

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR VEGETAL

**Clonagem Molecular e Caracterização Funcional de Genes
Envolvidos na Biossíntese de Óleos Essenciais (Monoterpenos) em
*Eucalyptus grandis***

Sinara Artico

Acadêmica do Curso de Graduação em Ciências Biológicas
Bacharelado com Ênfase Molecular, Celular e Funcional

Trabalho apresentado como conclusão de curso
para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

ORIENTADOR: PROF. DR. GIANCARLO PASQUALI

Porto Alegre

Dezembro de 2007

BIO
BIO
405

Dissertação Revisada
e Aprovada,
Giancarlo Pasquali
05/12/2007



Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (LBMV) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS).

Fontes financiadoras deste trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agência financiadora da Bolsa de Iniciação Tecnológica Industrial (ITI); Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), agência fomentadora das atividades de pesquisa do Projeto GENOLYPTUS: Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucaliptus*, a partir de recursos financeiros oriundos dos Fundos Setoriais Verde-Amarelo e de Biotecnologia do Ministério da Ciência Tecnologia (MCT) e Empresas do Setor de Madeira, Celulose e Papel do Projeto Genolyptus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giancarlo Pasquali, por todos seus ensinamentos, sua atenção e dedicação para a realização deste trabalho.

À minha irmã, Simara, pelo companheirismo e por estar sempre pronta a ouvir os resultados dos meus experimentos dando eles certo ou não.

Às garotas do LBMV. À Gabi, pela amizade e disponibilidade sempre quando foi necessário. À Dani, pela orientação desde o primeiro dia até o último. À Michelle e Luisa, por todos os favores prestados e pelas dúvidas esclarecidas. À Fê Sperb, por todas as dicas e risadas. À Fê Bastolla, pela coragem e sinceridade. À Marina, por muitos momentos alegres. À Rochele, por todas as angústias e alegrias compartilhadas, como também pela doação das plantas de tabaco. À Andréia, pela parceria e por toda ajuda com os programas de análise de bioinformática. À Jaque, pelo apoio e pelas várias respostas as minhas dúvidas.

À Anne e à Renata, pelo indispensável auxílio com os experimentos de expressão e análise de proteínas.

À Tatiana Gregianini, por toda a disponibilidade e por acreditar tanto que os experimentos com *Psycotria* dariam certo.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial o LBMV, pela infra-estrutura.

Ao Projeto GENOLYPTUS e seus agentes financiadores Ministério da Ciência e Tecnologia (MTC) e Empresas de Celulose e Papel, por viabilizarem a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Iniciação Tecnológica Industrial.

Aos meus pais, que me proporcionaram todas as condições que estavam ao seu alcance para a realização deste projeto da minha vida.

Ao meu amor e grande amigo, Rafa, que mesmo achando que DNA não existe, sempre acreditou muito no meu trabalho. Obrigada por toda a compreensão nas minhas longas horas de ausência em função desse Projeto de Vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Metabolismo Secundário.....	12
2.2. Os terpenos.....	13
2.3. Existem duas Rotas de Biossíntese de Terpenóides.....	15
2.3.1. Rota citosólica dependente de mevalonato (MVA).....	17
2.3.2. Rota plastídica independente de mevalonato (não-MVA)	18
2.3.3. Controle da rota plastídica independente de mevalonato (não-MVA)	23
2.3.4. Distribuição das rotas de biossíntese de terpenóides na natureza.....	24
2.3.5. Engenharia metabólica da biossíntese de isoprenóides plastidiais.....	25
2.4. Óleos Essenciais (monoterpenos).....	27
2.4.1. Óleos essenciais de eucalipto.....	28
2.4.2. Principais espécies de eucalipto produtoras de óleo essencial no Brasil.....	30
2.5. Mercado Mundial do óleo essencial de eucalipto.....	33
2.6. Óleo Essencial de eucalipto no Brasil.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Seleção dos Clones.....	38
3.2. Novos Seqüenciamentos dos Clones Ligados ao Plasmídeo pSPORT1.....	39
3.3. Construção do Vetor Plasmidial Contendo o Gene <i>dxr</i> para expressão em <i>E. coli</i>	39
3.3.1. Ligação do inserto de cDNA e transformação de células termocompetentes de <i>E. coli</i>	40
3.3.2. Seleção das colônias transformadas.....	41
3.4. Expressão de DXR Recombinante em <i>E. coli</i>	41
3.4.1. Transformação das células competentes para expressão.....	41
3.4.2. Seleção de colônias recombinantes para expressão da proteína de fusão GST-DXR.....	42
3.4.3. Seqüenciamento do plasmídeo pGEX-4T-2:: <i>dxr</i> e análise da seqüência	42
3.5. Obtenção das Construções Senso e Anti-senso do Gene <i>dxr</i> para Expressão em Plantas.....	43
3.5.1. Ligação do inserto e transformação de células de <i>E. coli</i> termocompetentes.....	43

3.5.2. Seleção de colônias transformadas contendo os vetores binários para <i>A. tumefaciens</i>	43
3.6. Análises <i>in silico</i> da Sequência de DXR e Evolução Molecular.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Seleção de Clones e Ressequenciamento.....	45
4.2. Construção do Vetor Plasmidial Contendo <i>dxr</i> para Expressão em <i>E. coli</i>	46
4.3. Expressão de pGEX-4T-2:: <i>dxr</i> em <i>E. coli</i>	48
4.4. Expressão do Gene DXR em Plantas.....	50
4.5. Análises <i>in silico</i> da Sequência de DXR e Evolução Molecular.....	52
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7. ANEXOS.....	64

LISTAS DE ABREVIATURAS

ABA ácido abscísico

ATP trifosfato de adenosina

BLASTn Basic Local alignment search tool to nucleotids

tBLASTx Basic local alignment search tool to search translated nucleotide database using a translated nucleotide query

BR brassinosteróides

°C graus celsius

CaMV35S

Cys-Ser-(Ala/Met/Val/Thr) Cisteína-Serina-(Alanina/Metionina/Valina/Treonina)

CTP citidina trifosfato

CDP-ME 4-(difosfocitidil)-2-metil-D-eritritol

CDP-ME2P 4-(difosfocitidil)-2-metil-D-eritritol-2-fosfato

CDP-ME sintase 4-(difosfocitidil)-2-metil-D-eritritol sintase

CKs citocininas

CrtI caroteno desaturase

cm centímetro

DMAPP dimetilalil difosfato

dNTPs desoxirribonucleosídeo trifosfato

DXP ou DOXP 1-desoxixilulose-5-fosfato

DXS ou DOXS 1-desoxixilulose-5- fosfato sintase

DXR 1-desoxixilulose-5-fosfato reductoisomerase

ESTs – seqüência expressa marcada

GAS giberilinas

GGPP geranilgeranil difosfato

GPP geranil difosfato

GSTGSIGT Glicina Serina Treonina Glicina Serina Isoleucina Glicina Treonina

HMBPP 1-hidroxi-2-C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato

HMG-CoA éster de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HMGR 3-hidroxi-3-metilglutaril reductase
IMP isopentenil monofosfato
IPP isopentenil difosfato
IPPI isopentenil difosfato isomerase
IPTG Isopropil β -D-1-thiogalactosídeo
LB-ágar
MECP 2-C-metil-D-eritritol 2,4 ciclodifosfato
MDC difosfomevalonato descarboxilase
MEP 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato
MVA ácido mevalônico ou mevalonato
MVAP mevalonato-5-fosfato
MVAPP mevalonato-5-difosfato
NCBI National centre for biotechnology information
NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng nanogramas
PP (P/S) AWPG (R/T) Prolina Prolina (Prolina/Serina) Alanina Triptofano Prolina glicina (Arginina/
Treonina)
PSY1 fitoeno sintase
pmol picomol
RNase ribonuclease
SDS Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE Gel de poliacrilamida bidimensional -SDS
TPP tiamina difosfato
UV radiação ultravioleta
 μ L microlitros
Var variedade

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os terpenos, também chamados de isoprenóides ou terpenóides, constituem o maior grupo de produtos secundários em vegetais (revisado em Taiz & Zeiger, 2004). Tem sido estimado que existem mais de 30.000 compostos isoprenóides em plantas (revisado em Sacchettini & Poulter, 1997). Os terpenóides desempenham papel essencial em plantas como, por exemplo, hormônios (ácido abscísico ou ABA, giberilinas ou GAs), pigmentos fotossintetizantes (carotenóides, clorofilas), comunicação e defesa (óleos essenciais como eucaliptol, cineol, citronelol) e também como agentes antimicrobianos. Nas plantas, duas rotas levam à formação de isoprenóides: a rota citoplasmática dependente de mevalonato (MVA) e a rota plastídica independente de MVA, ou rota do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Muitas bactérias, arqueobactérias, leveduras, fungos, alguns protozoários e animais utilizam a rota MVA. Contudo, muitas bactérias (incluindo muitos patógenos humanos), algas verdes e possivelmente o parasita da malária *Plasmodium falciparum* fazem uso exclusivamente da rota MEP. *Streptomyces*, algumas algas, musgos, diatomáceas marinhas e plantas superiores utilizam ambas as rotas. Em plantas superiores a rota MVA opera no citoplasma e na mitocôndria onde esteróis, sesquiterpenos e ubiquinonas são formadas predominantemente via MVA. Isoprenóides sintetizados nos plastídeos como hemiterpenos, monoterpenos (óleos essenciais), diterpenos e carotenóides são formados predominantemente via rota MEP. A separação espacial das duas diferentes rotas de biossíntese de precursores de isoprenóides não é absoluta porque os metabólitos podem ser trocados entre os compartimentos celulares. A natureza das trocas de metabólitos entre os compartimentos e a regulação desse processo ainda não está estabelecida (revisado em Eisenreich *et al*, 2001).

Os monoterpenos, devido ao seu baixo peso molecular, costumam ser substâncias voláteis, sendo, portanto denominados óleos essenciais ou essências. Eles podem estar estocados em flores (laranjeira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou em cascas de caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa) e frutos (erva-doce; revisado em Peres, 2000).

Os óleos das folhas de eucalipto são formados por uma complexa mistura de 50 a 100 componentes, ou até mais, tratando-se de compostos orgânicos voláteis, dentre os quais destacam-se hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. Os óleos essenciais de eucalipto ocorrem principalmente nas folhas, onde são produzidos em pequenas cavidades globulares, chamadas glândulas. Estas glândulas encontram-se distribuídas em todo parênquima foliar da maioria das espécies de eucalipto (revisado em Doran, 1991).

No caso dos eucaliptos, especialmente, as referências são as de que a ocorrência do óleo essencial estaria relacionada com a defesa da planta contra insetos, resistência ao frio quando no estágio de plântula, ao efeito alelopático e à redução da perda de água (revisado em Doran, 1991). Entre as aproximadamente 600 espécies de *Eucalyptus* descritas, pouco mais de 200 foram examinadas com relação à produção e ao teor de óleos essenciais, e menos de 20 têm sido citadas como importantes à exploração comercial. Os óleos essenciais de eucaliptos estão divididos, basicamente em três grupos principais, em função do seu uso final, que são: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumaria (revisado em Penfold & Willis, 1991).

As principais espécies de *Eucalyptus* cultivadas no Brasil para a produção de óleo essencial são: *Eucalyptus citriodora*, o *Eucalyptus globulus* e o *Eucalyptus staigeriana*. Segundo dados obtidos junto a produtores nacionais, a estimativa nacional de produção anual de óleos de *E. staigeriana* era de 60 toneladas no final da década de 1990, sendo o mesmo comercializado por US\$-6,00/kg. Para o *E. citriodora*, a produção era estimada em 800 toneladas anuais, com preço no mercado nacional variando de R\$-8,00 a R\$-10,00/kg de óleo, e no mercado internacional variando entre US\$-4,5 a 5,00/kg de óleo (Vitti & Brito, 2003).

Em vista da relevância do eucalipto para a economia brasileira e mundial, principalmente no setor das empresas de celulose, papel e toras para os mais diversos fins comerciais, em fevereiro de 2002 foi iniciado um projeto visando o seqüenciamento de todos os genes expressos de espécies-chave desta arbórea. Este Projeto foi intitulado GENOLYPTUS: Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de *Eucalyptus*. Além do conhecimento do transcriptoma de *Eucalyptus*, com igual ênfase os pesquisadores envolvidos no Projeto possuem como foco análises genéticas a partir de diversos cruzamentos interespecíficos, marcadores moleculares e mapeamento genético, análises químicas e físicas da madeira, mapeamento físico do genoma, estudos moleculares, bioquímicos e fisiológicos da expressão gênica e da resposta dos vegetais a diferentes sinais ambientais e artificiais, todos integrados por ferramentas de bioinformática e análises estatísticas. O Projeto GENOLYPTUS foi financiado a partir de recursos dos Fundos Setoriais Verde-Amarelo e de Biotecnologia do Ministério da Ciência e Tecnologia (80%), e por recursos de 14 empresas do setor de celulose, papel e carvão (20%).

Junto ao Sub-projeto direcionado às análises do transcriptoma, várias bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de diferentes tecidos, órgãos e plântulas de diferentes espécies de *Eucalyptus*, permitindo a geração, a partir do seqüenciamento de clones de cDNA, de um banco com

cerca de 100.000 seqüências válidas depositadas, as denominadas regiões ou marcas de seqüências expressas ou ESTs (do inglês, *Expressed Sequence Tags*). Na segunda fase do Projeto, o Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da UFRGS, como um dos grupos integrantes do GENOLYPTUS, e juntamente com diversos outros laboratórios, passou à exploração dos dados disponíveis de seqüências nucleotídicas. Desta forma, genes potencialmente relacionados com características específicas, como a biossíntese de óleos essenciais, entre outras, puderam ser identificados na coleção de ESTs a partir da homologia de suas seqüências ou pelo padrão de suas expressões, e estudados para a comprovação de suas funções. Os genes identificados poderão ser, futuramente, utilizados para diversas finalidades como, por exemplo, o melhoramento de plantas por meio de suas super-expressões ou inibições por transgenia.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo a identificação de genes potencialmente relacionados à biossíntese de óleos essenciais em plantas de eucalipto e a caracterização funcional de pelo menos um dos clones identificados. Os objetivos específicos propostos ao desenvolvimento das pesquisas que culminaram na redação desta Dissertação de Bacharelado foram:

- A realização de um levantamento bibliográfico e a seleção, na literatura, de genes candidatos, potencialmente relacionados à biossíntese de óleos essenciais;
- A recuperação, a partir da seleção dos plasmídeos de clonagem pSPORT1 (Invitrogen) purificados do projeto GENOLYPTUS, do(s) clone(s) selecionado(s), e a obtenção e a caracterização da seqüência completa do(s) mesmo(s);
- A expressão heteróloga do gene selecionado, *dxr*, que codifica desoxixilulose-5-fosfato reductoisomerase, fusionado a GST em *E.coli*;
- A obtenção de vetores binários portando os cassetes de expressão de *dxr* em orientações senso e anti-senso sob o controle do promotor do gene codificador do RNA 35S do vírus-do-mosaico-da-couve-flor (CaMV 35S) para a geração de plantas transgênicas de tabaco;
- A análise *in silico* da estrutura do gene *dxr*.

Assim, uma cuidadosa revisão bibliográfica, que constitui o Capítulo 2 da presente Monografia, foi realizada visando identificar as principais classes de genes vegetais potencialmente relacionados com a biossíntese de óleos essenciais. Entre diversos genes candidatos identificados,

aquele que representou a melhor opção de estudo foi o gene codificador da enzima desoxilulose-5-fosfato redutoisomerase (DXR). Os resultados das análises do gene, *dxr*, constituem, assim, o foco principal da presente Monografia, conforme descritos nos Capítulos 3 e 4.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Metabolismo Secundário Vegetal

Devido à sua condição sésil, as plantas precisam desenvolver estratégias para melhor desempenhar suas funções ecológicas como, por exemplo, atrair animais polinizadores e dispersores de sementes (pássaros e insetos), proteger-se da radiação ultravioleta (UV) e defender-se de herbívoros, insetos, microrganismos e parasitas. Além disto, as plantas competem ativamente por espaço, luz, água e nutrientes. As alternativas de que as plantas dispõem nestas situações estão, entre outras, baseadas na produção de metabólitos secundários. Os metabólitos secundários, portanto, são compostos fundamentais à adaptação, à sobrevivência e à evolução dos organismos vegetais como um todo, porém não são considerados essenciais às células individualmente, para diferenciá-los dos metabólitos primários que incluem (desoxi) ribonucleotídeos, aminoácidos protéicos, ácidos graxos e açúcares, entre outros. Assim, os metabólitos secundários são representados pelos alcalóides, terpenóides, flavonóides, glicosinolatos, glicosídeos cianogênicos, aminoácidos não-protéicos e taninos, entre outros. Muitos destes metabólitos têm funções biológicas conhecidas como pigmentos e aromas envolvidos na atração de animais polinizadores e dispersores, ferormônios, aleloquímicos, ou como agentes antinutricionais e antimicrobianos (revisado em Roberts & Wink, 1998). Os metabólitos secundários estão presentes em todas as espécies de plantas superiores apresentando uma alta diversidade estrutural. Via de regra, alguns grupos destes compostos são dominantes dentro de um certo táxon e, dentro de uma mesma planta, o padrão de distribuição dos metabólitos secundários é complexo, variando entre diferentes órgãos e tecidos, estádios de desenvolvimento, entre indivíduos e entre populações (revisado em Wink, 2003).

Vários compostos de origem vegetal e classificados como metabólitos secundários possuem considerável valor econômico e são extensivamente utilizados na indústria farmacêutica, em alimentos na forma de flavorizantes, fragrâncias em cosméticos e alimentos ou, ainda, como aditivos alimentares. O uso de produtos naturais pelo ser humano pode ser considerado como uma exploração das propriedades que originalmente foram selecionadas e desenvolvidas pelas plantas em um contexto ecológico e/ou evolutivo diferente. Desde os tempos antigos, as plantas vêm sendo utilizadas nas sociedades humanas com propósitos terapêuticos, sendo que suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas pelo homem principalmente quando este buscava por alimento. O uso de plantas

na medicina tradicional ainda engloba cerca de 85 % dos tratamentos utilizados em países em desenvolvimento (revisado em Pezzuto, 1997).

Estima-se que apenas cerca de 13.000 espécies de plantas têm sido utilizadas com fins medicinais, constituindo-se uma parcela inferior a 10% do total de espécies conhecidas. Destas, cerca de 25 % aproximadamente dos medicamentos de uso terapêutico são derivados de plantas e muitos outros são utilizados como compostos puros ou como chás e extratos. Além disso, constituintes de plantas têm também servido como modelos para drogas modernas como a atropina para tropicamida, quinino para cloroquina e a cocaína para a procaína e a tetracaína (revisado Kutchan, 1995).

2.2 Os Terpenos

Os terpenos, também chamados de isoprenóides ou terpenóides, constituem o maior grupo de produtos secundários vegetais (revisado em Taiz & Zeiger, 2004). Tem sido estimado que existem mais de 30.000 compostos isoprenóides em plantas (revisado em Sacchettini & Poulter, 1997).

Todos os terpenos derivam da união e de unidades pentacarbonadas de isopreno e são classificados pelo número de unidades de isopreno que possuem (Tabela 1). Os terpenos de 10 carbonos, que contêm 2 unidades de C₅ (isopreno), são chamados de monoterpenos; os de 15 carbonos (3 unidades de C₅) são os sesquiterpenos e os terpenos de 20 carbonos (4 unidades de C₅), os diterpenos. Os maiores terpenos incluem o triterpenos (30 carbonos) são o resultado da junção de duas moléculas de C₁₅, os tetraterpenos (C₄₀) pela união de duas moléculas de 20 carbonos, e os polisoprenos ([C₅]_n carbonos, onde n>8: revisado em Peres, 2000).

Tabela 1. Principais terpenóides encontrados em plantas. Notar que os terpenóides são precursores de quatro classes hormonais: as citocininas (CKs), o ácido abscísico (ABA), as giberelinas (GAs) e os brassinosteróides (BR). Adaptado de Peres, 2000.

# Isoprenos	# Átomos de C	Nome	Exemplos
1	5	Isopreno	Cadeia lateral das CKs
2	10	Monoterpeno	piretróides e óleos essenciais
3	15	Sesquiterpeno	ABA, lactonas
4	20	Diterpeno	GAs, taxol
6	30	Triterpeno	Esteróides (BR), saponinas
8	40	Tetraterpeno	Carotenóides
N	N	Polisopreno	Borracha

Os terpenóides desempenham papel essencial em plantas. Os monoterpenos, devido ao seu baixo peso molecular, são normalmente substâncias voláteis e denominados óleos essenciais ou essências, e atuam na comunicação e defesa das plantas (revisado em Peres, 2000).

