy. As seqüências dos fragmentos foram determinadas e contrastadas com as seqüências depositadas no GenBank. Nenhum dos fragmentos apresentou homologia com outros genes envolvidos na biossíntese de terpenos em plantas, mas o clone pNL005 apresentou homologia significativa com o gene MAP3-cinase de *A. thaliana* e com outras MAP-cinases depositadas no GenBank. Devido a baixa homologia entre as seqüências dos genes envolvidos com a biossíntese de terpenos em plantas, os oligonucleotídeos desenhados não foram efetivos para a amplificação dos genes relacionados em pau-rosa. Novas metodologias, entre elas a construção e o sequenciamento de uma biblioteca de cDNAs serão necessárias para este objetivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR JC, FERNANDES NP (1978) Desenvolvimento de Árvores nativas em ensaios de espécies: Rosewood (*Aniba duekei* Kostermans). **Acta Amazônica** 8:523-541.

ARAÚJO VC (1971) Sobre a germinação de *Aniba* (Lauraceae). I. *A. duckei* Kostermans (Pau-rosa itaúba). **Botânica**. Manaus: Inpa, 21 p.

AZEREDO OB (1965) Instituto de óleos - Centro Nacional de Ensino e Pesquisas sobre Plantas Aromáticas e Óleos essências. Boletim, 11p.

AB'SABER AN (2002) **Amazônia: do discurso à práxis**. 2ª Ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 320p.

BARROS CF, CALLADO CH, COSTA CG, PUGIALLI HRL, CUNHA M, MARQUETE O (1997) **Madeiras da Mata Atlântica**, Vol I. 1a ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 86p.

BORÉM A, SANTOS FR (2003) **Biotecnologia Simplificada**. 2ª ed., Editora da Universidade Federal de Viçosa, 126p..

BUSH SM, KRYSAN PJ (2007) Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. **Journal of Experimental Botany**: 58(8), 2181-2191.

CARDOSO MG (2003) **Óleos essenciais**. Boletim Técnico Editora da Universidade Federal de Lavras. 25p.

CASTRO HG, FERREIRA FA, SILVA DJH, MOSQUIM PR (2001) **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda.

CRONQUIST A (1988) **The evolution and classification of flowering plants**. 2ª ed. New York, New York Botanical Garden, 517p.

CROTEAU R, KUTCHAN TM, LEWIS NG (2000) Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318.

CUNHA EVL, ANDRADE NC, SILVA MS, BARBOSA-FILHO JM (2004) Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopiya cayennensis* Maas. **Biochemical Systematics and Ecology**; 32:1055; 1058.

HUSON DH, RICHTER DC, RAUSCH C, DEZULIAN T, FRANZ M, RUPP R (2007) Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. **BMC Bioinformatics**. 8(1):460

DEY PM, HARBONE JB (1997) **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 529p.

DE LA CRUZ MGF (1997) **Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no contexto saúde e doença - Cuiabá, MT**. Cuiabá: UFMT, 1997. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso.

DOYLE JJT, DOYLE JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12:13-15.

Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: Novel Patterns of s-linalool synthase gene expression in the *C. Breweri* flower. **The Plant Cell** 8: 1137-1148.

DUKE SO (1998) Biologically active natural products – Potential use in agriculture. In: PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A.

B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 193-197.

FAHN A (1975) **Plant anatomy**. Toronto: Pegamon Press,. 611p.

GOTTLIEB OR, SALATINO A (1987) Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, v.39, n.8, p.707-16.

HARBONE JB, BAXTER H (1995) **Photochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants**. Ed. Taylor & Francis, London.

HYPÓLITO EB (2005) **Uma resposta Bayesiana ao paradoxo de Suzuki**, Instituto de Matemática da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

HOHMANN HP (2002) Metabolic engineering of riboflavin production in *Bacillus subtilis*. International Congress on Biocatalysis. **Biocat 2002, Book of Abstracts**, p150.

HUANG Y, LAM SL, HO SH (2000) Bioactivities of essential oil from *Elletaria cardamomum* (L.) Maton. To *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **J Stored Prod Res** 36: 107-117.

INOUE S, TAKIZAWA T. and YAMAGUCHI H Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. **J Antimicrob Chemoth** 47, 565-573. 2001

JAMAL SC (2000) **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. Instituto de Química de São Carlos, (Tese de doutorado).



JOLY AB (1987) **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. Editora Nacional, São Paulo.

KARR LL, COATS JR (1988) Insecticidal properties of d-limonene. **Journal of Pesticide Science**, v.13, p.287- 289.

KUBITZKI K, RENNER S (1982) **Lauraceae (Aniba)**. In: **Flora Neotrópica**, Monograph 31 New York Botanic Garden, New York.

LANGE BM, GHASSEMIAN M (2003) Genome Organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. **Plant Mol Biol** 51: 925-948.

Lavy M, Zuker A, Lewinsohn E, Larkov O, Ravid U, Vainstein A, Weiss D (2002) Linalool and linalool oxide production in transgenic carnation flowers expressing the *Clarkia breweri* linalool synthase gene. **Molecular Breeding**: 9, 103-111.

LEE S, PETERSON CJ, COATS JR (2003) Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.77-85.

