



II COLÓQUIO NACIONAL DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS

Vila das Caldas do Gerês
Terras de Bouro
28 e 29 de Setembro de 2007

Actas

Influência da capacidade de biotransformação na produção de voláteis por culturas de raízes transgênicas de *Anethum graveolens*

Jorge M. Faria*, Luís G. Pedro, A. Cristina Figueiredo, Helena Trindade e José G. Barroso

Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências de Lisboa, DBV, Centro de Biotecnologia Vegetal, C2, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal.

* j_m_s_faria@yahoo.co.uk

Resumo

As plantas aromáticas são fonte de um variado leque de produtos químicos cujas propriedades permitem o seu uso como matéria-prima de medicamentos, produtos e aditivos alimentares, pigmentos e agro-químicos. As vias biossintéticas destes compostos são extremamente complexas transformando a síntese química num processo difícil ou, muitas vezes, impossível. A biotransformação permite a conversão de substratos complexos, abundantes e de baixo custo, recorrendo a células ou extractos purificados de enzimas como catalizadores. Com o objectivo de avaliar a capacidade das culturas de raízes transgênicas de *Anethum graveolens* biotransformarem o álcool monoterpénico mentol, este substrato foi adicionado às culturas, 2,5 semanas (18 dias) após a inoculação, numa concentração de 25mg/L. As culturas foram mantidas em meio de SH, sob escuridão permanente a 24°C, com agitação a 80 r.p.m. A avaliação do crescimento foi efectuada pelo método da desassimilação e pela medição do peso fresco e peso seco das raízes ao longo de 7 semanas. A componente volátil, extraída por destilação-extracção, foi analisada por CG e CG-EM. A adição de mentol não provocou qualquer alteração no fenótipo das raízes transgênicas, mas induziu uma diminuição no crescimento das culturas, quando avaliado em termos de peso seco e de peso fresco. No entanto, quando o crescimento foi avaliado em termos de desassimilação, verificou-se um ligeiro aumento nas culturas a que se adicionou o mentol. A componente volátil constitutiva das raízes transgênicas de *A. graveolens* é composta, em mais de 50%, por falcarinol (6-56%), apiole (4-24%), ácido palmítico (8-16%) e ácido linoleico (3-9%). Após a adição, a concentração relativa de mentol decresceu rapidamente num período de 48h e observou-se a concomitante produção de acetato de mentilo. Este foi o único produto de biotransformação detectado e a sua concentração relativa diminuiu gradualmente ao longo do tempo de cultura. A maior actividade metabólica necessária para biotransformar o mentol em acetato de mentilo pode justificar o aumento de crescimento em termos de desassimilação sem que se verifique aumento de biomassa.

Palavras-chave: Umbelliferae, Apiaceae, CG-EM, Mentol, Acetato de Mentilo

Abstract

Title: Influence of the biotransformation capacity in the production of volatile compounds by hairy root cultures of *Anethum graveolens*.

Aromatic plants are a source of great variety of chemical products whose properties allow their use as raw material for medicine, food products and additives, pigments and agrochemicals. The biosynthetic pathways for these compounds are

extremely complex which makes chemical synthesis into a difficult or, many times, impossible process. Biotransformation allows the conversion of low cost abundant complex compounds using whole cells or purified enzyme extracts as catalysts. To evaluate the menthol biotransformation capacity of *Anethum graveolens* hairy root cultures, this monoterpene alcohol was added, 2,5 weeks (18 days) after inoculation, in a concentration of 25mg/L. The cultures were maintained in SH medium, in permanent darkness, at 24°C, and 80r.p.m. Hairy root growth was measured by the dissimilation method and by fresh and dry weight determination, throughout 7 weeks. The volatile component, extracted by distillation-extraction, was analyzed by GC and GC-MS. The addition of menthol did not induce any change in the hairy root phenotype, but it reduced growth, measured in fresh and dry weight. However, the dissimilation assay revealed a slight increase in the growth of menthol added cultures. The constitutive volatile component of the *A. graveolens* hairy roots is composed, in more than 50%, by falcarinol (17-56%), apiol (4-24%), palmitic acid (8-16%) and linoleic acid (3-9%). After addition, the relative concentration of menthol quickly decreased in a period of 48h, and a concomitant production of menthyl acetate was observed. This was the only detectable biotransformation product and its relative amount diminished gradually throughout culture time. The raise in the metabolic activity necessary to biotransform menthol into menthyl acetate can justify the increase in dissimilation without biomass increase.

Keywords: Umbelliferae, Apiaceae, GC-MS, menthol, menthyl acetate

Introdução

Anethum graveolens L., de nome comum aneto ou endro, é uma Umbelliferae/Apiaceae aromática, de origem asiática, muito utilizada na medicina popular, em particular pelas suas propriedades antidiarreica, anti-emética, anti-espasmódica, anti-inflamatória, anti-séptica, aperiente, aromática, carminativa, depurativa, digestiva, diurética, anti-dispepsia, estimulante, estomáquica, galactagoga, hipnótica, laxante, resolutive e supurativa (Simon et al., 1984).