Os sesquiterpenos também são voláteis e estão envolvidos na defesa a pragas e doenças. Dois exemplos de sesquiterpenos incluem, o gossipol (dímero de C_{15}), 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 richitina de tomateiro. O hormônio ABA é um terpeno de C_{15} , produzido pela degradação de um precursor de carotenóides e desempenha um importante papel na dormência de sementes e gemas, bem como nas respostas ao estresse hídrico (revisado em Taiz & Zeiger, 2004).

Os diterpenos normalmente estão associados às resinas de muitas plantas. Um exemplo é a resina cicatrizante de *Hymenaea courbaril*. Contudo, o principal papel conhecido desempenhado por um diterpeno seja o das GAs, as quais são importantes hormônios vegetais responsáveis pela germinação de sementes, indução da floração, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais (revisado em Taiz & Zeiger, 2004).

Entre os triterpenos está uma importante classe de substância tanto para vegetais quanto para animais. Trata-se dos esteróides, os quais são componentes dos lipídeos de membranas e precursores de hormônios esteróides em mamíferos (testosterona, progesterona), plantas (brassinosteróides) e insetos (ecdisteróides). Uma outra classe importante de triterpenos são as saponinas. Como o próprio nome indica, as saponinas são prontamente reconhecidas pela formação de espuma em certos extratos vegetais. Essas substâncias são semelhantes ao sabão porque possuem uma parte solúvel (glicose) e outra lipossolúvel (triterpenos). Nas plantas, as saponinas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microrganismos. Isso pode ocorrer de diversos modos. Uma delas é a complexação das saponinas com esteróides dos fungos, tornando-os indispensáveis. As plantas também podem desenvolver saponinas como análogos de hormônios esteróides de insetos. Esses análogos, denominadas fitoecdisonas, interferem no desenvolvimento dos insetos, tornando-os estéreis. Há, inclusive, a possibilidade de plantas sintetizarem hormônios animais a partir de saponinas. Isso tem ocorrido com a saponina diosgenina, derivada de *Dioscorea macrostachya*, ou inhame, para a produção industrial da progesterona. A produção industrial de hormônios animais a partir de saponinas vegetais causou uma significativa mudança no comportamento da sociedade contemporânea, pois foi a base da produção dos anticoncepcionais. As saponinas vêm sendo

utilizadas pelo homem em diferentes aplicações como inseticidas naturais (azadiractina) e remédios (protapanaxodiol e glicirrizina). Um outro exemplo de triterpeno é o colesterol, um importante componente das membranas celulares e precursor de hormônios esteróides com efeitos marcantes em animais vertebrados (revisado em Peres, 2000).

Os tetraterpenos mais famosos são, sem dúvidas, os carotenos e as xantofilas. Estes componentes lipossolúveis desempenham um importante papel tanto nas plantas quanto nos animais. Nas plantas, os carotenóides fazem parte das antenas de captação de luz nos fotossistemas. Portanto, não haveria fotossíntese sem a interveniência marcante dos carotenóides. Além disto, esses compostos são importantes antioxidantes e dissipadores de radicais livres gerados pela fotossíntese. Embora os vertebrados não sejam capazes de sintetizar carotenóides, estes compostos desempenham importantes papéis no metabolismo animal. Além do β -caroteno ser precursor da vitamina A (retinal), outros carotenóides como licopeno são importantes dissipadores de radicais livres nos animais (revisado em Peres, 2000).

Por fim, o último grupo de terpenóides é composto pelos polisoprenos. Entre estes compostos está a borracha: um terpeno formado por 1.500 a 15.000 unidades de isopreno. A borracha está presente no látex de diversas plantas, sendo a mais importante a seringueira (*Evea brasiliensis*: revisado em Peres, 2000).

2.3 Existem duas Rotas de Biossíntese de Terpenóides

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por, no mínimo, duas rotas diferentes em plantas. Na rota do ácido mevalônico (MVA), três moléculas de acetil-CoA são ligadas, a partir de uma série etapas da rota para formar o MVA (Figura 1). Esse importante intermediário de seis carbonos é então pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir isopentenil difosfato (IPP). O IPP é a unidade ativa básica na formação dos terpenos. Recentemente, foi descoberto que o IPP também pode ser formado a partir de intermediários da glicólise ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, por meio de um conjunto de reações denominado rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e em outros plastídeos. Esta rota também é chamada de “rota do desoxixilulose-5-fosfato” (DXP ou DOXP), um importante intermediário da rota, como também de “rota independente de MVA” (Figura 1). Embora nem todos os detalhes tenham sido esclarecidos, o gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato

parecem combinar-se para formar um intermediário que, eventualmente, é convertido em IPP (revisado em Dubey *et al.*, 2003).

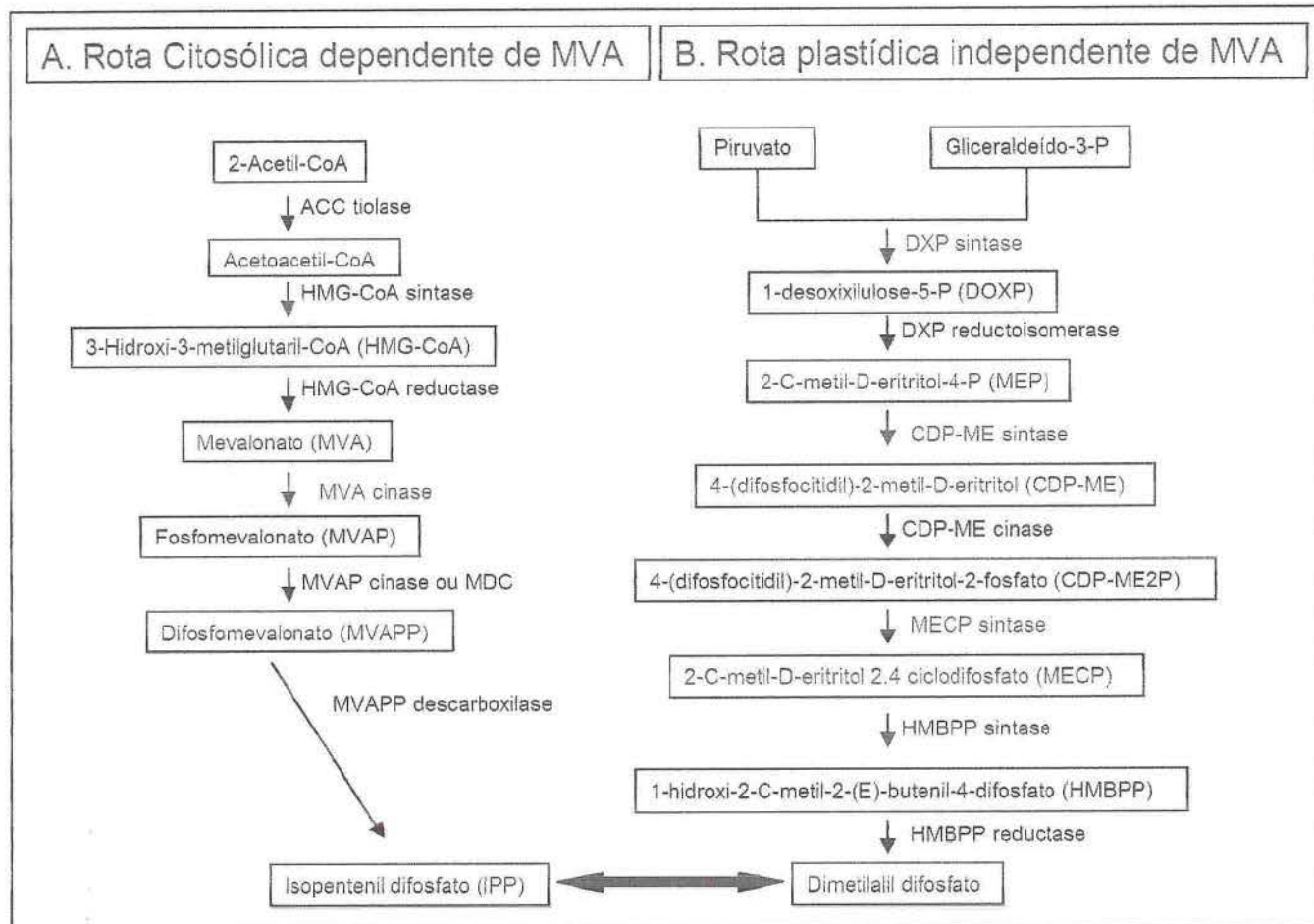


Figura 1. Duas rotas independentes são conhecidas para a biossíntese de isoprenóides em vegetais. A. Rota citosólica dependente de mevalonato (MVA). B. Rota plastídica independente de MVA. As setas sólidas indicam conversões enzimáticas simples. Adaptado de Dubey *et al.*, (2003).

O IPP e seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP), são as unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente, IPP e DMAPP reagem e formam geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos a partir da qual são formados os monoterpênicos (Figura 2). O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, o farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Finalmentê, FPP e o GPP podem dimerizar-se

para formar triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), respectivamente (revisado em Taiz & Zeiger, 2004).

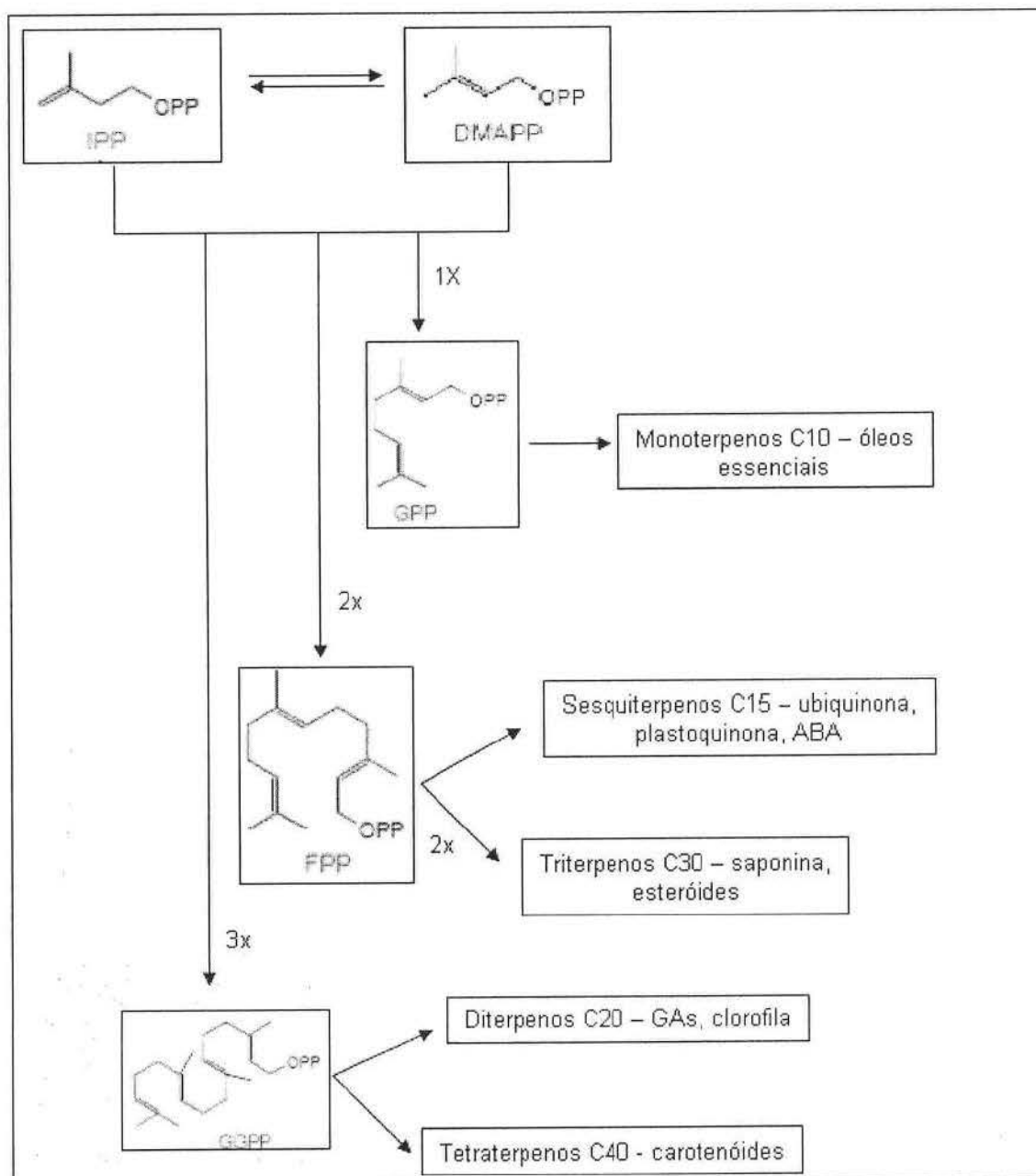


Figura 2. Síntese de várias classes de terpenóides em plantas. Adaptado de Mahmoud & Croteau (2002).

2.3.1 Rota citosólica dependente de mevalonato (MVA)

No passado, assumia-se que todos os terpenóides eram sintetizados a partir do ácido mevalônico ou mevalonato (MVA) no citosol (revisado em Chappell, 1995).

Em plantas superiores, a rota MVA está localizada no citoplasma e nas mitocôndrias. A rota MVA é responsável pela formação de esteróis, triterpenos, ubiquinonas e sesquiterpenos (revisado em Pang *et al.*, 2006). A rota clássica dependente de MVA envolve a condensação de três unidades de acetil-CoA para formar o éster de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Este produto é subsequentemente reduzido para produzir MVA. A seguir, o MVA é transformado a IPP por 3 passos seqüenciais envolvendo fosforilação e descarboxilação (Figura 1A). A redução de HMG-CoA a MVA é catalisada pela HMG-CoA reductase (HMGR), uma enzima-chave reguladora dessa rota que está sendo intensivamente estudada (revisado em Rodwel *et al.*, 2000). Seguindo a rota, a MVA cinase catalisa a fosforilação de MVA a mevalonato-5-fosfato (MVAP) que é convertido a mevalonato-5- difosfato (MVAPP) pela ação da enzima fosfomevalonato cinase (MVAP cinase). A MVAPP descarboxilase (MDC) catalisa o último passo da rota, convertendo MVAPP, uma molécula de 6 carbonos, em IPP contendo 5 carbonos, o qual é o esqueleto básico para a biossíntese dos terpenos. A descarboxilação catalisada pela MDC é acompanhada pela hidrólise de uma molécula de ATP na presença de Mg^{+2} (revisado em Pang *et al.*, 2006).

O passo seguinte crucial para a biossíntese de isoprenóides é a isomerização de IPP a dimetilalil difosfato (DMAPP). Esta conversão é catalisada pela IPP isomerase (IPPI). A IPPI do tipo I (IPPI I) foi descoberta em 1950 e é encontrada em eucariotes e bactérias. Esta enzima requer um cátion divalente e catalisa a isomerização de IPP a DMAPP por um mecanismo de protonação-desprotonação. A IPPI do tipo II (IPPI II) é encontrada em bactérias e arqueobactérias e requer a redução de uma flavina e um metal divalente como cofatores para sua atividade (revisado em Pang *et al.*, 2006).

2.3.2 Rota plastídica independente de mevalonato (não-MVA)

Depois da descoberta de uma rota independente de MVA em plastídeos, também denominada de rota MEP ou rota DXP/DOXP como explicado a seguir, extensos estudos têm sido feitos para elucidar os complexos passos enzimáticos envolvidos nessa rota em plantas. A existência de uma rota alternativa para a biossíntese de IPP foi primeiro demonstrado por Rohmer em diferentes espécies de bactérias (revisado em Rohmer, 1999). Vários genes, enzimas e intermediários envolvidos na rota de

2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) foram primeiro descobertos em *E. coli* e extensivamente estudados, mas alguns genes ortólogos codificando várias enzimas da rota MEP também foram demonstrados em espécies de plantas (Tabela 2). A existência de uma rota MEP que sintetiza uma variedade de terpenóides tem sido demonstrada em diversas espécies de plantas como pode ser visto na Tabela 3, (revisado em Durbey *et al.*, 2003).

Tabela 2. Enzimas da rota MEP caracterizadas em várias espécies de plantas. Modificado de Dubey *et al.*, (2003).

Enzima	Espécie de plantas
DXP sintase	<i>A. thaliana</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Catharanthus roseus</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Mendicago trunculata</i>
DXP reductoisomerase	<i>A. thaliana</i> , <i>C. roseus</i> , <i>M. piperita</i>
CDP-ME sintase	<i>A. thaliana</i> , <i>Capsicum annuum</i>
CDP-ME cinase	<i>L. esculentum</i> , <i>M. piperita</i>
MECP sintase	<i>C. roseus</i>
HMBPP sintase	<i>A. thaliana</i>
HMBPP reductase	<i>C. annuum</i>

Tabela 3. Terpenóides sintetizados a partir da rota MEP em várias espécies de plantas. Modificado de Dubey *et al.* (2003).

Terpenóides	Espécies de Plantas
Hemiterpenos	
Isopreno	<i>Chidonium majus</i> , <i>Populus nigra</i> , <i>Salix viminalis</i>
Monoterpenos	
Borneol	<i>Conicum</i>
Cineole	<i>Eucalyptus globulus</i>
Geraniol	<i>Pelargonium graveolens</i> , <i>Vitis vinifera</i>
Linalil acetato	<i>Mentha citrata</i>
Mentona, Mentol, Mentofuram	<i>M. piperita</i>

Pulegone	<i>M. pulegium</i>
Timol	<i>Thymus vulgaris</i>
Diterpenos	
Taxol	<i>Taxus chinensis</i>
β -Caroteno	<i>Capsicum annum</i>
	<i>Catharanthus roseus</i>
Licopeno	<i>Lycopersicum esculentum</i>

O primeiro passo da rota independente de MVA é a síntese de 1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP), o qual é catalisado por uma enzima dependente de tiamina difosfato (TPP), a 1-desoxixilulose-5-fosfato sintase (DXS ou DOXS). A DXS realiza uma descarboxilação do tipo transcetolase a partir de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Figura 1B). Pesquisas em bancos de dados genômicos revelaram supostos genes ortólogos a *dxs* em certas espécies de plantas. Diversos grupos têm independentemente isolado e clonado genes que codificam DXS de várias plantas como *Mentha piperita* (revisado em Lange *et al.*, 1998), *Capsicum annum* (revisado em Bouvier *et al.*, 1998) e *Catharanthus roseus* (revisado em Veau *et al.*, 2000). Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *cla1* encontrado demonstrou alta similaridade com DXS de outras plantas estudadas e sua suposta localização plastídica foi demonstrada (revisado em Araki *et al.*, 2000). Estudos detalhados demonstraram que DXS requer TPP e cátions divalentes como Mg^{2+} ou Mn^{2+} para sua atividade. Os genes que codificam essas proteínas de várias espécies de plantas estão no genoma nuclear. As seqüências protéicas codificadas são precedidas por uma suposta seqüência-alvo ou peptídeo-líder N-terminal que as direciona aos plastídeos (revisado em Dubey *et al.*, 2003).

Diversos estudos apóiam o papel de DXS em controlar a biossíntese de várias classes de terpenóides em plantas. Uma correlação positiva foi sugerida entre o nível de transcritos e proteínas DXS e a acumulação de vários produtos isoprenóides plastidiais em plantas de *Arabidopsis* modificadas geneticamente pela superexpressão ou inibição do gene *dxs*. (revisado em Estéves *et al.*, 2001). Outra correlação positiva similar foi encontrada entre transcritos de *dxs* e produção de isoprenóides específicos em várias plantas, como a produção de licopeno em tomates (*Lycopersicum esculentum*) durante o amadurecimento dos frutos (revisado em Lois *et al.*, 2000) e a produção de alcalóides indólicos terpênicos em suspensão de células de *C.roseus* sob indução hormonal (revisado em Chahed *et al.*, 2000).

No segundo passo da rota independente de MVA, DXP é transformado em 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (Figura 1B). A formação de MEP a partir de DXP envolve um rearranjo intramolecular e um passo de redução catalisado pela enzima 1-desoxixilulose-5-fosfato reductoisomerase (DXR) na presença de NADPH (Figura 3).

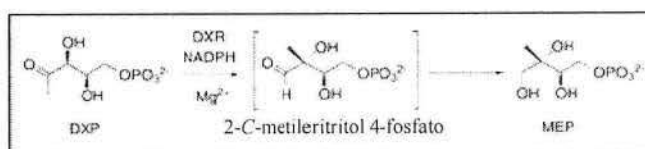


Figura 3. Conversão de DXP a MEP mediado por DXR.