Lewinsohn E, Schalechet F, Wilkinson J, Matsui K, Tadmor Y, Nam K-H, Amar O, Lastochkin E, Larkov O, Ravid U, Hiatt W, Gepstein S, Pichersky (2001) Enhanced levels of the aroma and flavor compound s-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. **Plant Physiology** 127: 1256-1265.

MARQUES CA (2001) Importância econômica da família lauraceae. **Revista Floresta e Ambiente**. v. 8, n.1, p.195 – 206.

Martin DM, Gershenzon J, Bohlmann J (2003) Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce (*Picea abies*). **Plant Physiol** 132, 1586-1599.

MARTINS ER, SANTOS RHS (1995) **Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo**. Informe Técnico, UFV, v. 73, 26p.

MATTOS SH (2000) **Estudos fitotécnicos da *Mentha arvensis* L. var. *Piperacens* Holmes como produtora de mentol no Ceará**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará. 98p.

May PH, Barata LES (2004) Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: options for sustainable production. **Econ. Bot.**, 58(2): 257-265.

PAGE RDM, HOLMES EC (2001) **Molecular Evolution: A phylogenetic approach**. Blackwell Science. 346 p.

PHILLIPS A, JANIES D, WHEELER W (2000) Multiple Sequence Alignment in Phylogenetic Analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.16, n.3, p. 317- 330. 2000.

PRATES HT, SANTOS JP (2002) **Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados**. p. 443- 461. IN LORINI, I.; MIKE, L.H.; SENSSEL, V.M. (eds.), Armazenagem de grãos. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 1000p.

RICE PJ, COATS JR (1994) Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology** 87, 1172-1179,

RIZZINI CT, MORS WB (1976) **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU, EDUSP

RODRIGUEZ-CONCEPCION M, BORONAT A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiol** 130: 1079-1089.

ROSA MS, MENDONÇA-FILHO RR, BIZZO HR, RODRIGUES IA, SOARES RMA, SOUTO-PADRÓN T, ALVIANO CS, LOPES AHCS (2003) Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy** 47(6), 1895-1901.

CAM R (2005) **Plantas Mediciniais, Óleos Essenciais e Aromas**. Nutritime, v.2, n°2, p.193 – 200.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T (1989) **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SHIMIZU H (2002) Metabolic engineering - integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess system engineering. **J Bioscience Bioeng.** 94(6), 563-573.

SIANI AC TAPPIN MRR, RAMOS MFS, MAZZEI JL, RAMOS MCKV, DE AQUINO FR, FRIGHETTO N (2002) Linalool from *Lippia alba*: Study of the Reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. **Journal of Agricultural and Food Chemystry.** 50(12): 3518-3521.

SILVA DD, GILBERTO OC (2003) Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* korstermans utilizando uma nova coluna capilar polyh4-md em cromatografia gasosa. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 4, 461-465.

Silva FH (2001) **Apostila - curso de biologia molecular**. INBIO - I Escola Brasileira de Inteligência Artificial e Bioinformática, Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo.

Simic A, Sokovic MD, Ristic M, Grujic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin PD (2004) The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research** 18(9), 713-717.

SIMÕES CMO (1999) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC.

Spironello WR, Sampaio PTB, Ronchi-Teles B (2004) Produção e predação de frutos em *Aniba rosaeodora* Ducke var. *amazonica* Ducke (Lauraceae) em sistema de plantio sob floresta de terra firme na Amazônia Central. **Acta Bot Bras** 18(4): 801-807.

Spitzer B, Zvi MMB, Ovadis M, Marhevka E (2007) Reverse genetics of floral scent: applications of TRV-based gene silencing in petunia. **Plant Physiol**, 145.

STEPHANOPOULOS GN (1998) **Metabolic Engineering Principles and Methodologies**. Academic Press, New York.

STRAPAZZON JO (2004) **Composição química e análise antimicrobiana do óleo volátil de *Annona squamosa* L. (Ariticum)**. Monografia (Conclusão do Curso de Graduação em Farmacia) - Universidade Comunitária Regional de Chapecó.

SUGAWARA Y (2000) Odor distinctiveness between enantiomers of linalool: difference in perception and responses elicited by sensory test and forehead surface potential wave measurement. **Chem. Senses** 25: 77-84.

TAIZ L, ZEIGER E (2006) **Plant Physiology**. California, Redwood City, Benjamim/Cummings: 705p.

WERFF HW, RICHTER HG (1996) toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.8, p. 419-432.

WINK M (2003) **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.

WANG H D-Y, LI B, HUANG J, LIU X, ZHOU Y, MOU Z, LI J (2005) Increased Expression of MAP KINASE KINASE7 Causes Deficiency in Polar Auxin Transport and Leads to Plant Architectural Abnormality in *Arabidopsis*. **Plant Cell**. 18(2): 308–320.

IJIMA Y, DAVIDOVICH-RIKANATI R, FRIDMAN E, GANG DR, BAR E, LEWINSOHN E, PICHERSKY E (2004) The Biochemical and Molecular Basis for the Divergent Patterns in the Biosynthesis of Terpenes and Phenylpropenes in the Peltate Glands of Three Cultivars of Basil. **Plant Physiology**, 136:3724-3736.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)