Em plantas, dois diferentes grupos clonaram ao mesmo tempo genes que codificam DXR de *A. thaliana* (revisado em Schwender *et al.*, 1999) e *M. piperita* (revisado em Lange & Croteau, 1999a) e expressaram estes em *E.coli*. Mais recentemente, Carretero-Paulet *et al.* (2002) clonaram o cDNA de um gene de cópia única de *A. thaliana* que codifica DXR, e a análise da seqüência de sua proteína prevê a presença de um peptídeo N-terminal para localização no plastídeo, com um sítio de clivagem conservado e uma região conservada rica em prolinas na região N-terminal da proteína madura (revisado em Carretero-Paulet *et al.*, 2002). Em plantas transgênicas de menta (*M. piperita*), a super-expressão de DXR levou a um aumento em monoterpenos em folhas, comparado com plantas do tipo selvagem e, de uma forma oposta, o silenciamento parcial do gene *dxr* levou à redução do acúmulo de óleos essenciais (revisado em Mahmoud & Croteau, 2001).

As propriedades cinéticas da enzima DXR de *M. piperita* têm demonstrado que a enzima pode ser inibida por fosmidomicina, como documentado em outras espécies de plantas (revisado em Zeidler *et al.*, 1998).

O próximo passo da rota é a conversão de MEP a 4-(difosfocitidil)-2-metil-D-eritritol (CDP-ME) em uma reação dependente de citidina trifosfato (CTP) realizada pela CDP-ME sintase (Figura 1B). Em plantas, o gene que codifica a CDP-ME sintase foi primeiro clonado a partir de *Arabidopsis*, e um fragmento que codifica a seqüência-alvo potencial de plastídeo da proteína foi expressa em *E. coli* recombinante. Estudos têm demonstrado que CDP-ME marcado radioativamente é incorporado eficientemente em carotenóides de pimenta vermelha (*C. annum*), demonstrando o papel essencial desta enzima como similar a CDP-ME sintase de *A.thaliana* (revisado em Herz *et al.*, 2000). A enzima de *Arabidopsis* requer um cátion divalente, preferencialmente Mg⁺² e a análise

seqüência da proteína de *Arabidopsis* revelou uma suposta seqüência de importação para o plastídeo (revisado em Dubey *et al.*, 2003).

O passo mais distante da rota é a fosforilação do grupo 2-hidroxi de CDP-ME para formar 4-(difosfocitidil)-2-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-ME2P) pela reação da enzima CDP-ME cinase (Figura 1B). Há poucos estudos em plantas que demonstram o possível papel da CDP-ME cinase na formação de CDP-ME2P, e a completa enzimologia e análise molecular dessa enzima também não está disponível. O C₁₄ de CDP-ME (o substrato para CDP-ME cinase) foi eficientemente incorporado a carotenóides em *C. annuum*, sugerindo um possível papel dessa enzima. A enzima parcialmente purificada a partir de *M. piperita* exibiu a fosforilação de isopentenil monofosfato (IMP) para IPP. Isto permitiu concluir que esta enzima realiza o passo final na biossíntese de IPP. Da mesma forma, a mesma CDP-ME cinase de tomate e *E.coli*, não demonstraram esse passo catalítico (revisado em Rhodich *et al.*, 2000b). Genes ortólogos de tomate e *M.piperita* carregam uma suposta seqüência alvo para plastídeo e um suposto sítio de ligação para ATP (revisado em Dubey *et al.*, 2003).

O próximo passo da rota MEP é a transformação de CDP-ME2P em um intermediário cíclico denominado 2-C-metil-D-eritritol 2,4 ciclodifosfato (MECP), catalisada pela MECP sintase. O gene que codifica esta enzima foi isolado de *Arabidopsis*, mas a enzima não foi completamente caracterizada, sugerindo que a cinase de *M. piperita*, que catalisa a fosforilação de IMP para IPP, seria a enzima final que completa a rota IPP. De qualquer forma, dois passos de desidratação e dois passos de redução podem ser requeridos na formação de IPP e DMAPP. Poucos estudos em *E. coli* sugerem a conversão de MECP para IPP e DMAPP por meio de um intermediário 1-hidroxi-2-C-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (HMBPP), envolvendo passos subsequentes catalisados por duas enzimas a HMBPP sintase e a HMBPP reductase. A análise da seqüência de aminoácidos revelou um gene ortólogo codificando HMBPP sintase em *A. thaliana* que é altamente homólogo ao gene *ispG* de *E. coli* o qual catalisa a reação de conversão de MECP para HMBPP por ação da HMBPP sintase. Adam *et al.*, (2002) demonstraram que a baixa atividade catalítica de cromoplastos isolados de pimenta vermelha (*C. annuum*) foi aumentada pela adição da proteína HMBPP reductase purificada a partir de *E. coli*.

Um detalhado conhecimento sobre os genes, enzimas e intermediários das reações da rota independente de MVA pode conduzir ao desenvolvimento de novas drogas derivadas de plantas de origem terpenóide e produção de vários terpenos importantes comercialmente em plantas por meio da biotecnologia moderna (revisado em Dubey *et al.*, 2003). Pesquisas futuras devem direcionar-se

para elucidar passos enzimáticos individuais entre DXP e IPP, caracterizando os genes e enzimas correspondentes e avaliar a regulação da rota DXP com respeito a outras rotas metabólicas no cloroplasto. Finalmente, também deve ser examinada a possibilidade de uma cooperação parcial das duas rotas celulares de produção de IPP. MVA e DXP na biossíntese de terpenóides em plantas. Enzimas da rota DXP representam alvos para novos inibidores. Pode-se antecipar o desenvolvimento de novos herbicidas contra plantas e algas assim como substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas que possuem a rota DXP (revisado em Lichtenthaler, 1999). Adicionalmente, o rápido aumento da resistência de patógenos humanos às drogas disponíveis gera urgência na demanda por novas substâncias terapêuticas. A rota DXP é empregada por muitos microrganismos patogênicos, assim como pelo *Plasmodium falciparum*. Esta rota não ocorre em humanos e animais. Isto torna a rota DXP de biossíntese de isoprenóides um alvo ideal para o desenvolvimento de novos antibióticos e drogas anti-malária. Em plantas, a inibição da rota DXP pode ser a base para o desenvolvimento de novos herbicidas. O conhecimento detalhado do mecanismo e da regulação dessa rota poderá beneficiar a produção biotecnológica de isoprenóides de interesse comercial como óleos essenciais, carotenóides, clorofila e hormônios vegetais (revisado em Eisenreich *et al.*, 2001).

2.3.3 Controle da rota plastídica independente de MVA

Embora a maioria dos genes e das enzimas da rota DXP tenham sido identificados em plantas, seus papéis no controle do fluxo de metabólitos permanecem não esclarecidos. Resultados têm demonstrado que DXS, DXR e HMBPP reductase podem contribuir para o controle dessa rota metabólica. Conforme descrito anteriormente, Estévez *et al.*, (2001) manipularam a expressão do gene *dxs* em *Arabidopsis* e descreveram que a super-expressão de DXS leva a um aumento na produção de isoprenóides, enquanto que a supressão de *dxs* leva à diminuição da quantidade de produtos terpenóides finais. Assim, DXS é uma enzima limitante na produção de IPP plastidial. Durante o desenvolvimento de frutos de tomate, o padrão de expressão de DXS foi quase idêntico ao padrão de acumulação de carotenóides, exceto no último estágio de amadurecimento. Experimentos com adição de DXP promoveram um aumento da atividade de DXS, resultando em super-regulação da expressão de fitoeno sintase (PSY1), a primeira enzima da biossíntese de carotenóides, e, eventualmente, de DXS, e o aumento de carotenóides em frutos. Estes resultados indicam que a atividade de DXS é realmente o primeiro passo potencialmente regulador da biossíntese de carotenóides em frutos (revisado em Lois *et al.*, 2000).

A DXR demonstrou ser uma enzima comprometida com a rota MEP em *Arabidopsis*. O padrão de expressão do gene *dxr*, avaliado por ensaios histoquímicos de plantas transgênicas contendo o promotor de *dxr* unido ao gene codificador da β -glicuronidase (*gusA*), demonstrou uma distribuição de transcritos e da proteína DXR com regulação pelo desenvolvimento e condições ambientais. O bloqueio da rota MEP por fosmidomicina levou a uma rápida acumulação da proteína DXR, o qual é consistente com o papel regulatório de DXR na rota MEP (revisado em Liu *et al.*, 2005).

A HMBPP reductase catalisa a síntese simultânea de IPP e DMAPP no último passo da rota MEP. Botella-Pavia *et al.*, (2004) demonstraram que a HMBPP reductase desempenha um papel chave no controle da produção de precursores derivados de MEP para a biossíntese de isoprenóides plastidiais. Durante o desenvolvimento de frutos de tomate e de *Arabidopsis*, transcritos de HMBPP reductase foram rapidamente e fortemente acumulados. A super-expressão em *Arabidopsis* do cDNA de tomate que codifica a HMBPP reductase demonstrou altos níveis de carotenóides e um aumento na dormência de sementes, o qual foi provavelmente causado pelo aumento no nível de ABA. Plantas duplo-transgênicas de *Arabidopsis* super-expressando ambos os genes codificadores de HMBPP reductase e taxadieno sintase demonstraram um forte efeito da HMBPP reductase em aumentar os níveis de taxadieno. A taxadieno sintase catalisa a produção de taxadieno a partir de GGPP.

2.3.4 Distribuição das rotas de biossíntese de terpenóides na natureza

Muitas bactérias, arqueobactérias, leveduras, fungos, alguns protozoários e animais utilizam a rota MVA. Contudo, muitas bactérias (incluindo muitos patógenos humanos), algas verdes e possivelmente o parasita da malária *P. falciparum* fazem uso exclusivamente da rota MEP. *Streptomyces*, algumas algas, musgos, diatomáceas marinhas e plantas superiores utilizam ambas as rotas. Finalmente, a capacidade para biossintetizar precursores de isoprenóides está ausente em alguns microrganismos parasitas que podem ser capazes de utilizar terpenóides a partir dos seus hospedeiros (tabela 4; revisado em Lichtenthaler, 1999).

Em plantas superiores, a rota MVA opera no citoplasma e na mitocôndria onde esteróis, sesquiterpenos e ubiquinonas são predominantemente formadas via MVA. Isoprenóides sintetizados nos plastídeos como hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos e carotenóides são formados predominantemente via DXP. A separação espacial das duas diferentes rotas de biossíntese de IPP

não é absoluta porque os metabólitos podem ser trocados entre os compartimentos celulares. A natureza das trocas de metabólitos entre os compartimentos e a regulação desse processo ainda não está estabelecida (Eisenreich, 2001).

Tabela 4. Formação de isoprenóides em plantas e organismos fotossintetizantes pela rota dependente de MVA ou pela rota DOXP ou independente de MVA. Adaptado de Lichtenthaler (1999).

Organismo	Isoprenóides	Rota IPP
Cianobactéria (<i>Synechocystis</i>)	Fitol, β -caroteno	DXP
Algas verdes (<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Clorella fusca</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	Fitol, β -caroteno, luteína, plastoquinona-9, ubiquinona-10	DXP
Algas vermelhas (<i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Euglena gracilis</i>)	Fitol, ergosterol	DXP
Plantas superiores (<i>Lemna gibba</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Hordéum vulgare</i>)	Fitol, β -caroteno, PQ-9, sitosterol, stigmasterol, campesterol	DXP, MVA

2.3.5 Engenharia metabólica da biossíntese de isoprenóides plastidiais

A recente elucidação da rota DXP e a clonagem dos genes envolvidos têm permitido a manipulação genética dessa rota plastidial. O gene que codifica a primeira enzima da rota, DXS, tem sido constitutivamente super-expresso em *Arabidopsis* (Estévez *et al.*, 2001). Outro exemplo de sucesso da engenharia metabólica de isoprenóides plastidiais é a modificação genética da rota de monoterpenos em *Mentha x piperita* L.. Croteau *et al.*, (2001) desenvolveram com sucesso um sistema modelo para a investigação do metabolismo e regulação de monoterpenos em *Mentha x piperita*. Como já descrito a conversão de DXP em MEP catalisada por DXR é um passo importante na biossíntese de monoterpenos. A super-expressão de DXR pode aumentar a produção de óleos

essenciais, principalmente monoterpenos. O mentofurano é um indesejável componente de monoterpenos e influencia na qualidade de óleos essenciais. Mahmoud & Croteau (2001) relataram que o cDNA de DXR e um cDNA anti-senso da mentofurano sintase foram transferidos para *Mentha x piperita*, independentemente. Dois diferentes grupos de plantas transgênicas foram regeneradas nos experimentos de reductoisomerase. Um grupo com aparência normal cresceu e acumulou mais óleos essenciais (aproximadamente um aumento de 50%) sem mudar a composição de monoterpenos. O outro grupo foi deficiente na produção de clorofila, cresceu vagarosamente e produziu menos óleos essenciais devido à co-supressão do gene *dxr*. Plantas expressando o cDNA anti-senso da mentofurano sintase exibiram aparência normal e produziram menos que a metade destes monoterpenos indesejáveis que compõem os óleos. Estes experimentos demonstram que a super-expressão de um gene importante da rota de biossíntese de isoprenóides plastidial pode melhorar o fluxo de produtos finais e a supressão anti-senso de um passo selecionado de biossíntese pode melhorar a composição dos produtos de interesse comercial.

Nos últimos anos, o metabolismo de plantas com alto potencial de beneficiar a saúde humana está sendo modificado com sucesso. A maioria dos trabalhos tem sido apresentada com foco na rota de síntese de carotenóides, primariamente devido à fácil seleção pela cor e, também, por ser esta uma rota de síntese de carotenóides bem conhecida. A modificação do metabolismo vegetal para altos níveis de β -caroteno no endosperma de arroz é um dos exemplos de sucesso. O β -caroteno (pró-vitamina A) é o principal precursor do retinol. A avitaminose A pode levar à cegueira total e é um mal amplamente distribuído em países em desenvolvimento. Os humanos não sintetizam carotenóides, e, por isto, dependem da ingestão diária para fabricar os retinóides. Em arroz, os carotenóides acumulam-se junto com as clorofilas nos cloroplastos das folhas, mas não nos cromoplastos de sementes. O endosperma imaturo de arroz é livre de carotenóides, mas é capaz de sintetizar estes compostos a partir do intermediário geranylgeranildifosfato (GGPP). Contudo, quatro novas enzimas são necessárias para a síntese de β -caroteno no endosperma: PSY, fitoeno desaturase, caroteno desaturase (CrtI), e licopeno β -ciclase. Plantas transformadas com os genes *psy* e *crtI* acumularam maiores níveis de β -caroteno e também de luteína e zeaxantina (Fray *et al.*, 1995).

A rota plastídica DXP também foi modificada para aumentar o aroma e o sabor de frutos em amadurecimento. O linalol é um dos dez mais importantes compostos voláteis que influenciam a qualidade do sabor de tomates. Lewinsohn *et al.*, (2001) especificamente expresaram uma S-linalol sintase em frutos de duas variedades de tomates, destituídas de linalol. Os frutos das plantas

trangênicas produziram relativamente altos níveis de linalol e 8-hidroxilinalol e o aroma das mesmas foi aumentado.

Todos os exemplos de engenharia metabólica da biossíntese de isoprenóides plastidiais acima relatados configuram uma recente revelação desta rota e representam exemplos úteis na engenharia metabólica de isoprenóides (Liu *et al.*, 2005).

2.4 Óleos Essenciais (Monoterpenos)

Os monoterpenos, devido ao seu baixo peso molecular, costumam ser substâncias voláteis, sendo portanto denominados óleos essenciais ou essências. Os monoterpenos podem ocorrer em pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Eles podem estar estocados em flores (laranjeira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro), ou nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa) e em frutos (erva-doce; revisado em Peres, 2000).

Os óleos essenciais apresentam reconhecidas propriedades como repelentes de insetos, sendo freqüentemente encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme e agem como advertência sobre a toxicidade do vegetal, repelindo potenciais herbívoros mesmo antes que estes ataquem. Nos tricomas glandulares, os terpenos são armazenados em um espaço extracelular modificado na parede celular. Os óleos essenciais podem ser extraídos dos vegetais por meio de destilação por arraste a vapor, sendo importantes comercialmente como aromatizantes de alimentos e na indústria de perfumes (revisado em Taiz & Zeiger, 2004).

Pesquisas recentes revelaram um aspecto interessante na função protetora dos terpenos voláteis. Em milho, algodão, tabaco selvagem e outras espécies, certos monoterpenos e sesquiterpenos são produzidos e liberados somente após o inseto ter iniciado a ingestão da planta. Tais substâncias repelem herbívoros ovopositores e atraem inimigos naturais, incluindo insetos predadores e parasitas, que matam os insetos herbívoros e, assim, minimizam danos adicionais. Assim, os terpenos voláteis só não agem diretamente na proteção, como também propiciam que os vegetais que os produzem obtenham auxílio de outros organismos para sua defesa. A capacidade das plantas em atrair inimigos naturais de insetos herbívoros surge como uma nova alternativa ecológica para controle de pragas (revisado em Taiz & Zeiger, 2004).

Uma gama de constituintes químicos podem ser identificados nos óleos essenciais, havendo referências de presença de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, etc. Entre os constituintes dos óleos essenciais, alguns apresentam maiores concentrações, e são conhecidos como “componentes principais”. Aqueles que se apresentam em baixíssimas concentrações são conhecidos por “componentes-traço”. Como exemplo, pode-se citar o 1,8-cineol ou eucaliptol (Figura 4) que é o componente principal do óleo de *Eucalyptus globulus*, apresentando uma concentração média de 80 % entre os extrativos da folha. No entanto, este componente também está presente no óleo de bergamota como componente-traço, com concentração em torno de 0,002%. O componente principal é o constituinte desejado e o fator pelo qual ocorre a exploração econômica das plantas produtoras de óleo (revisado em Peres, 2000).

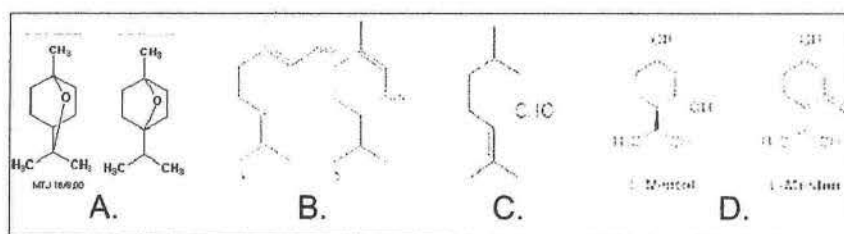


Figura 4. Estrutura de alguns óleos voláteis (monoterpenos). A. 1,8-cineol ou eucaliptol; B. citral; C. citronelal; D. mentol.

2.4.1 Óleos essenciais de eucalipto

Os óleos das folhas de eucalipto são formados por uma complexa mistura de componentes, envolvendo de 50 a 100 ou até mais compostos orgânicos voláteis, dentre os quais destacam-se hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres (revisado em Peres, 2000). Os óleos essenciais de eucalipto ocorrem principalmente nas folhas, onde são produzidos em pequenas cavidades globulares chamadas glândulas. Estas encontram-se distribuídas em todo o parênquima foliar da maioria das espécies de eucalipto. Em algumas espécies, estas glândulas, podem ser visualizadas como pequenos pontos translúcidos quando a folha é observada contra a luz. A origem biossintética dos óleos essenciais de eucalipto relaciona-se com seu metabolismo secundário, o qual como discutido anteriormente, não é considerado como fundamental para a manutenção da vida celular, porém, confere às plantas a capacidade de adaptação às condições do meio em que vive. No

caso dos eucaliptos, especialmente, as referências são as de que a ocorrência do óleo essencial estaria relacionada com a defesa da planta contra insetos, resistência ao frio quando no estágio de plântula, ao efeito alelopático e à redução da perda de água, conclusões estas que dependem ainda da realização de estudos mais comprobatórios (revisado em Doran, 1991).

Entre as aproximadamente 600 espécies de eucaliptos descritas, pouco mais de 200 foram examinadas com relação à produção e ao teor de óleos essenciais, e menos de 20 têm sido citadas como úteis à exploração comercial. Os óleos essenciais de eucaliptos estão divididos, basicamente em três grupos principais, em função do seu uso final, os quais são: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumaria (revisado em Doran, 1991). As principais espécies de eucalipto produtoras de óleo estão relacionadas na Tabela 5.

Os óleos medicinais são aqueles que apresentam como componente principal o cineol, em quantidades mínimas de 70 %, e são destinados à fabricação de produtos farmacêuticos como inalantes, estimulantes de secreção nasal, produtos de higiene bucal ou, simplesmente com função de dar sabor e aroma aos medicamentos. A principal espécie produtora deste tipo de óleo no Brasil é o *E. globulus*, havendo também algumas referências de extração a partir de *E. smithii*. Os óleos industriais têm como componentes principais o felandreno e a piperitona. O primeiro é usado como solvente e matéria prima na produção de desinfetantes e desodorizantes. A partir da piperitona é fabricado o timol, um preservativo para gomas, pastas, colas, etc e o mentol usado como aromatizante de produtos medicinais. No Brasil, não ocorre uma exploração intensiva de espécies que produzem este tipo de óleo. Os óleos de eucalipto também estão presentes nas indústrias de perfumarias, fazendo parte da composição de perfumes para diversos fins, sendo mais usados nos produtos de limpeza, como sabões e desinfetantes. O *E. citriodora* é a principal espécie explorada no Brasil para a produção deste tipo de óleo, apresentando como componente principal o citronelal. O *E. staigeriana* também pertence a este grupo e é cultivado em pequena escala no país, sendo o citral o seu principal componente químico (revisado em Vitti & Brito, 2003).

Tabela 5. Principais espécies de *Eucalyptus* utilizadas na para produção de óleos essenciais. Adaptado de Vitti *et al.*, 2003)

Espécies	Componente Principal		Rendimento
	Nome	Teor (%)	(%) ^a
Óleos medicinais			
<i>E. camaldulensis</i>	Cineol	80-90	0,3-2,8
<i>E. cineifolia</i>	Cineol	40-90	2,0
<i>E. dives</i> (var. <i>cineol</i>)	Cineol	60-75	3,0-6,0
<i>E. dumosa</i>	Cineol	33-70	1,0-2,0
<i>E. elaeophara</i>	Cineol	60-80	1,5-2,5
<i>E. globulus</i>	Cineol	60-85	0,7-2,4
<i>E. leucosylon</i>	Cineol	65-75	0,8-2,5
<i>E. oleosa</i>	Cineol	45-52	1,0-2,1
<i>E. polybractes</i>	Cineol	60-93	0,7-5,0
<i>E. radiata</i> subesp. <i>radiata</i> (var. <i>cineol</i>)	Cineol	65-75	2,5-3,5
<i>E. siderosylon</i>	Cineol	60-75	0,5-2,5
<i>E. smithii</i>	Cineol	70-80	1,0-2,2
<i>E. tereticornis</i>	Cineol	45	0,9-1,0
<i>E. viminalis</i>	Cineol	70-80	1,0-1,5
Óleos industriais			
<i>E. dives</i> (var. <i>felandreno</i>)	Felandreno	60-80	1,5-5,0
<i>E. dives</i> (var. <i>piperitona</i>)	Piperitona	40-56	3,0-6,5
<i>E. elata</i> (var. <i>piperitona</i>)	Piperitona	40-55	2,5-5,0
<i>E. radiata</i> subesp. <i>radiata</i> (var. <i>felandreno</i>)	Felandreno	35-40	3,0-4,5
Óleos para perfumaria			
<i>E. citriodora</i> (var. <i>citronela</i>)	Citronela	65-80	0,5-2,0
<i>E. macarthurii</i>	Ac. de gerânii	60-70	0,2-1,0
<i>E. staigeriana</i>	Citral (a+b)	16-40	1,2-1,5

^a Rendimento base de peso de folha fresca.

2.4.2 Principais espécies de *Eucalyptus* produtoras de óleo essencial no Brasil

As principais espécies de *Eucalyptus* cultivadas no Brasil para a produção de óleo essencial são: *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus staigeriana*. A seguir, uma breve descrição destas espécies é apresentada.

Eucalyptus citriodora

O *E. citriodora* é uma árvore de médio porte e de bonita aparência, com as procedências de origem norte-australiana apresentando cascas rosadas e as de origem sul-australiana apresentando manchas em suas cascas e a copa espalhada. A espécie ocorre em vários tipos de solo, em florestas abertas juntamente com outras espécies, sendo facilmente diferenciada destas em função do forte aroma de citronelal de suas folhas.

No Brasil, o *E. citriodora* foi introduzido juntamente com outras espécies de eucalipto, com o objetivo inicial de produção de madeira. Hoje, ela é muito utilizada para a produção de carvão vegetal, postes, madeira para serraria, mourões de cercas e também como lenha. Além dessas aplicações, atualmente é o eucalipto mais cultivado no país para produção de óleos essenciais. Com relação a estes, os rendimentos variam de 1 a 1,6%, ou seja, a cada tonelada de biomassa foliar destilada pode-se extrair de 10 a 16 kg de óleo. A concentração do seu componente principal, o citronelal, varia entre 65 a 85 %. No Brasil, o óleo de *E. citriodora* é comercializado bruto ou então, tendo como base o citronelal para se obter o citronelol, o hidroxicitronelal e o mentol (revisado em Vitti & Brito, 2003).

Eucalyptus globulus

Existem 4 subespécies de *E. globulus* produtoras de óleo essencial: o *E. globulus bicostata*, o *E. globulus globulus*, o *E. globulus maidenii* e *E. globulus pseudoglobulus* (revisado em Boland *et al.*, 1991). O *E. globulus bicostata* ocorre de Nova Gales do Sul a Victoria, na Austrália, e sua forma varia de pequenas árvores arbustivas em mata aberta a árvores altas com troncos retos em florestas densas. Esta espécie é muito usada como árvore ornamental, sendo sua madeira dura e resistente, geralmente usada para construção. O rendimento em óleo das folhas desta subespécie varia de 1,7 a 2 % e o seu componente principal, o 1,8-cineol, varia de 33 a 80 % (revisado em Vitti & Brito, 2003). O *E. globulus globulus* tem sua origem principalmente na Tasmânia, mas ocorre também no sul do estado de Victoria, na Austrália. Sua forma varia desde arbustos, em locais abertos, a árvores de até 70 m de altura em florestas densas, com copa grande e aberta. A madeira é dura e pouco resistente, mas pode ser usada para construção, postes, dormentes e lenha, sendo considerada uma das melhores espécies de eucalipto para produção de papel. A espécie é muito usada na Península Ibérica, na China, em Portugal e no Chile para a produção de madeira, celulose e óleo essencial. O rendimento em óleo das folhas desta subespécie é de 1,4 a 2,4 % com teor de 1,8-cineol variando de 61 a 69 % (revisado em Vitti & Brito, 2003).

O *E. globulus maidenii* é caracterizado como uma árvore de médio a grande porte, encontrada na aérea costeira e sub-costeira do sul do estado de Nova Gales do Sul, na Austrália. Está mais adaptada a vales com solos férteis e úmidos, embora cresça em locais pouco favoráveis se houver chuva em quantidade adequada. A madeira desta subespécie também é usada para a

construção em geral. O rendimento em óleo de suas folhas varia de 2,2 a 2,8 % e o teor de 1,8-cineol varia de 46 a 70 % do óleo (revisado em Vitti & Brito, 2003).

O *E. globulus pseudoglobulus* é caracterizado como árvore de médio porte nas florestas abertas e nas terras de altitude sobre solos aluviais, sendo também conhecida com *E. pseudoglobulus*. Esta é a única subespécie de *E. globulus* ainda não cultivada em outros países. O rendimento em óleo essencial de suas folhas varia de 4,0 a 5,6 %, com teor de 1,8-cineol situado entre 47 a 69 % (revisado em Vitti & Brito, 2003).

O *E. globulus* foi a primeira espécie de eucalipto introduzida no Brasil, em 1855, mas foi somente em 1973 que grandes plantações de eucalipto foram iniciadas pela antiga Companhia Paulista de Estradas de Ferro, visando a produção de madeira. No entanto, o início da extração de óleo desta espécie ocorreu somente durante a Segunda Guerra Mundial, devido às dificuldades de importação deste tipo de óleo essencial (revisado em Braga, 2001).

Geralmente, o *E. globulus* é explorado em pequena escala, uma vez que esta espécie está mais adaptada a climas mais frios e o óleo produzido em nosso país sofre grande concorrência daquele importado da China. A madeira desta espécie em sua forma pura, apesar das referências favoráveis para a produção de celulose e papel, é usada apenas como lenha. Híbridos de cruzamentos de *E. globulus* com outras espécies mais adaptadas e de mais rápido crescimento são amplamente exploradas no Brasil para tal fim. O rendimento em óleo essencial observado no Brasil, varia de 1,6 a 2 %, com teor de cineol de 70 a 80 % (revisado em Vitti & Brito, 2003).

Eucalyptus staigeriana

A espécie *E. staigeriana* ocorre naturalmente na península de Cape York, no estado de Queensland, na Austrália, em altitudes de 40 a 600 m. O *E. staigeriana* é caracterizado, como uma árvore de tamanho médio, podendo chegar a 22 m de altura, onde a copa reduzida e espalhada, exceto quando crescendo com outras espécies, onde a copa pode ser tão ampla como alta. Está espécie está adaptada a zonas climáticas quentes e subúmidas, sobre solos pobres e bem drenados, em matas ou florestas abertas. As folhas desta espécie apresentam aroma caracteristicamente cítrico, proveniente do citral, que é uma mistura dos componentes neral e geranial. O rendimento em óleo desta espécie varia de 1,2 a 1,5 %, com teor de citral entre 16 a 40 %, tendo um aroma muito

agradável, utilizado nas indústrias de perfumaria. Não existem muitas referências sobre os usos desta madeira, sabendo-se apenas que ela apresenta cor vermelha sendo resistente e durável (revisado em Vitti & Brito, 2003).

No Brasil, o plantio de *E. staigeriana* é feito basicamente para a produção de óleo essencial e a madeira obtida nestes plantios é vendida como lenha. Na década de 1970 um estudo mostrou a relação de *E. staigeriana* com a produção de óleo essencial na região de Torrinhas, estado de São Paulo. Foi observada uma variação de rendimento de 0,07 a 2,53 %, e de teor do componente principal de 13 a 62,96 %. A partir desses resultados foram selecionadas plantas que apresentavam alto rendimento e/ou concentração de citral para a produção de sementes, as quais foram usadas para plantios comerciais em que a média de rendimento em óleo atingiu 1,4 % (revisado em Pinto *et al.*, 1976).

O óleo de *E. staigeriana* não é explorado comercialmente na Austrália. Os plantios desta espécie para a produção de óleos essenciais são conduzidos principalmente no Brasil, África do Sul, Seychelles e na Guatemala. O odor característico do óleo desta espécie despertou o interesse para a utilização em sabonetes, fragrâncias de detergentes e outros. No entanto, a sua estabilidade nos sabonetes não é muito boa, a menos que seus componentes principais sejam cuidadosamente fixados. Outro aspecto é o de que o óleo de *E. staigeriana* sofre concorrência direta do citral produzido sinteticamente e com boa qualidade e preços atrativos (revisado em Vitti & Brito, 2003).

Em visita realizada à maior empresa produtora de óleo essencial desta espécie no Brasil, a Dierberger Óleos Essenciais S.A., Siveira (1995) constatou que as áreas cultivadas com o *E. staigeriana* estavam sendo reduzidas em função de um aumento no consumo do citral sintético. No entanto, atualmente, está havendo uma retomada do interesse pelo óleo desta espécie em função de que o citral obtido do seu óleo está tendo maior aceitação na aromatização de alimentos frente ao citral produzido sinteticamente.

2.5 Mercado Mundial do Óleo Essencial de Eucalipto

No panorama mundial, as principais espécies de *Eucalyptus* cultivadas para a produção de óleo medicinal incluem *E. globulus*, *E. australiana*, *E. smithii*, e *E. drives* var. "C". Para o atendimento do ramo da perfumaria, o óleo é obtido principalmente de *E. citriodora* e *E. macarthuri*. O óleo de *E. staigeriana* é produzido apenas no Brasil, para a obtenção do l-limoneno, geraniol e

acetato de geranila. O óleo desta espécie não é considerado muito interessante em função de apresentar usos especializados e limitados, sendo bastante vulnerável à competição com produtos sintéticos. Os óleos industriais, ricos em felandreno, são produzidos por *E. drives* "Tipo" e var. "A" e *E. australiana* var. "B". A avaliação do mercado mundial dos óleos de eucalipto aponta para um aumento no consumo dos óleos ricos em cineol, e um decréscimo do consumo dos óleos destinados à perfumaria e indústrias, devido às competitivas soluções alternativas para os seus derivados (revisado em Vitti & Brito, 2003).

Mundialmente, os óleos de eucalipto para fins medicinais representam o maior volume produzido e comercializado. Dos óleos de eucalipto utilizados em perfumaria, aquele obtido do *E. citriodora* é produzido em escala muito maior que o óleo extraído do *E. staigeriana*. O mercado do óleo industrial, obtido principalmente do *E. drives* é muito reduzido (revisado em Vitti & Brito, 2003).

No caso específico dos óleos ricos em cineol, a China exerce amplo domínio, detendo 70 % da comercialização mundial. Os demais países são Portugal, Índia, África do Sul, Austrália, Chile e Espanha. Na América do Sul, além do Chile, o Brasil já foi um importante produtor de óleo de *E. globulus*. Em escala bem menor, podem ainda ser citados ainda a Bolívia, o Uruguai e o Paraguai (revisado em Vitti & Brito, 2003).

A China também detém o domínio da produção e comercialização de óleo de *E. citriodora*. Sua produção, em 1991, foi estimada em 1.000 toneladas, quantia que representa 2/3 da produção mundial deste tipo de óleo. O óleo de *E. citriodora* produzido no Brasil e na Índia foi estimado, para aquele mesmo ano, em 50 a 500 toneladas, respectivamente. O Brasil é citado como o único fornecedor de óleo de *E. staigeriana* para o mercado mundial, com produção estimada em 60 toneladas/ano (revisado em Vitti & Brito, 2003).

Os principais consumidores de óleo essencial são os países da Comunidade Européia, sendo a França, a Alemanha e a Inglaterra os maiores compradores. Em 1990, estes países importaram a quantia de 1.840 toneladas de óleo de eucalipto. Os Estados Unidos da América é também considerados um grande consumidor, tendo importado no ano de 1990 cerca de 378 toneladas de óleo (revisado em Braga, 2001).

A China, por deter a maior parte da produção mundial de óleo de eucalipto, exerce grande influência sobre os preços praticados no mercado mundial, sobretudo induzindo a fortes quedas nos preços internacionais. No início de 1994, o preço do óleo rico em cineol oferecido pelos chineses não

não ultrapassava US\$ 3,00/kg, enquanto o preço médio praticado no mercado internacional cinco anos antes era de US\$ 6,00/kg. Também no início do ano de 1994, o óleo de *E. citriodora* era oferecido pelos revendedores em Londres a US\$ 3,35/kg. Atualmente, parece haver uma recuperação internacional nos preços de óleo, especialmente o do *E. citriodora*, que tem atingido US\$ 6,00/kg (revisado em Vitti & Brito, 2003).

2.6 Óleo Essencial de Eucalipto no Brasil

A produção de óleos essenciais no Brasil teve início em 1927, tendo como base o puro e simples extrativismo do pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), cuja produção de óleo, na época, aproximou-se de 200 toneladas. Segundo dados obtidos junto a produtores nacionais, no final da década de 1990 a estimativa nacional de produção anual de óleos de *E. staigeriana* era de 60 toneladas, sendo o mesmo comercializado por US\$ 6,00/kg. Para *E. citriodora*, a produção era estimada em 800 toneladas anuais, com preço no mercado nacional variando de R\$ 8,00 a R\$ 10,00/kg de óleo, e no mercado internacional variando entre US\$ 4,5 a 5,00/kg de óleo (revisado em Vitti & Brito, 2003).

A retrospectiva de óleos essenciais no Brasil tem demonstrado que o mercado não é estável. Por se tratar de uma cultura florestal, no entanto, a extração de folhas pode ser associada a práticas de manejo que realizam o uso múltiplo da área. No caso do *E. citriodora*, por exemplo, além do óleo, pode-se produzir madeira para ser usada como lenha, mourões, postes e até toras para serrarias. As folhas depois de destiladas podem ser utilizadas como adubo orgânico ou então como fonte de energia para caldeiras. Outra possibilidade, já comentada anteriormente, é de se manter um sistema silvopastoril nas áreas onde o *E. citriodora* é cultivado. Utilizando-se este tipo de sistema que visa o uso múltiplo da área florestal, tem-se a possibilidade de receitas adicionais às de comercialização do óleo, o que pode minimizar os riscos decorrentes das eventuais flutuações deste mercado (revisado em Vitti & Brito, 2003).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Clones

Uma cuidadosa revisão bibliográfica, a qual constitui o Capítulo 1 da presente Dissertação de Bacharelado, foi realizada visando identificar as principais classes de genes vegetais potencialmente relacionadas com a biossíntese de óleos essenciais. As classes de genes dos principais clones candidatos selecionados codificam potencialmente proteínas relacionadas com a síntese de isoprenóides como monoterpenos (óleos essenciais), hormônios (ABA, GAs, Cks, BR) e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas, carotenóides) em plantas. Os principais clones de cDNA selecionados potencialmente representam os genes codificadores das enzimas DXS, DXR, MDC e IPPI. Maiores informações sobre estas classes de enzimas e genes encontram-se no Capítulo 1.

A partir dos resultados finais de depósitos de ESTs, agrupamentos por similaridade de seqüências (*clustering*) e de anotação automática da potencial identidade funcional das seqüências presentes nos bancos de dados do Projeto GENOLYPTUS, disponíveis pelo Laboratório de Genômica e Expressão Gênica da Universidade Estadual de Campinas (<http://www.lgc.ibi.unicamp.br/eucalyptus/>) e pelo Laboratório de Bioinformática da Universidade Católica de Brasília, (<http://www.genoma.ucb.br/SistemaGenoma/>), foram identificadas seqüências únicas (*singlets*) de ESTs ou grupos de seqüências (*clusters*) potencialmente codificadores de proteínas de *Eucalyptus* relacionadas às classes acima apresentadas. Após a reunião de todas estas seqüências disponíveis no banco de dados do GENOLYPTUS, foram selecionados clones de cDNA potencialmente completos, isto é, caracterizados pela presença do códon de início de tradução, ATG (Anexo 1). Considerando que os cDNAs foram gerados a partir de oligonucleotídeos com complementaridade às caudas de poli(A), subentende-se que todos os produtos de síntese, ou a sua maioria, possuem a região 3'-terminal e, por conseguinte, os códons de terminação da tradução. Finalmente, o clone representante de uma das classes desses genes, o gene DXR, foi investigado em maior profundidade por ser o único contendo códon de início de tradução e, portanto, ser o único representante completo encontrado no banco de dados do GENOLYPTUS. Sua clonagem molecular e caracterização funcional constituem o foco principal da presente Dissertação, descritos nos Capítulos 3, 4 e 5.

3.2 Novos Seqüenciamentos dos cDNAs Ligados ao Plasmídeo pSport1

Os cDNAs identificados que potencialmente codificam cada um dos genes DXR, MDC, IPPI I e IPPI II foram localizados nas microplacas-estoque que contêm os produtos gerados pelas construções das bibliotecas de cDNA de *E. grandis*, com exceção da seqüência de DXS que não foi localizada. Estes cDNAs estão inseridos no plasmídeo pSport1 (Invitrogen; Anexo 4).

Para a confirmação da identidade molecular de cada uma das seqüências, os cDNAs foram resseqüenciados. Para isto, 1 µL da preparação plasmidial estoque do cDNA de cada gene foi utilizado para transformar *E. coli* DH10B e as colônias resultantes foram inoculadas em meio LB líquido para a preparação de plasmídeos em pequena escala ("minipreparação plasmidial"), gerando, assim um volume maior de DNA plasmidial. Amostras do DNA plasmidial de cada gene foram resseqüenciadas usando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* GlyptsRev1 (5'-ATAGGGAAAGCTGGTACGC-3') ou M13-40 Forward (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA-3', GE Healthcare) e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v.10.1* (Applied Biosystems) com os parâmetros: *Dye Set "Z"*; *Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v.1mob"*; *BioLIMS Project "3100_Project1"*. O seqüenciamento foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS).

Após o seqüenciamento, as seqüências geradas foram analisadas utilizando-se os programas BLASTn e tBLASTx disponíveis pelas páginas do *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov>) na *internet*, e alinhadas com as seqüências obtidas do banco de dados do Projeto GENOLYPTUS e com as seqüências dos mesmos genes de outras plantas a fim de

confirmar sua identidade molecular. Para essas análises utilizou-se o programa ClustalW 1.8 (www.ebi.ac.uk/clustalW#; Anexo 5).

3.3 Construção do Vetor Plasmidial Contendo o Gene *dxr* para Expressão em *E. coli*

3.3.1 Ligação de inserto de cDNA e transformação de células termocompetentes de *E. coli*

Os protocolos de práticas laboratoriais gerais de biologia molecular fundamentalmente foram desenvolvido conforme preconizado em Ausubel *et al.* (2003). Inicialmente, foi verificada a presença de sítios de restrição no plasmídeo pSport1 para a liberação do gene *dxr* mantendo o códon de início de tradução, ATG, em fase de leitura para inserção do gene no vetor de expressão pGEX-4T-2 (GE Healthcare; Anexo 6). O sistema pGEX, possui um sítio de multiclonagem o qual está fusionado na sua porção N-terminal a uma proteína, a glutationa-S-transferase (GST). A expressão de insertos clonados em vetor pGEX é controlada pelo promotor do gene *lac* induzido por IPTG. Todos os vetores pGEX são construídos com um gene *lacI^q*. O produto deste gene é uma proteína repressora que se liga à região operadora do promotor *lac*, prevenindo sua expressão até a indução com IPTG.

As enzimas selecionadas foram *SalI* a qual cliva o vetor pSport1 antes da inserção do gene *dxr* e *NotI* que cliva o vetor após a cauda poli(A). Ambas as enzimas possuem sítios de restrição presentes no sítio de multiclonagem do vetor pGEX-4T-2. A digestão enzimática foi realizada com 40 U das enzimas de restrição *SalI* (Jena Bioscience) e *NotI* (Fermentas), empregando-se o Tampão O (Fermentas) na concentração de 1x, 20 ng de RNase (Invitrogen), 10 µg do DNA plasmidial de pSport1 ligado a *dxr* e água ultrapurificada por osmose reversa (Mili Q, Milipore) para completar o volume da reação de 100 µl. A reação foi incubada a 37 °C durante 1,5 horas. Os produtos da digestão foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, sendo que os tamanhos esperados de fragmentos seria de 4.900 pb e 1.800 pb. O fragmento do gene *dxr* foi purificado do gel pelo uso do kit *GFX Gel Band Purification* (GE Healthcare).

O vetor de expressão pGEX-4T-2 foi digerido com as mesmas enzimas de restrição, *SalI* e *NotI*, o que permitiu a ligação do gene *dxr* em um único sentido, ou seja em sua versão senso. A reação de ligação foi realizada com 54 ng do produto do gene *dxr* purificado do gel e 50 ng do vetor pGEX-4T-2, 5 U da enzima DNA ligase (Invitrogen) e tampão da enzima na concentração final de

1x. Procedeu-se a incubação a 16 °C por 2 horas. Células competentes de *E. coli* DH10B foram transformadas com metade do volume da reação de ligação por choque térmico.

3.3.2 Seleção das colônias transformadas

A seleção das colônias de *E. coli* DH10B contendo o vetor pGEX-4T-2 foi realizada por meio da resistência à ampicilina. Desta forma, as bactérias transformadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar (10 g de triptona, 5 g de extrato de leveduras, 10 g de cloreto de sódio, em 1 L de água destilada, pH 7, e 1,5% ágar bacteriológico) e 100 µg/mL de ampicilina. Somente as bactérias contendo o vetor formaram colônias nestas condições. Para confirmar a presença do inserto de *dxr*, foi realizada a extração de DNA plasmidial de 12 colônias pelo método de lise alcalina (Ausubel *et al.*, 2003) e digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* (Promega) que cliva o vetor pGEX-4T-2 e *HindIII* que cliva internamente a sequência de *dxr* na posição 1.193 pb. A reação de digestão foi realizada utilizando-se o tampão Tango 2x (Fermentas), 2 µg do DNA plasmidial, 20 ng de RNase (Invitrogen) e 10 U de ambas as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. As reações foram incubadas a 37 °C durante 1,5 horas. Os produtos de digestão foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 0,8 %, sendo que os fragmentos esperados possuem 1.200 pb e 5.300 pb.

3.4 Expressão de DXR Recombinante em *E.coli*

3.4.1 Transformação de células competentes para expressão

Células termocompetentes de *E.coli* BL21 (DE3) (Stratagene) foram preparadas segundo o protocolo de tratamento com cloreto de cálcio segundo Ausubel *et al.* (2003). Adicionou-se, 100 µL dessas células, 1 µg do vetor de expressão pGEX-4T-2::*dxr* e a mistura foi incubada no gelo por 30 min. Realizou-se o choque térmico por 50 seg a 42 °C. As células foram colocadas no gelo por mais 2 min e adicionou-se 900 µL de meio LB líquido. A seguir, as células foram colocados sob agitação de 180 rpm durante 1,5 horas a 37 °C. Após este período de recuperação, as células foram distribuídas em placas de Petri contendo meio LB-ágar adicionado de 100 µg/mL de ampicilina. Como controle negativo, foram utilizadas células de *E.coli* BL21 (DE3) transformadas apenas com o

plasmídeo pGEX-4T-2 parental. A transformação foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.4.2 Seleção de colônias recombinantes para expressão da proteína de fusão GST-DXR

Colônias isoladas de *E. coli* BL21 (DE3):pGEX-4T-2::*dxr* e *E. coli* BL21 controles foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de meio YT 2x (16g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio, em 1L de água destilada, pH 7) contendo ampicilina (100 mg/L), com exceção de *E. coli* BL21 (DE3) controle, para verificar a expressão da proteína de fusão GST-DXR. As bactérias foram multiplicadas a 37 °C, 150 rpm até atingir OD₆₀₀ de 0,8 e, em seguida, adicionou-se 1 mM de IPTG em metade das amostras para verificar a indução da expressão. Após 150 min de indução, aliquotas de 1 mL foram retiradas, centrifugadas e o sobrenadante descartado. Aos sedimentos foi adicionado uma quantidade de tampão de amostra suficiente para atingir a concentração final de 2x (tampão 6x: 0,35 M de Tris-HCl, pH 6,8, 10 % de SDS, 36 % de glicerol, 5 % de β-mercaptoetanol, 0,012 % de azul de bromofenol) e as amostras foram incubadas a 95 °C durante 5 min para a lise das células bacterianas. Foram aplicados em gel de poliacrilamida a 12 % (SDS-PAGE) 15 µl de cada amostra durante 120 min a 100 V. Posteriormente, o gel foi corado com azul de Coomassie o/n. As bactérias controles sem plasmídeo não deverão expressar quaisquer novas proteínas, mas somente proteínas constitutivas. Esse mesmo teste foi realizado sob diferentes condições de expressão, isto é, com indução da expressão por 240 min com IPTG na concentração de 0,1 mM a 30 °C e indução a 20 h com 0,1mM de IPTG a 26 °C (Yamakawa, *et al.*, 2004).

3.4.3 Seqüenciamento do plasmídeo pGEX-4T-2::*dxr* e análise da seqüência

A fim de confirmar a presença do códon de início da tradução, verificar se há algum stop códon na região 5' não traduzida da seqüência e confirmar se a seqüência realmente permaneceu em fase correta de leitura após as clonagens foi realizado o seqüenciamento das extremidades do vetor pGEX-4T-2 ligado a *dxr*. Como descrito anteriormente, o seqüenciamento foi realizado usando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) nas mesmas condições. Foram utilizados 30 a 45 ng de DNA plasmidial (pGEX-4T-2::*dxr*) resultantes das minipreparações plasmidiais utilizadas nos experimentos de expressão, e estes foram marcados

utilizando-se 3,2 pmol dos *primers* pGEX alternativo 5' (5'- CCT GGA TGT GTT CCC AAA A 3') e pGEX alternativo 3' (5'- CGA CAC CCG CCA ACA AA 3'). Após o seqüenciamento, as análises de todas as seqüências geradas de *dxr* foram realizadas para verificar se haviam códons de terminação que pudessem comprometer a expressão da proteína recombinante, se o códon de início realmente estava presente e se a seqüência estava em fase correta de tradução como previa-se pela seqüência gerada do seqüenciamento de pSport1::*dxr*.

3.5 Obtenção das Construções Senso e Anti-senso do Gene *dxr* para Expressão em Plantas

3.5.1 Ligação do inserto e transformação de células de *E.coli* termocompetentes

Para a construção do vetor binário pUESC28::*dxr* senso/anti-senso, o fragmento de *dxr* foi removido do vetor pSport1 utilizando-se as enzimas *SalI* e *BamHI*. O produto da reação foi aplicado em gel e, após eletroforese, o fragmento correspondente ao gene *dxr* foi purificado do gel pelo uso do kit *GFX Gel Band Purification*. O cDNA do gene *dxr* purificado foi submetido a uma reação com a T4 DNA Polimerase (Invitrogen) na presença de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) de modo a preencher a extremidade 5' e degradar a 3' sobresselente formadas pela clivagem com *SalI* e *BamHI*. Em seguida, o fragmento foi ligado ao vetor pUESC28 (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Júlio C.M. Cascardo, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA) clivado com *SmaI* (Fermentas) e desfosforilado com fosfatase alcalina de intestino de bezerros (CIP, Q-biogene). A reação de ligação foi realizada com 35 ng do produto do gene *dxr* purificado do gel e 50 ng do vetor pUESC28 tratado, 5 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e tampão da enzima na concentração final de 1x. Procedeu-se a incubação a 16 °C o/n. Células competentes de *E. coli* DH10B foram transformadas com metade do volume da reação de ligação por choque térmico.

3.5.2 Seleção das colônias transformadas contendo os vetores binários para *A. tumefaciens*

A seleção das colônias contendo o vetor pUESC::*dxr* foi realizada por meio da resistência à canamicina. Desta forma, as bactérias transformadas foram distribuídas em placas de Petri contendo meio LB-ágar e 50 µg/mL de canamicina (Sigma). Somente as bactérias contendo o vetor plasmidial formaram colônias nestas condições. Para confirmar a presença do inserto de *dxr* foi realizada a

extração de DNA plasmidial de 17 colônias pelo método de lise alcalina e digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* (Promega), que hidrolisa o vetor pUESC28, e *HindIII* que cliva internamente a seqüência do gene *dxr* e também o vetor pUESC28. A reação de digestão foi realizada utilizando-se o tampão Tango 2x (Fermentas), 2 µg do DNA plasmidial, 20 ng de RNase (Invitrogen) e 10 U de ambas as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. As reações foram incubadas a 37 °C durante 90 min. Os produtos de digestão foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 0,8 %, sendo que os fragmentos esperados para a versão senso deveriam apresentar tamanhos de 8.860 pb, 2.000 pb e 500 pb, e para a versão anti-senso esperaria-se os tamanhos de 8.860 pb, 1.300 pb e 1.200 pb. Finalmente, para pUESC parental, os tamanhos esperados seriam de 8.860 pb e 804 pb (Anexo 7 mapa de pUESC28).

3.6 Análises *in silico* da seqüência de DXR e Evolução Molecular

A seqüência de *dxr* obtida foi analisada usando ferramentas de bioinformática presentes nos sítios do NCBI na *internet* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.expasy.org/>) e *Translate a DNA sequence* (www.expasy.ch/tools/dna.html). Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foram realizados por meio de ferramentas do pacote Vector NTI 7 (Invitrogen), bem como pelo ClustalW 1.8. Na análise filogenética da seqüência deduzida de DXR de *E. grandis* e das seqüências de DXR de outras espécies de plantas e bactérias obtidas pelo GenBank, as mesmas foram alinhadas com o programa CLUSTAL W. Subseqüentemente, a árvore filogenética foi construída usando o programa MEGA 4 pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ) com distância-p. A confiança da árvore foi medida pela análise Bootstrap com 1.000 replicações.

Para caracterizar a região N-terminal da proteína DXR de *E. grandis*, foi realizado um alinhamento desta região com as regiões equivalentes de outras DXRs de plantas conhecidas e com a DXR de *E. coli*. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa ChloroP que prediz a presença de peptídeos de trânsito para cloroplasto (cTP) na seqüência de proteínas e a localização do potencial sítio de clivagem do cTP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de Clones e Ressequenciamento

A seleção de genes candidatos que codificam proteínas relacionadas com a síntese de isoprenóides como monoterpenos (óleos essenciais) em eucaliptos foi realizada por meio de uma anotação automática para identificar a potencial identidade funcional das seqüências-consenso depositadas nos bancos de dados do Projeto GENOLYPTUS. Para isso, utilizaram-se seqüências consenso conhecidas desses genes conforme descritos para outras plantas como *Catharanthus roseus* e *Arabidopsis thaliana*. Estas seqüências heterólogas serviram como “iscas” para identificar, dentro do banco de dados do GENOLYPTUS, as seqüências similares (Anexo 1). Depois de localizadas as seqüências correspondentes de cada gene, estas foram comparadas por meio do programa BLASTn e tBLASTx disponíveis no NCBI. As seqüências que apresentaram identidades em nucleotídeos e/ou aminoácidos maior que 70% foram selecionadas para o estudo. Os genes selecionados a partir desta busca potencialmente codificam as enzimas DXR, MDC, IPPI I, IPPI II e DXS (Anexo 2).

A partir dos resultados da anotação automática foram localizadas seqüências únicas de ESTs de cada um dos genes selecionados potencialmente codificadores de proteínas de *Eucalyptus*. Somente os clones de cDNA potencialmente completos foram selecionados, isto é, aqueles caracterizados pela presença do códon de início de tradução, ATG foram selecionados. Assim, no presente trabalho, o único clone escolhido foi o do gene codificador de DXR, por ser o único representante completo encontrado nos bancos de dados do Projeto GENOLYPTUS (Anexo 3). Outros genes com o codificador de MDC, IPPI I e IPPI II não apresentam clones completos no banco de dados do GENOLYPTUS, faltando, em todos os candidatos, partes da porção 5'-terminal. O gene *dxs* não foi localizado nas microplacas-estoque do Laboratório e, portanto, não foi estudado. Os demais cDNAs que potencialmente codificam cada uma das enzimas DXR, MDC, IPPI I e IPPI II foram localizados nas microplacas-estoque que contêm os produtos gerados pelas construções das bibliotecas de cDNA de *E. grandis*. Um μ L do DNA plasmidial contendo o cDNA de cada gene foi utilizado para transformar de *E. coli* DH10B. Plasmídeos derivados de 6 colônias resultantes da transformação de cada clone foram minipreparadas e a presença de cada gene foi confirmada pela clivagem do vetor pSport1 com *EcoRI* e *HindIII* (Anexo 4). Os produtos da digestão podem ser visualizados na Figura 5. Todos os plasmídeos resultaram positivos, pois todos apresentaram, além

utilizado para transformar de *E. coli* DH10B. Plasmídeos derivados de 6 colônias resultantes da transformação de cada clone foram minipreparadas e a presença de cada gene foi confirmada pela clivagem do vetor pSport1 com *EcoRI* e *HindIII* (Anexo 4). Os produtos da digestão podem ser visualizados na Figura 5. Todos os plasmídeos resultaram positivos, pois todos apresentaram, além do fragmento referente ao vetor plasmidial de 4.109 pb, um inserto que, possivelmente, representa o inserto de cDNA em estudo.

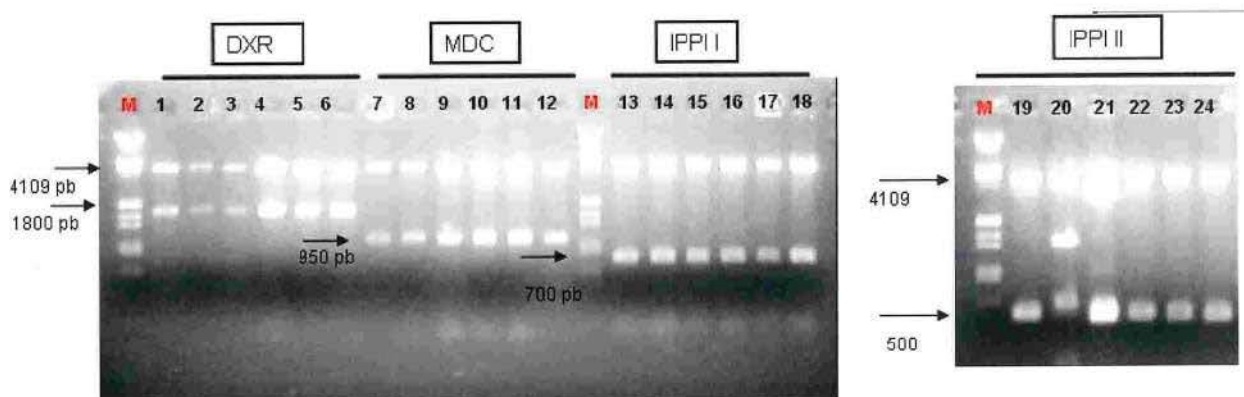


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo os fragmentos resultantes da digestão do vetor pSport1 contendo o cDNA dos genes DXR, MDC, IPPI I e IPPI II. O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, para verificar a presença do inserto. M. DNA do bacteriófago lambda clivado com *EcoRI* e *HindIII* como marcador de tamanhos de DNA. O tamanho dos insertos de cada gene varia dependendo do mesmo ser completo ou não.

Os produtos das preparações plasmidiais 5, 11, 15 e 24 mostrados na Figura 5 foram utilizados para o ressequenciamento das amostras para a confirmação da identidade molecular das seqüências. Esta análise foi realizada utilizando-se os programas BLASTn e tBLASTx disponíveis pelo NCBI. Todas as seqüências foram confirmadas pela alta similaridade com essas mesmas enzimas de outras espécies de plantas. Isso pode ser observado pelo alinhamento dessas seqüências com as seqüências dos mesmos genes de outras plantas realizado pelo ClustalW 1.8 (Anexo 5).

4.2 Construção do Vetor Plasmidial Contendo *dxr* para Expressão em *E. coli*

O resultado da clivagem do vetor pSport1::*dxr* utilizando-se as enzimas de restrição *SalI* e *NotI* foi o esperado, com fragmentos observados em tamanhos de 4.109 pb e 1.800 pb (Figura 6A). Estas endonucleases foram selecionadas por manterem a fase de leitura do códon de iniciação do gene DXR para expressão no vetor pGEX-4T-2. Estas mesmas enzimas estão presentes no sítio de multiclonagem do vetor e foram utilizadas para a digestão do mesmo permitindo somente a ligação

no sentido senso do gene *dxr* em pGEX-4T-2 (Anexo 6). O fragmento do gene *dxr* foi purificado do gel (Figura 6B), ligado ao vetor pGEX-4T-2 e o produto da ligação foi utilizado para a transformação de células termocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3). Muitas colônias resultaram dessa transformação e 12 tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos e digeridos com *EcoRI* e *HindIII* para confirmação da presença do inserto de *dxr* (Figura 7).

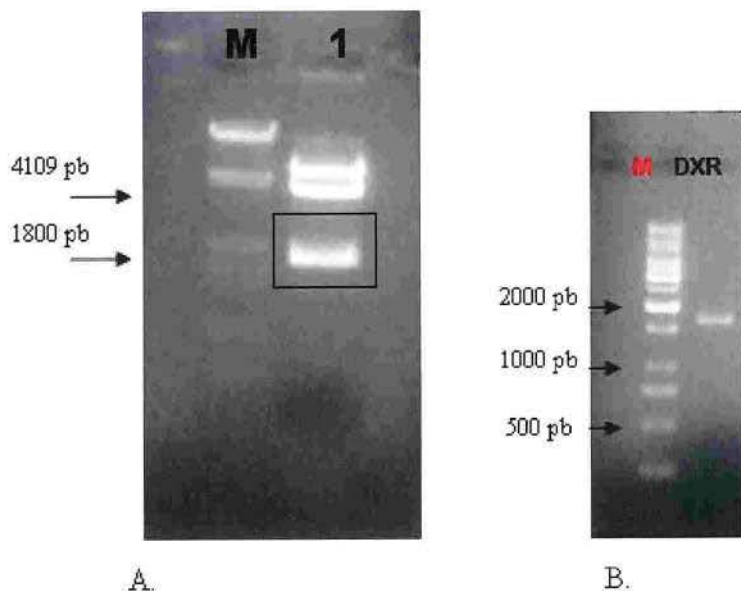


Figura 6. A. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo os fragmentos resultantes da digestão do vetor pSport1::*dxr*. O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Sal I* e *Not I*. M. DNA do bacteriófago lambda clivado com *EcoRI* e *HindII* como marcador de tamanhos de DNA. 1. Padrão de tamanho de DNA esperado 4.109 pb e 1.800 pb B. M. One kb DNA Ladder (Fermentas) como marcador de tamanhos de DNA. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o fragmento de 1.800 pb de *dxr* purificado.

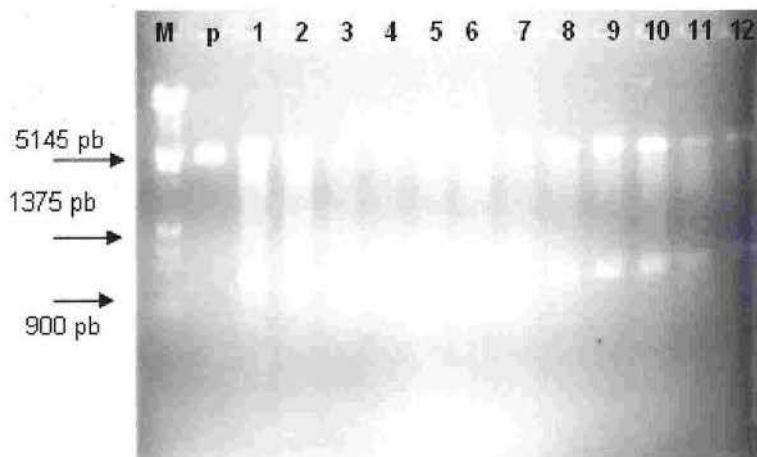


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo os fragmentos resultantes da digestão do vetor pGEX-4T-2::*dxr*. Padrão de tamanhos de DNA esperado 1.200 pb e 5.300 pb. M. DNA do bacteriófago lambda clivado com *EcoRI* e *HindII* como marcador de tamanhos de DNA

4.3 Expressão de pGEX-4T-2::*dxr* em *E. coli*

Após a confirmação dos insertos de *dxr* em pGEX-4T-2 (Figura 7), foram selecionadas 4 colônias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pGEX-4T-2::*dxr*. Assim como 2 colônias de *E. coli* BL21 (DE3)::pGEX-4T-2 parental e 2 colônias de *E. coli* BL21 (DE3) controle. Todas foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de meio 2x YT contendo ampicilina (100 mg/L), com exceção a *E. coli* BL21 (DE3) controle, na presença e ausência de 1 mM de IPTG a 37 °C, com o objetivo de selecionar clones para a expressão da proteína de fusão GST-DXR. Além da banda de 27 kDa correspondente à proteína GST nas colônias contendo pGEX-4T-2::*dxr* e pGEX-4T-2 parental na presença de IPTG, nenhuma banda visível diferente do padrão constitutivo de proteínas da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) controle foi visualizada no perfil da eletroforese do extrato de células induzidas, como pode ser visualizado na Figura 8.

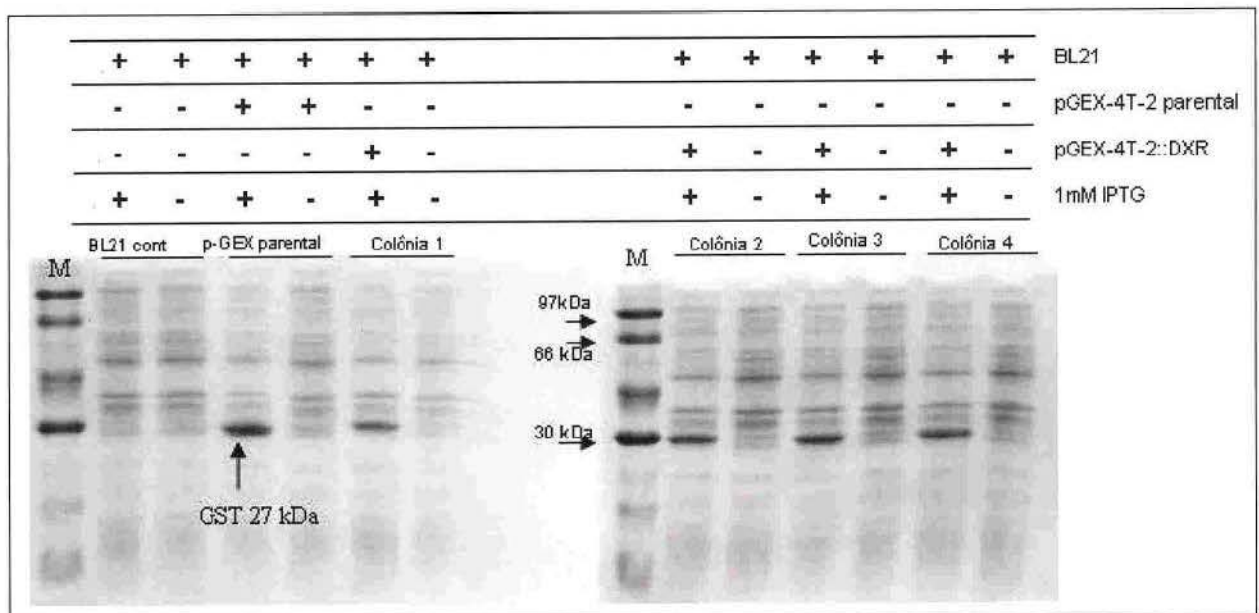


Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 12% em condições desnaturantes (SDS) para análise da expressão de *dxr* recombinante a partir de colônias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pGEX-4T-2::*dxr* (colônia 1, 2, 3 e 4), *E. coli* BL21 (DE3) transformada com pGEX-4T-2 parental (pGEX-parental) e *E. coli* BL21 (DE3) controle (BL21 cont). M. Marcador de massa molecular (GE Healthcare).

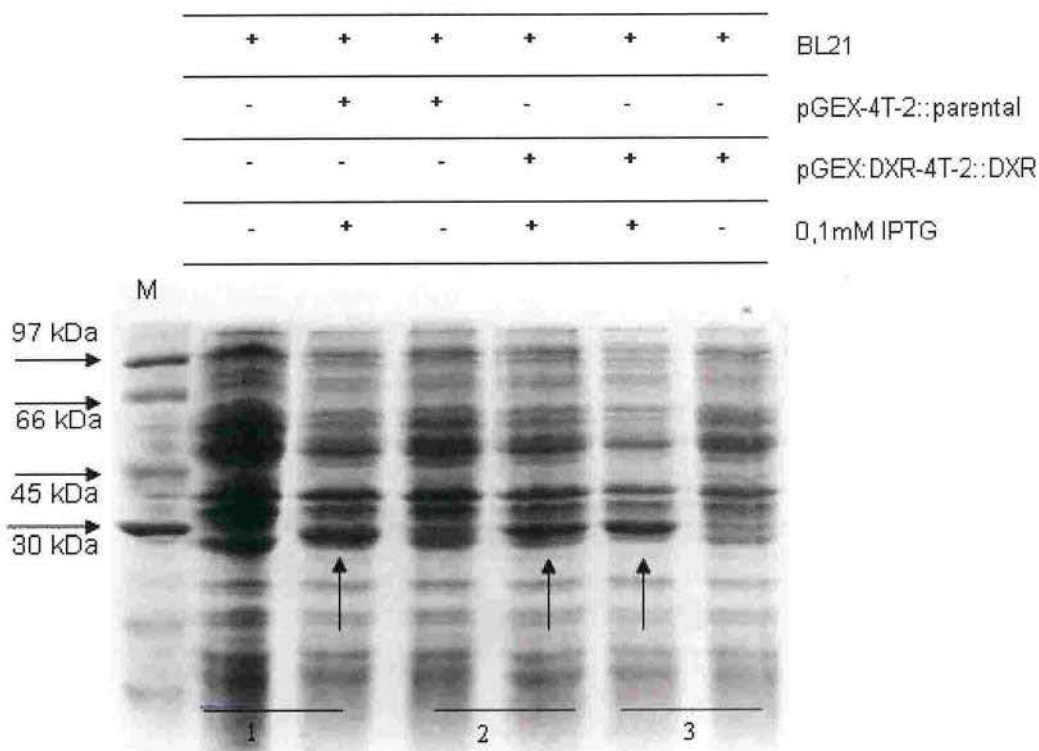


Figura 9 B. Análise em SDS-PAGE a 12 % de DXR recombinante a partir de colônias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pGEX-4T-2::*dxr* (número 3), *E. coli* BL21 (DE3) transformada com pGEX-4T-2 parental (número 2) e *E. coli* BL21 (DE3) controle (número 1) na presença de 0,1 mM de IPTG durante 4 h a 30 °C. M. marcador de massa molecular (GE Healthcare). As setas indicam a posição prevista da proteína GST que está sendo expressa na presença de IPTG a 27 kDa.

As seqüências geradas pelo seqüenciamento das extremidades do vetor pGEX-4T-2 ligado ao cDNA de DXR foram novamente analisadas para verificar se havia algum códon de terminação que pudesse justificar a ausência de produtos da expressão da proteína recombinante, ou se o códon de início realmente estava presente e em fase correta de tradução como havia-se previsto pela seqüência gerada do seqüenciamento de pSport1::*dxr*. Pela análise das seqüências geradas (Figura 14), pode-se perceber a presença de uma região 5' não traduzida menor nestas seqüências quando comparada com a região 5' da seqüência gerada pelo seqüenciamento de *dxr* ligado a pSport1 (Figura 13). Essa diferença de nucleotídeos modificou a fase de leitura e pela análise notou-se que o ATG na seqüência de *dxr* está fora de fase em pGEX-4T-2, o que explica a ausência de expressão da proteína DXR recombinante em qualquer uma das condições testadas (Figuras 8 e 9).

4.4 Expressão do Gene *dxr* em Plantas

Com o objetivo de verificar a habilidade da seqüência genômica codificadora da enzima DXR de *E. grandis* em alterar a síntese de terpenos como óleos essenciais, carotenóides, clorofilas, ou hormônios vegetais, foi construído um vetor binário de expressão em plantas contendo o promotor CaMV 35S seguido do cDNA de *dxr* na orientação senso visando a sua super-expressão, como também a versão anti-senso deste cDNA, para a sua inibição.

No presente trabalho, a seqüência completa do cDNA de *dxr* foi removida do vetor pSport1 utilizando-se as enzimas *SalI* e *BamHI*. O fragmento foi purificado do gel após eletroforese, tratado com enzimas para tornar suas extremidades cegas, e ligado ao vetor pUESC28 clivado com *SmaI* e desfosforilado (Figura 10). O pUESC28 é um vetor binário de expressão em plantas modificado a partir do pCAMBIA1390 e, por esta origem, apresenta o promotor CaMV 35S, as bordas direita e esquerda do T-DNA e a marca de resistência para seleção de plantas frente à higromicina (Anexo 7). O produto da ligação do gene *dxr* a pUESC28 foi utilizado para transformar *E. coli* DH10B e a seleção das colônias contendo o vetor foi realizada por meio da resistência à canamicina (50 µg/mL).

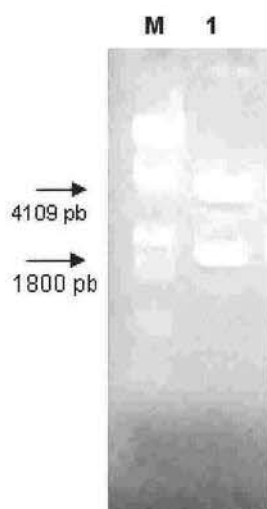


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1% contendo os fragmentos resultantes da digestão do vetor pSport1::*dxr*. O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *SalI* e *BamHI*. M. DNA do bacteriófago lambda clivado com *EcoRI* e *HindII* como marcador de tamanhos de DNA. 1. Padrão de tamanhos de DNA esperado 4.109 pb e ~1.800 pb.

Para confirmar a presença e orientação do inserto, foi realizada a extração de DNA plasmidial de 17 colônias pelo método de lise alcalina e digestão das mesmas com as enzimas de restrição *EcoRI*, que cliva o vetor pUESC28, e *HindIII*, que cliva internamente a seqüência do gene *dxr* na posição 1.193 pb e, também, o vetor pUESC28. Assim, o padrão esperado para pUESC28

parental inclui fargmentos de 8.860 pb e 804 pb, para pUESC28::*dxr* senso é 2.000 pb, 500 pb e 8860 pb, e para pUESC28::*dxr* anti-senso é 1.300 pb, 1.200 pb e 8.860 pb. Como mostrado na Figura 11, somente a minipreparação resultante da colônia 14 apresenta o padrão senso do gene *dxr*. Todas as outras preparações plasmidiais apresentam padrão similar ao pUESC parental.

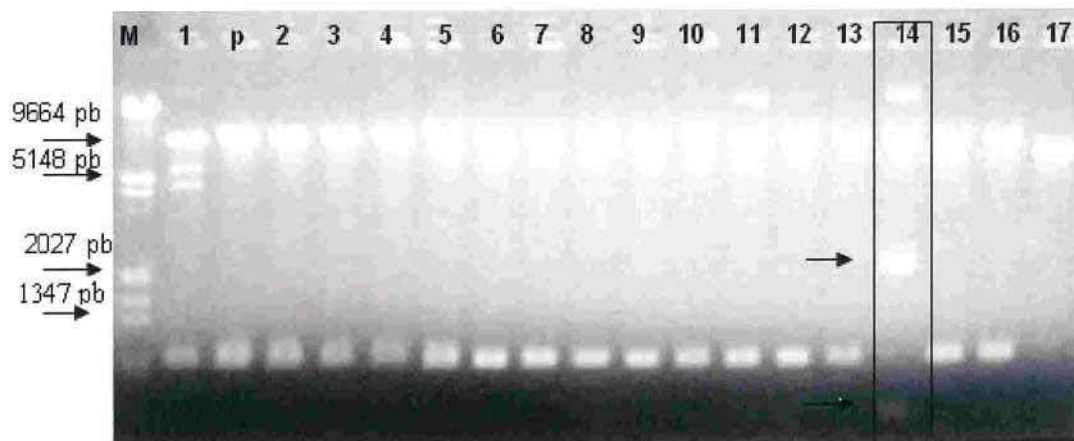


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % contendo os fragmentos resultantes da digestão das 17 minipreparações plasmidiais de pUESC28::*dxr*. O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. M. DNA do bacteriófago lambda clivado com *EcoRI* e *HindIII* como marcador de tamanhos de DNA. Somente a colônia 14, que está marcada, apresenta a inserção senso do gene *dxr*, todas as outras apresentam o mesmo padrão do controle (p), isto é, pUESC parental.

O vetor pUESC28 armado com a versão senso de *dxr* será transferido por choque-térmico para *A. tumefaciens*, bactérias estas utilizadas na infecção e transformação de discos foliares de tabaco. Espera-se que plantas transgênicas de tabaco sirvam para analisar a influência da super-expressão de *dxr* na síntese de terpenos como óleos essenciais, carotenóides, clorofila e hormônios vegetais.

4.5 Análises *in silico* da Seqüência de DXR e Evolução Molecular

A seqüência deduzida de aminoácidos de DXR de *E. grandis* foi submetida ao Psi-Blast no NCBI e o resultado demonstrou que a DXR de *E. grandis* tem alta homologia com as seqüências DXR de outras espécies de plantas, com 89% de identidade com a DXR de *Hevea brasiliensis*. A DXR também foi altamente similar com a DXR de *Lycopersicum esculentum* (87% de identidade,

95% positivos), *Catharanthus roseus* (86% de identidade, 93% positivos), *Antirrhinum majus* (85% identidade, 93% positivos), *Camptotheca accuminata* (85% de identidade, 91% positivos), *Oryza sativa* (85% de identidade, 89% positivos), *Zea mays* (85% de identidade, 90% positivos), *Mentha x piperita* (84% de identidade, 89% positivos), *Arabidopsis thaliana* (82% de identidade, 90% positivos), *Artemisia annua* (81% de identidade, 89% positivos) e *Ginkgo biloba* (78% de identidade, 84% positivos), o que sugere que a DXR de *E. grandis* pertence ao grupo das DXRs.

Para caracterizar a região N-terminal da DXR de *E. grandis*, a seqüência de aminoácidos de oito DXRs de plantas foram alinhadas utilizando-se a ferramenta de alinhamento do Vector NTI 7. O resultado demonstrou que estas DXRs têm alta similaridade em toda a região codificante. Porém, no sítio N-terminal, a seqüência é pobremente conservada, mas enriquecida de resíduos de serina, característica que é típica de peptídeos de trânsito para plastídeos.

Três domínios foram encontrados em todas as DXRs de plantas. O domínio I está no peptídeo de trânsito na região N-terminal da DXR de *E. grandis* e é o provável sítio de clivagem desse peptídeo-sinal, possuindo o motivo conservado Cys-Ser-(Ala/Met/Val/Thr). O segundo domínio contém um extenso motivo rico em prolinas PP(P/S)AWPG(R/T)A (posição 85-91 AA na seqüência de *E. grandis*) também na região N-terminal (Anexo 8). Um terceiro domínio altamente conservado de ligação a NADPH (GSTGSIGT) foi encontrado também na região N-terminal pelo alinhamento das seqüências de aminoácidos tanto de plantas quanto de plantas e bactérias (Anexos 8 e 9). O cofator NADPH é utilizado pela DXR para a conversão de DXP a MEP. Assim, estes resíduos conservados em todas as seqüências DXR podem funcionar como importantes domínios catalíticos da enzima (Yao *et al.*, 2007).

Todas as DXRs clonadas a partir de plantas possuem um peptídeo de trânsito para plastídeos (cTP) identificado pelo programa ChloroP, e este apresenta uma extensa região rica em prolinas na região N-terminal da proteína madura. Esta região não está presente em DXR de procariotos, representados no alinhamento pela seqüência de *E. coli* (Anexo 9).

O cDNA de *dxr* de *E. grandis* representa a primeira seqüência gênica de DXR clonado a partir de espécies da família Myrtaceae e, por isso, é interessante investigar sua posição ou relação evolutiva dentro de uma árvore filogenética contendo várias seqüências de *dxr*. Usando a versão 4 do programa MEGA e a partir do alinhamento de nucleotídeos de cada seqüência pelo ClustalW, a árvore filogenética de *dxr* foi construída a partir de diferentes organismos incluindo plantas (14 seqüências de diferentes espécies de plantas) e bactérias (seqüência de *E. coli*; Figura 12). O

resultado demonstra que o gene *dxr* derivou-se a partir de um gene ancestral e evoluiu em dois grupos, incluindo o grupo de *dxr* de plantas e o *dxr* de bactéria. De acordo com a árvore filogenética, a seqüência de *dxr* de *E. grandis* pertence ao grupo de *dxr* vegetais e é mais ancestral que muitos genes *dxr* como a de *M. piperita* e *C. roseus*, e mais derivada que *dxr* de monocotiledôneas (*O. sativa* e *Z. mays*). Todos esses resultados das análises moleculares por intermédio de bioinformática, *in silico*, sugerem que a seqüência estudada de *E. grandis* codifica uma proteína DXR de planta envolvida na biossíntese de isoprenóides.

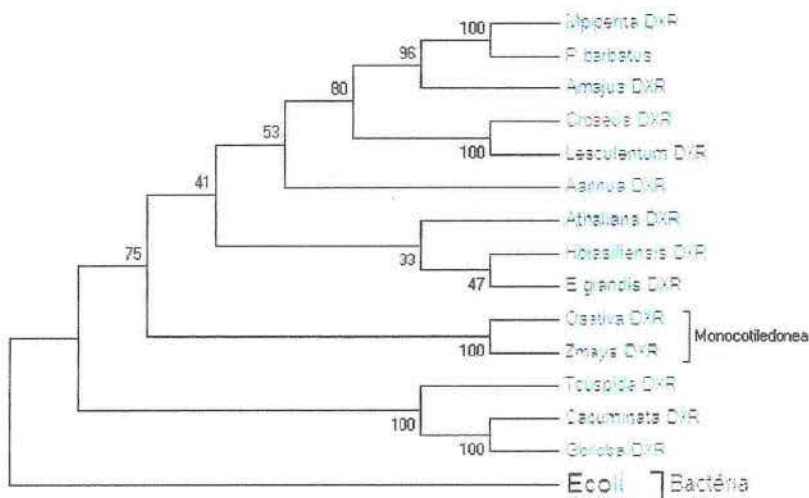


Figura 12. Árvore filogenética demonstrando a relação evolutiva de *dxr* de plantas e bactérias utilizando alinhamento de nucleotídeos pelo ClustalW e análise pelo MEGA versão 4. O método neighbor-joining foi usado para construir a árvore. As seqüências gênicas de *dxr* usadas para análise da árvore foram as das plantas *Mentha x piperita* (número de acesso no GenBank AF116825), *Catharanthus roseus* (AF250235), *Camptotheca acuminata* (DQ355159.1), *Hevea brasiliensis* (DQ437514.1), *Arabidopsis thaliana* (AF148852), *Oryza sativa* (AF367205), *Artemisia annua* (AF182287), *Taxus cuspidata* (AY575140.1), *Antirrhinum majus* (AY770406.1), *Plectranthus barbatus* (AY515699.1), *Ginkgo biloba* (AY494186.1), *Lycopersicon esculentum* (AF331705), *Zea mays* (AJ297566.1) e *Escherichia coli* (AB013300.1).

5- CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A identificação de genes envolvidos na biossíntese de isoprenóides plastidiais de grande valor econômico como os óleos essenciais (monoterpenos), os carotenóides ou o taxol tem aberto as portas para a sua produção biotecnológica por meio da engenharia metabólica. A recente elucidação da rota plastidial DXP e a clonagem dos genes da rota têm permitido a manipulação genética dessa via plastidial em plantas. No presente trabalho, uma ampla revisão bibliográfica foi apresentada no Capítulo 2 visando direcionar a busca por genes candidatos em eucalipto que apresentassem potencial relação com a biossíntese de óleos essenciais. Após o levantamento de dados bibliográficos, alguns genes foram selecionados tendo por base suas importâncias estratégicas na rota de síntese de monoterpenos, sendo eles os codificadores das enzimas DXS, DXR, MDC e IPPI. Utilizando-se ferramentas de bioinformática e tendo por base as suas altas homologies com as seqüências disponíveis no banco de dados do Projeto GENOLYPTUS, seqüências heterólogas potencialmente codificadoras destas enzimas foram identificadas em *E. grandis*. Somente os cDNAs potencialmente completos foram selecionados, sendo que somente o do gene *dxr* foi investigado em maior profundidade por ser o único contendo o códon de início de tradução (Anexo 3).

Assim, com vistas a confirmar a identidade bioquímica e melhor caracterizar o produto do gene *dxr*, o inserto de cDNA foi removido do plasmídeo pSport1 e ligado ao vetor de expressão pGEX-4T-2, e essa construção foi utilizada para transformar *Escherichia coli* utilizando um sistema de expressão com fusão a GST. Por meio deste sistemas, seria esperada a expressão de *dxr* e a obtenção de quantidades suficientes da proteína recombinante para sua caracterização bioquímica.

Para isso, inicialmente foi estudada a seqüência resultante do seqüenciamento do cDNA *de dxr* ligado a pSport1, onde foi verificado o início do cDNA a partir da identificação de um segmento do plasmídeo pSport1 (Figura 13). A partir de então, foi analisada a presença de códon de início de tradução, ATG, no cDNA de *dxr*, que foi localizado no nucleotídeo 78, não sendo verificada a presença de *stop*-códon na região 5' não traduzida. Em seguida, foi verificada a presença de sítios de restrição no plasmídeo pSport1 para a liberação do gene *dxr* mantendo o códon de início de tradução, ATG, em fase de leitura para inserção do gene no vetor de expressão pGEX-4T-2. Apesar da clonagem do gene *dxr* em pGEX-4T-2 ter sido confirmada (Figura 7), não houve expressão da proteína DXR recombinante ligada a GST em quaisquer das condições de expressão testadas. A razão para esse resultado foi encontrada após o seqüenciamento das extremidades do vetor pGEX-4T-2 ligado a *dxr*, onde a análise da seqüência gerada demonstrou a presença de uma região 5' não

seqüenciamento de *dxr* ligado a pSport1. Essa diferença de nucleotídeos (39 pb) modificou a fase de leitura e, dessa forma, o ATG na seqüência de nucleotídeos do cDNA de DXR está fora de fase em pGEX-4T-2, o que explica a ausência de expressão da proteína DXR recombinante em qualquer uma das condições testadas (Figura 14).

Com o resultado do seqüenciamento de pGEX-4T-2::*dxr*, confirmamos a inserção do gene DXR neste vetor, esclarecemos a ausência da expressão desta proteína recombinante em *E. coli* e podemos, agora, estudar novas condições de expressão para esse gene, permitindo-se, assim, a continuação de sua caracterização bioquímica. Assim, mais especificamente, os próximos passos a serem dados neste sentido incluem: (i) Repetir os experimentos de expressão heteróloga de *dxr* fusionado ao gene de GST em *E. coli*, utilizado-se desta vez o plasmídeo pGEX-4T-1 que mantém a fase de leitura da seqüência desse gene; (ii) Gerar plantas transgênicas de tabaco, transformadas com a versão senso e anti-senso do gene *dxr* para analisar a influência de sua super-expressão ou inibição na síntese de terpenos, como óleos essenciais; (iii) Obter a seqüência completa dos genes de *E. grandis* codificadores de DXR, MDC, IPPI I e IPPI II para futuros estudos e caracterização dos mesmos; (iv) Investigar outros genes-chave da rota de biossíntese de óleos essenciais como aqueles codificadores de GTT (geraniltranstransferase) e GPP (geranildifosfato sintase).

```

1   A S G S R F R F S F P L K F P P F P S
1   CAGGCGTCCGGCTCCCGCTTCGCTTCTCCCTTCCCTCAAGTTCCTCCCTTTCCCTCC
21  F G F G Q I F V F P M A L N L L S P A E
61  TTTGGTTTGGGCAAATTTTGTTCCTCCAGCTCTTAATTTGTGTGTCGCGCCGCGAG
41  I K A V S F L D S T K S N H H L H H L N
121 ATCAAGGCCGTTTCGTTCTTGGATTCTACGAAGTCAAATCACCACCTTCACCACCTCAAT
61  K L P G V Y T L K R K D C G T R R I H C
181 AAGTTGCCAGGTGTATATACGTTGAAGAGGAAGGATTGTGGAACGAGAAGAATACATTGT
81  S A Q P P P P A W P G R A V P E T N R K
241 TCAGCACAGCCGCTCCACCAGCCTGGCCTGGACGAGCTGTCCCGAGACAAATCGTAAA
101 L W D G P K P I S I V G S T G S I G T Q
301 TTGTGGGATGGCCGAAGCCGATTTCTATTGTTGGATCTACTGGTTCCATTGGAACACAG
121 T L D I V A E N P D K F R V V A L A A G
361 ACTTTGGACATAGTAGCAGAGAACCCTGATAAATTCAGAGTCGTGGCTCTTGACGCTGGA
141 S N V T L L S D Q V K R F K P Q L V A V
421 TCAAATGTACACTTCTATCTGATCAGGTTAAGAGATTCAAGCCTCAATTGGTCCGAGTT
161 R N E S L V D E L K E A L S D V E D K P
481 AGGAATGAGTCACTAGTTGATGAACTCAAGGAGGCTCTATCTGATGTTGAAGACAAGCCT
181 E I I P G E Q G V I E V A R H P D A V .T
541 GAGATCATTCCAGGGGAACAAGGAGTTATTGAGGTGGCCCGCCATCCAGACGCTGTAAC
201 V V T G I V G C A G L K P T V A A I E A
601 GTAGTTACAGGTATAGTTGGTTGTGCAGGACTAAAGCCTACAGTGGCTGCCATTGAAGCA

```

```

221  G K D I A L A N K E T L I A G G P F V L
661  GGCAAGGACATAGCTTTGGCCAATAAGGAGACCCTCATTGCAGGAGTCCTTTTGTGCTC

241  P L A H K H K V K I L P A D S E H S A I
721  CCCCTTGCACACAAGCATAAAGTGAAGATTCTTCCGGCTGATTCTGAACATTCTGCCATA

261  F Q C I Q G L P E G A L R R I I L T A S
781  TTTCAAGTATTACAGGTTTACCAGAAGGTGCACTTCGGCGAATTATTTTACTGCATCG

281  G G A F R D W P V D K L K E V K V A D A
841  GGTGGGCTTTCAGGGATTGCCAGTAGATAAATTAAGAAGTCAAAGTTGCTGATGCT

301  L K H P N W N M G K K I T V D S A T L F
901  TTGAAGCATCCTAACTGGAATATGGGGAAAAGATTACTGTTGACTCTGCTACCCCTTTTC

321  N K G L E V I E A H Y L Y G A D Y D H I
961  AATAAGGGTCTTGAAGTCAATGAAGCGCATTATCTCTATGGAGCAGACTATGACCATATT

341  E I V I H P Q S I I H S M V E T Q D S S
1021  GAGATTGTGATTATCCCAATCTATCATTCACTCGATGGTGGAGACACAGGATTCATCC

361  V L A Q L G W P D M R L P I L Y T M S W
1081  GTTCTCGCACAATTAGGGTGGCCCGATATGCGATTGCCGATCCTCTACACGATGTCATGG

381  P E R I Y C S E I T W P R L D L C K L G
1141  CCAGAGAGGATTTACTGCTCTGAAATAACTTGGCCTCGACTCGACCTTTGCAAGCTTGGT

401  S L T F K A P D N V K Y P S N G S C L C
1201  TCACTAACATTCAAAGCTCCTGACAATGTGAAATATCCATCCAATGGATCTTGCCTATGC

421  C W T G
1261  TGCTGGACGGCT

```

Figura 13. Seqüência de cDNA de *dxr* utilizada para expressão em *E. coli*. Na figura, está representada a seqüência de 1.250 nucleotídeos de *dxr* obtida a partir do seqüenciamento de plasmídeo pSport1. Em rosa está o fragmento do plasmídeo pSport1, em cinza está a região 5' não traduzida de *dxr* (78 pb) e, em verde, o ATG, códon de início da tradução. Como pode ser observado, o ATG está na fase correta de leitura e não há a presença de *stop*-códon na região 5' não traduzida de *dxr*.

```

1  - L V - K R K G S Y P T S - - V I E I Q
1  TAAATGGCTTTAAAAACCTAAAGGAAGCTATCCACATCATGATAAGTAATGAAATCCAG

21  Q V S S M A F A G L A S H V W W W R P S
61  CAAGTTTCTAGCATTCGCTTTTCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTCGCTGGTGGCGACCATCC

41  S K I G S G S A W I P R N S R V D P R V
121  TCCAAAATCGCATCTGGTTCGCGGTGATCCCCAGGAATTCGCGGATPCGACCCACGGCTC

61  R F P P L V L G K F L F S R W L L I C C
181  CGTTTCCCTCCCTTTPSGTTTGGGCAAATTTTGTGTTTCCCGATGGCTCTTAATTTGCTGT

81  R R P R S R P F R S W I L R S Q I T T F
241  CGCCGGCCGAGATCAAGGCCGTTTCGTTCTTGGATTCTACGAAGTCAAATCACCACCTTC

101  T T S I S C Q V Y I R - R G R I V E R E
301  ACCACCTCAATAAGTTGCCAGGTGTATATACGTTGAAGAGGAAGGATTTGTGGAACGAGAA

121  E Y I V Q H S R L H Q P G L D E L F P R
361  GAATACATTGTTTCAGCACAGCCGCTCCACCAGCCTGGCCTGGACGAGCTGTCCCGAGA

141  Q I V N C G M A R S R F L L L D L L V P
421  CAAATCGTAAATTTGGGGATGGCCCGAAGCCGATTTCTATTGTTGGATCTACTGGTTCCA

161  L E H R L W T - - Q R T L I N S E S W L
481  TTGGAACACAGACTTTGGACATAGTAGCAGAGAACCCTGATAAATTCAGAGTCGTGGCTC

181  L Q L D Q M L H F Y L I R L R D S S L N
541  TTGACGCTGGATCAAATGTTACACTTCTATCTGATCAGGTTAAGAGATTCAAGCCTCAAT

```

```

201  L V A V R N E S L V D E L K G G S I - C
601  TTGGTCGCAGTTAGGAATGAGTCACTAGTTGATGAACTCAAGGGAGGCTCTATCTGATGT

221  - R Q A - D H S R E Q G S Y - G G P P S
661  TGAAGACAAGCCTGAGATCATCCAGGGAACAAGGAAGTTATTGAGGTGGCCCGCCATCC

241  R P C Y C S Y K Y S G L C R T K A Y S A
721  AGACCCTGTTACTGTAGTTACAAGTATAGTGGGTTGTGCAGGACTAAAGCCTACAGTGCT

261  A I E A G K D I A F G K R R P S L Q E V
781  GCCATTGAAGCAGGCAAGGACATAGCTTTTGGCAAAGGAGACCCTCATTGCAGGAAGTC

281  L L G L P L P Q Q K V K I L S A E F - N
841  CTTTTGGGGCTCCCTTGCCACAGCAAAAAGTGAAAATCCTTTCCGCTGAATTCTGAAAT

301  F G L F Q V F Q V N E G G P P R I F - V
901  TTCGGCCTTTTTCAGGTTTCCAGGTTAACGAAGGGGGCCTCCGCGAATTTTTGAGTG

321  P R G G F Q D G P G K I K E P S A V A -
961  CCTCGGGGGGCTTTCAGGATGGCCCGGAAAAATAAAAGAGCCAAGTGCCGTAGCTTGA

341  T L N W D G G K D S V L A P L K V W N L
1021 ACTCTTAACTGGGATGGGGGAAAAGATAGTGTACTCGCTCCCTTAAGGTTTGGAACCTAG

```

Figura 14. Seqüência resultante do seqüenciamento de *dxr* ligado ao vetor pGEX-4T-2. Em azul está representado o plasmídeo pGEX-4T-2. Sublinhado está o sítio de *Sall* (GTCGAC), o qual foi utilizado para clivar o gene *dxr* do plasmídeo pSport1 (em rosa), e foi restabelecido pela ligação de *dxr* a pGEX-4T-2 também clivado com essa mesma enzima. Em cinza está a região 5' não traduzida de *dxr* (39 pb) e, em verde, o ATG, códon de início da tradução. Como pode-se observar a partir do resultado desse seqüenciamento, a região 5' não traduzida do gene *dxr* é menor do que a representada pela na Figura 13. Essa diferença de nucleotídeos (39 pb) modificou a fase de leitura e, dessa forma, o ATG na seqüência de nucleotídeos do gene *dxr* está fora de fase em pGEX-4T-2, o que explica a expressão de GST nas colônias testadas e a ausência de DXR recombinante.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, P.; HECHT, S.; EISENREICH, W.; KAISER, J.; GRAWERT, T.; ARIGONI, D.; BACHER, A.; ROHDICH, F. Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 12108–12113, 2000.

ARAKI, N.; KUSUMI, K.; MASAMOTO, K.; NIWA, Y.; IBA, K. Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1- deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiology*. 108 :19-24, 2000.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; STRUHL, K. Current protocols in molecular biology. Wiley, New York, 2001.

BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; FLYNN, T. M.; LASSAK, E. V. Volatile leaf oil of *E. delegatensis* seedlings. *Phytochemistry*. 21:2467-2469, 1991.

BRAGA, N. C. Os óleos essenciais no Brasil: estudo econômico. Rio de Janeiro: Instituto de óleos. p 158-161, 2001.

BOTELLA-PAVIA, P.; BESUMBES, O.; PHILLIPS, M.A.; CARRETERO-PAULET, L.; BORONAT, A.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: Evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*. 40:188–199, 2004.

BOUVIER, F.; D'HARLINGUE, A.; SUIRE, C.; BACKHAUS, R. A.; CAMARA, B. Dedicated roles of plastid transketolase during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiology*. 117: 1423-1431, 1998.

CARRETERO-PAULET, L.; AHUMADA, I.; CUNILLERA, N.; RODRIGUEZ- CONCEPCION, M.; FERRER, A.; BORONAT, A.; CAMPOS, N. Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* *DXR* gene encoding 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, the first

- committed enzyme of the 2-C-Methyl-Derythritol- 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*. 129:1581-1591, 2002.
- CHAHED, K.; OUDIN, A.; GUIVARC'H, N.; HAMDI, S.; CHENIEUX, J.H.; RIDEAU, M.; CLASTRE, M. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid producing cells. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38:559-566, 2000.
- CHAPPELL, J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthesis pathway in plant. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46: 521-547, 1995.
- DORAN, J. C. Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: Inkata. P. 11-28, 1991.
- DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*. 28: 637-646, 2003.
- EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*. 6:1360-1385, 2001.
- ESTÉVEZ, J. M.; CANTERO, A.; REIDL, A.; REICHLER, S.; LEÓN, P. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:22901-22909, 2001.
- HERZ, S.; WEEKUL, W. J.; SCHUHR, C.A.; HECHT, S.; LUTTGEN, H.; SAGNER, S.; FELLERMEIER, M.; EISENREICH, W.; ZENK, M. H.; BACHER, A. ; ROHDICH, F. Biosynthesis of terpenoids: *YgbB* protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol2, 4-cyclodiphosphate; *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 97: 2486-2490, 2000.
- FRAY, R. G; WALLACE, A.; FRASER, P. D.; VALERO, D.; HEDDEN, P.; BRAMLEY, P.M.; GRIERSON, D. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant Journal* . 8: 693-701, 1995.
- KUTCHAN, T. Alkaloid biosynthesis – the molecular basis for metabolic engineering in plant. *Plant Cell*, 7: 1059-1070, 1995.

- LANGE, B. M.; WILDUNG, M. R.; MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 95: 2100-2104, 1998.
- LANGE, B. M. & CROTEAU, R. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 365:170-174, 1999a.
- LEWINSOHN, E.; SCHALECHET, F.; WILKINSON, J. 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, 2001.
- LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:47-65, 1999.
- LIU, Y.; WANG, H.; YE, H.; LI, G. Advances in the plant isoprenoid biosynthesis pathway and its metabolic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*. 7:769-782, 2005.
- LOIS, L. M.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; GALLEGRO, F.; CAMPOS, N.; BORONAT, A. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase. *The Plant Journal*. 22: 503-513, 2000.
- MAHMOUD, S. S. & CROTEAU, R. B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 98:8915-8920, 2001.
- MAHMOUD, S. S. & CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*. 2: 1360-1385, 2002.
- PANG, Y.; SHEN, G.; BERGE, T.; WU, C. W.; SUN, X.; TANG, K. Molecular cloning, characterization and heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a mevalonate diphosphate decarboxylase cDNA from *Ginkgo biloba*. *Physiologia Plantarum*. 127: 19-27, 2006.
- PENFOLD, A. R.; WILLIS, J. L. *The Eucalyptus: botany, cultivation, chemistry and utilization*. London, 550p, 1991.
- PERES, L.E.P. *Metabolismo secundário*. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 2000.
- PEZZUTO, J. M. Plant derived anticancer agent. *Biochemical Pharmacology*. 53: 121-133, 1997.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 64: 3-19, 2003.

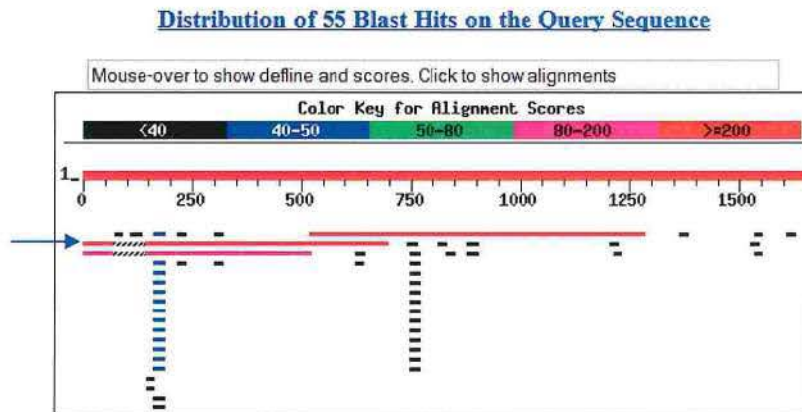
WU, J.; WOUTERS, J.; POULTER, C. D. Isopentenyl diphosphate isomerase. mechanism-based inhibition by diene analogues of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. *Journal of the American Chemical Society*. 127:17433-17438, 2005.

YAMAKAWA, H.; KATOU, S.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; KAMADA, H. & OHASHI, Y. Plant MAPK Phosphatase Interacts with Calmodulins. *Journal of Biological Chemistry*. 279 : 928-936, 2004.

7- ANEXOS

Anexo 1

Query= *C.roseus*
(1650 letters)



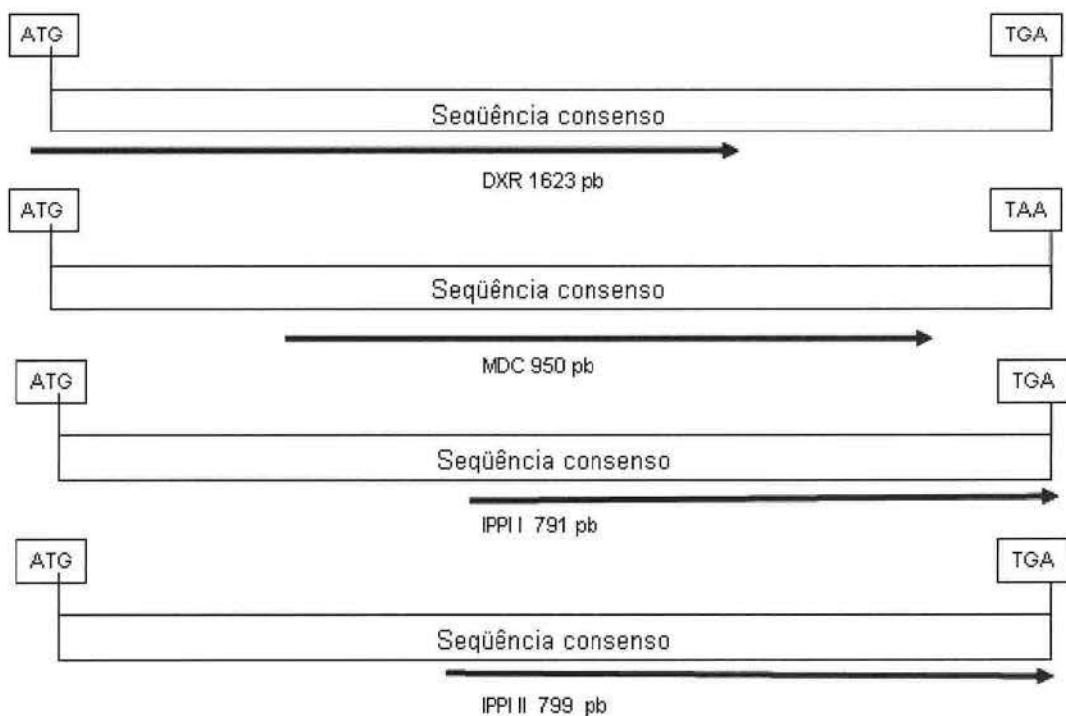
Anexo 1. Resultado gráfico da comparação da seqüência nucleotídica consenso de *dxr* de *Catharanthus roseus* com o banco de dados do Projeto GENOLYPTUS pelo programa BLASTn na página de Serviços do Genolyptus (www.lge.ibi.unicamp.br/eucalyptus). Na figura estão representadas todas as potenciais seqüências similares à seqüência de *dxr* de *C. roseus* na população de cDNA do banco de dados do Projeto GENOLYPTUS. A seta indica a seqüência escolhida para trabalhar por incluir o códon ATG de início da tradução.

Anexo 2

Anexo 2. Tabela contendo os gene candidatos e o resultado da comparação com a seqüência consenso de cada um através do programa BLASTn e tBLASTx disponíveis no NCBI.

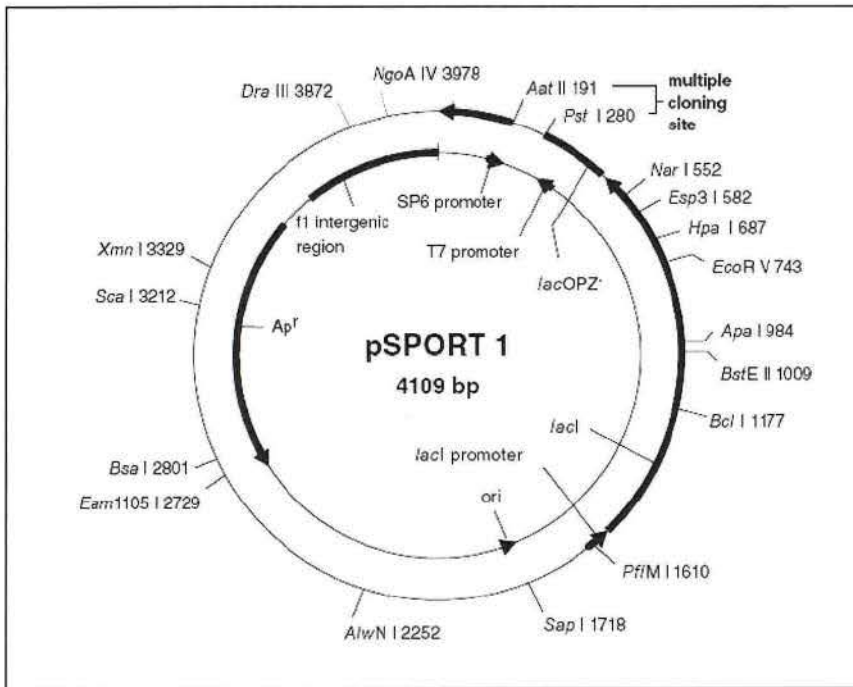
Nome da Enzima	Nome do Gene	Seq. Consenso	Seq. Genolyptus	Blastn	tBlastx
Rota Plastídica Independente de Mevalonato (MEP)					
1-Desoxixilulose 5-fosfato sintase	<i>dxps ou dxs</i>	>AJ011840.2 C. roseus mRNA for DXS	EUGR-FL-001-043-H08-GO	126/155 (81%)	406/543 (74%)
1-Desoxixilulose 5-fosfato reductoisomerase	<i>dxr</i>	>AF250235 C.roseus (dxr) mRNA, complete cds	EUGR-PU-003-042-F07-MG.R	683/830 (82%)	310/341 (90%)
Rota Citosólica Dependente de Mevalonato					
Difosfomevalonato descarboxilase	<i>mdc</i>	>AK228357.1 A. thaliana mRNA for MDC complete cds	EUGR-TS-001-037-B08-AF.R	214/257 (83%)	125/147 (85%)
Isopentenildifosfato delta-isomerase I	<i>ippi I</i>	>ref NM_121649.4 A. thaliana IPPI I mRNA, complete cds	EUGR-TS-002-019-B05-CN.R	384/488 (78%)	191/221 (86%)
Isopentenildifosfato delta-isomerase II	<i>ippi II</i>	>ref NM_111146.2 A. thaliana IPPI II mRNA, complete cds	EUGR-SE-001-006-E07-RS.S	435/545 (79%)	204/241 (84%)

Anexo 3

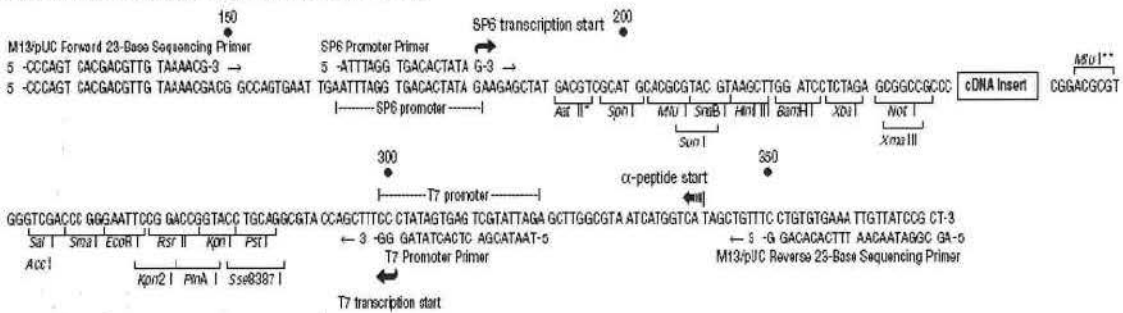


Anexo 3. Esquema demonstrando o posicionamento da sequência de cada um dos genes candidatos da síntese de monoterpenos obtida no banco de dados do Projeto GENOLYPTUS na sequência consenso e os códons de início e término de tradução.

Anexo 4



pSPORT 1 multiple cloning site and primer binding regions: 125-372



* Requires increased enzyme:DNA for complete digestion.

* The Mlu I restriction site is contained within the Sal I adapter introduced into the vector upon ligation of the cDNA insert.

Anexo 4. Mapa esquemático do vetor pSport1 (Invitrogen). Está sendo mostrado também o sítio de multiclonagem utilizado na remoção do fragmento de *dvr*.

Anexo 5

Anexo 5. Alinhamento das seqüências resultantes do ressequenciamento dos cDNA dos genes codificadores de DXR, MDC, IPPI I e IPPI II de *E. grandis* com as seqüências consenso de *C. roseus* ou *A. thaliana*, utilizando o programa ClustalW disponível em <http://www.ebi.ac.uk.clustalw/#>. A seqüência de *dxr* de *C. roseus* está disponível no GenBank sob o código de acesso AF250235, a seqüência de *mdc* de *A. thaliana* AK228357.1A, a seqüência de *ippi* I de *A. thaliana* NM_121649.4 e a seqüência de *ippi* II de *A. thaliana* sob o código de acesso NM_111146.2.

Alinhamento DXR:

```

DXRCroseus -----
DXRGenolyptus CACGCGTCCGGCTCGCGCTTCGCTTCTCCTTTCTCTCAAGTTCCTTCTTTCCCTCC 60

DXRCroseus -----ATGGCTTTGAATTCGCTGTCCCCACCTAAA 30
DXRGenolyptus TTTGGTTTGGGCAAATTTTGTTCCTCCGATGGCTCTTAATTTGCTGTGCGCCGGCCGAG 120
                ***** * **** * ***** ** * *

DXRCroseus ATCAAGACTATTTCTGTTCTGGATTCTCCTCAAGTCGAATTATAATCTTAATCTTCTCAA- 89
DXRGenolyptus ATCAAGGCCGTTTCTGTTCTGGATTCTACGAAGTCAAATCACCACCTTACCACCTCAAT 180
                ***** * ***** * ***** * * * * * * * * * *

DXRCroseus --GCTCCCAGGAGGATTTGCTTTTAAGAAGAAAGATTTGGAGCAAGTGSCGGAAAGAAA 147
DXRGenolyptus AAGTTGCCAGGTGTATATACGTTGAAGAGGAAGGATTTGGAAACGAG-----AAGA 231
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus ATTCAATGTTTCACTACAGCCACTCCACCGGCATGGCCGGGGAGGGCTGTTGCAGAGCCT 207
DXRGenolyptus ATACATTTGTTTCACTACAGCCACTCCACCGGCATGGCCGGGGAGGGCTGTTGCAGAGCCT 291
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus GGTTATAAGACTTTGGGAAGGTGAGAAGCCATTCAATAGTTGGCTCTACAGGCTCAGTA 267
DXRGenolyptus AATCGTAAATTTGGGATGGCCGAAGCCGATTTCTATTTGTTGGATCTACTGGTTCCATT 351
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus GGAACTCAGACTAGATATAGTTGCTGAGAATCCAGACAAATTTAGAGTTGTTGCACTT 327
DXRGenolyptus GGAACACAGACTTTGGACATAGTAGCAGAGAACCCTGATAAATTCAGAGTCGTGGCTCTT 411
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus GCTGCCGGTTCAAACGTGACTCTTCTGCTGATCAGGTCAAACATTCAAGCCTCAGTTA 387
DXRGenolyptus GCAGCTGGATCAAATGTTACTTCTATCTGATCAGGTTAAGAGATTCAGCCTCAATTTG 471
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus GTTCTGTGCAAAATGAGTCAATGGTTAATGAACTCAAAGAGGCTTTATCTGATGTTGAT 447
DXRGenolyptus GTCCGAGTTAGGAATGAGTCACTAGTTGATGAACTCAAGGAGGCTCTATCTGATGTTGAA 531
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus GACAAACCTGAAATTTCTTGGCGAACAAGGTGTTGTTGAGGTTGTCCTGCTCAGAT 507
DXRGenolyptus GACAAGCCTGAGATCATTCAGGGGAACAAGGAGTTATTGAGGTGGCCCGCCATCCAGAC 591
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus GCTGTCAACCGTTGTTACTGGAATAGTCGGCTGTGCAGGCTTAAAGCCTACAGTGGCTGCC 567
DXRGenolyptus GCTGTAACGTAGTTACAGGTATAGTTGGTTGTTGTCAGGACTTAAAGCCTACAGTGGCTGCC 651
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus ATAGAAGCTGGAAAAGACATTGCCTTGGCCAATAAAGAGACACTAATCGCTGGTGAWCCT 627
DXRGenolyptus ATTTGAAGCAGGCAAGGACATAGCTTTGGCCAATAAAGGAGACCCTCATTTGCAGGAGTCTT 711
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus TTTGTGCTTCTCTTGCACACAAGCATAAAGTGAAGATTCTTCTGCTGATTGAGAATCAT 687
DXRGenolyptus TTTGTGCTCCCCCTTGCACACAAGCATAAAGTGAAGATTCTTCCGGCTGATTCTGAACAT 771
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

DXRCroseus TCTGCTATATCCAGTGTATCCAAGGTTTGCCGGAGGGTGTCTTAGGCGCATAATTTTA 747

```



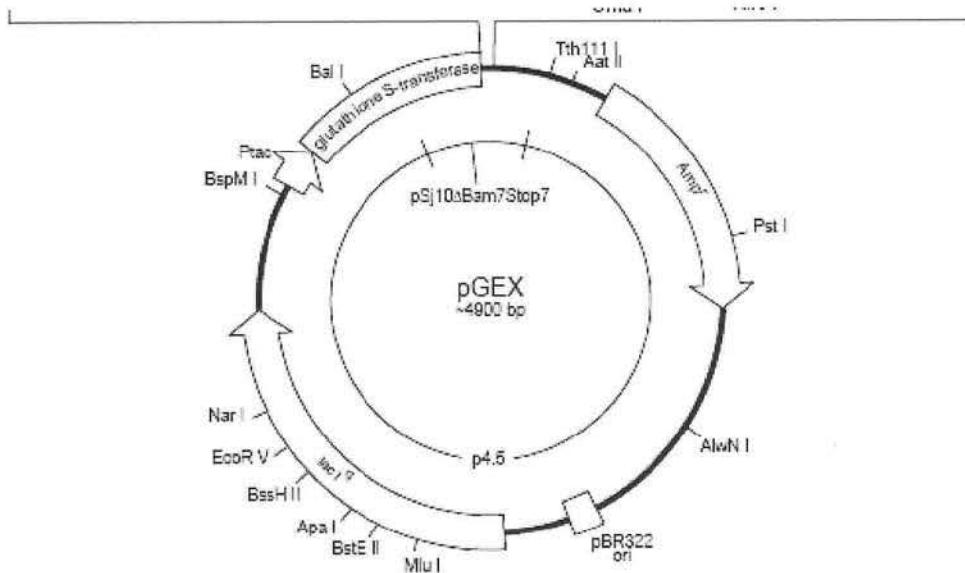
```

IPPIIIAthaliana      TTCAGATGGTGGTGGACAATTCTTGATGAAGTGGTGGGATCATGTTGAGAAAGGAACT 839
IPPIIIGenolyptus    TTCAAATT--ATGGTGGACA-CTTCTTGTTC--FGGTGGGACC-TGTC-AGAAGGGAAC 743
                    **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *  **** *
IPPIIIAthaliana      TTGGTTGAAGCTATAGACATGAAAACCATCCACAAACTCTGAACATCTTTTTTAAAGTT 899
IPPIIIGenolyptus    GAAGGAGCAGCTG-----ATTGAAACATCCCAGCTGACCGGAATTTTGGCGGGACCGTA 798
                    *  *  ****  **  ****  ***  ****  *  *  *  *  *  *  *  *
IPPIIIAthaliana      TTTAAATCAATCAACTTCTCTTCATCATTTTTATCTTTTCGATGATAATAATTGGGAT 959
IPPIIIGenolyptus    CATAAGGCGGGAAA----- 812
                    *** *  **
IPPIIIAthaliana      ATGTGAGACACTTACAAAACCTCCAAGCACCTCAGGCAATAATAAAGTTTTCGTTTTTAT 1019
IPPIIIGenolyptus    -----
IPPIIIAthaliana      CTTAATT 1026
IPPIIIGenolyptus    -----

```

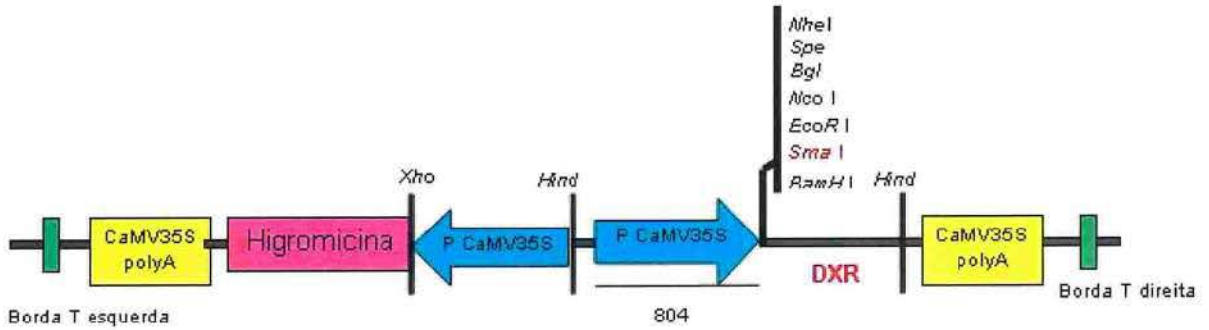

pGEX-4T-2 (27-4581-01)

Thrombin
Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA
BamH I EcoR I Sma I Sal I Xho I Not I Stop codon



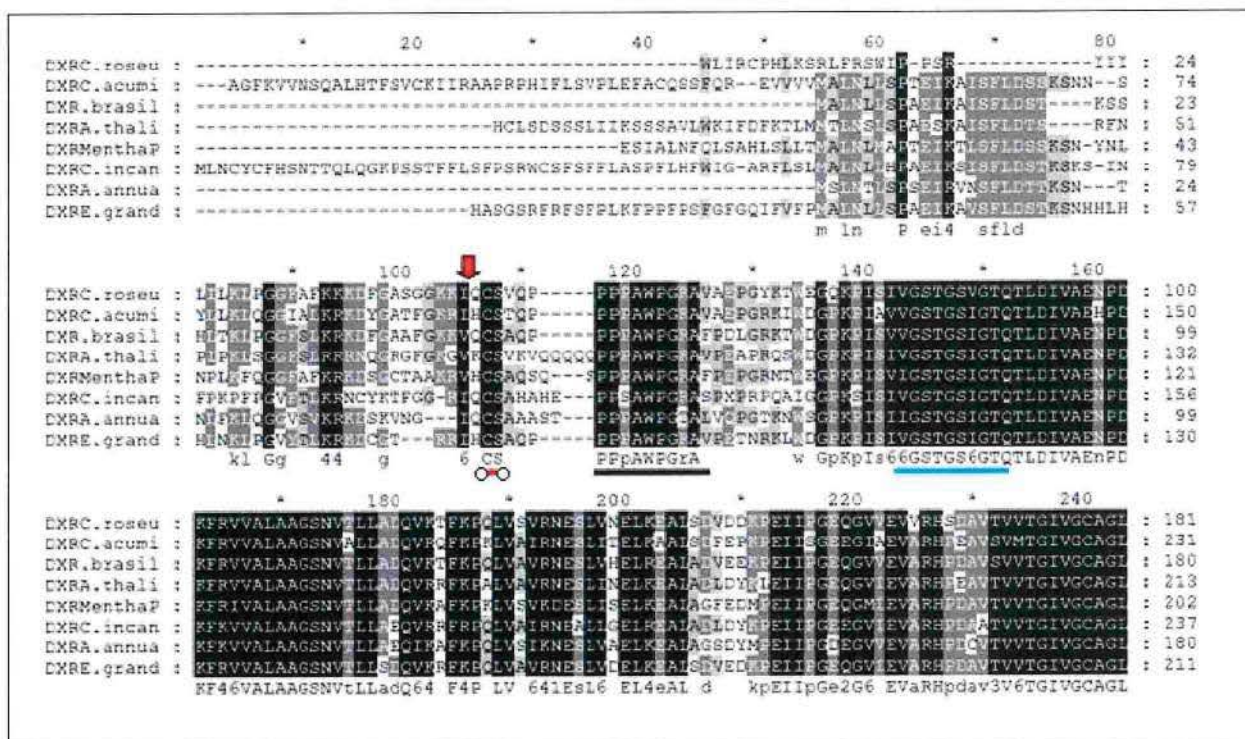
Anexo 6. Mapa esquemático do vetor pGEX (GE Healthcare) de fusão a glutathione-S-transferase. Está sendo mostrado o sítio de multiclonagem na versão do pGEX-4T-2 além do sítio de clivagem proteolítica por trombina.

Anexo 7



Anexo 7. Desenho esquemático do vetor de expressão binário pUESC28, contendo a seqüência do gene *dxr* na versão senso. A ligação do gene no vetor foi realizada no sítio da enzima de restrição *Sma*I (em vermelho).

Anexo 8



Anexo 8. Alinhamento da região N-terminal de seqüência de aminoácidos de DXRs de plantas utilizando o programa vector NTI 7. Três domínios altamente conservados foram encontrados em todas as DXRs de plantas e estão sublinhados. O domínio I (em vermelho) é o provável sítio de clivagem do peptídeo-sinal, e possui o motivo conservado Cys-Ser-(Ala/Met/Val/Thr). O segundo domínio (em preto) contém um extenso motivo rico em prolínas PP(P/S)AWPG(R/T)A (posição 81-91 pb) na seqüência de DXR de *E. grandis* também na região N-terminal. O terceiro domínio (em azul) é um domínio altamente conservado de ligação a NADPH (GSTGSIGT), encontrado também em procariotos, como pode ser visto no Anexo 9. O provável sítio de clivagem do peptídeo de trânsito para plastídeos foi predito pelo programa ChloroP e está indicado pela seta. As DXRs usadas para análise foram as das plantas *Mentha x piperita* (número de acesso no GenBank AF116825), *Catharanthus roseus* (AF250235), *Camptotheca acuminata* (DQ355159.1), *Hevea brasiliensis* (DQ437514.1), *Arabidopsis thaliana* (AF148852), *Artemisia annua* (AF182287) e *Cistus incanus* (AY297794.2).