Pela sua semelhança com o anis e o funcho, passou a ser conhecida por "falso anis", "funcho bastardo" ou "funcho fedorento" sendo, no entanto, uma planta de porte arbustivo mais baixo e de ciclo anual, ao contrário do anis.

Hoje em dia, o óleo essencial desta planta é amplamente comercializado tanto para utilizações culinárias como medicinais, sendo a sua produção limitada pelas condicionantes da agricultura tradicional. A cultura de células ou de raízes transgênicas é uma potencial alternativa para a produção de metabolitos secundários valiosos e com importância industrial (Rao & Ravishankar, 2002).

A biotransformação permite a obtenção de novos produtos usando como catalizador a própria célula vegetal, sendo esta reacção alcançada sem a necessidade de recorrer a pH e/ou temperaturas extremas (Giri et al., 2001). As células vegetais têm o potencial de transformar substâncias complexas abundantes e de baixo custo, como subprodutos industriais, em compostos raros e valiosos, mas um dos problemas do uso da biotransformação em culturas de células é a sua elevada variação somaclonal (Giri et al., 2001). A manutenção de culturas de raízes transgênicas permite não só a conservação de uma cultura de células diferenciadas, com uma elevada taxa de crescimento, como também a obtenção continuada de um óleo essencial de qualidade homogênea (Giri & Narasu, 2000; Santos et al., 2002) e uma fácil manipulação das

condições de cultura, cujas alterações se reflectem no metabolismo secundário (Costa, 2005).

Neste trabalho foi investigado o efeito da adição do substrato mentol no crescimento e composição da componente volátil das raízes transgênicas de *Anethum graveolens*.

Material e métodos

Material

As raízes transgênicas foram estabelecidas de acordo com o descrito por Santos et al. (2002) e mantidas, em assepsia, em meio de cultura SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), em condições de obscuridade, a 24°C, sob agitação a 80r.p.m. e sujeitas a subculturas periódicas, com intervalos de 3 semanas.

Estudo do crescimento

A determinação do crescimento das raízes transgênicas de *A. graveolens*, controlo e às quais foi depois adicionado substrato, foi efectuada por três metodologias distintas: o método da desassimilação (Santos et al. 2002), a medição do peso fresco e do peso seco. Estas metodologias partilham a fase de inoculação na qual 1g de p.f. de raízes transgênicas foi colocada em 100ml de meio SH (10g L⁻¹) em Erlenmeyer de 250ml selados com rolhas porosas de poro reduzido e controlado. O crescimento foi avaliado num período experimental de cultura de 7 semanas nas condições descritas acima. Para cada frasco teste foi realizado uma réplica.

Para a determinação do crescimento por desassimilação os frascos Erlenmeyer foram pesados diariamente numa balança com precisão de 1mg, durante todo o período de cultura.

O peso fresco de raízes retiradas semanalmente do lote de frascos foi determinado numa balança de alta precisão. Para a determinação do peso seco foram utilizadas amostras das raízes utilizadas na medição do peso fresco. As amostras foram pesadas antes e depois da liofilização, realizada a uma pressão de 10⁻¹ mbar e temperatura de -42°C durante 3 dias.

Estudo da capacidade de biotransformação

Decorridos 18 dias de cultura foi adicionado, em condições de assepsia, uma mistura de metanol-substrato (2% v/v) visando a obtenção de uma concentração de 25mg/L de substrato em cada frasco. A mesma adição foi realizada em frascos contendo apenas meio de cultura, sujeitos às mesmas condições dos anteriores, para efeitos de controlo.

O acompanhamento do efeito do substrato na produção de voláteis foi realizado retirando raízes na 1^a, nas seguintes 4, 8, 24, 32 e 48h, após a aplicação do substrato, e semanalmente até ao fim do período de cultura, sendo guardadas a -20°C para posterior extracção dos óleos essenciais.

Extracção dos óleos essenciais

A extracção da componente volátil foi realizada por destilação-extracção num aparelho de Likens-Nickerson (Likens-Nickerson, 1964) utilizando *n*-pentano destilado como solvente e com uma duração de 3h.

Análise dos óleos essenciais

Cromatografia Gasosa: As análises de Cromatografia Gás-Líquido (CGL) foram efectuadas num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois Detectores de Ionização de Chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injector, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida (30mx0,25mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) e DB - 17HT de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10min. Temperatura do injector e dos detectores, 290°C e 280°C, respectivamente. Gás de arrastamento, hidrogénio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s. Relação de repartição de fluxo, 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada, usando o método da normalização, pela integração das áreas dos picos sem utilização de factores de correcção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções por extracto.

Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa: Nas análises de Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massa (CGL/EM) utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30mx0,25mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175 °C, com incrementos de 3 °C/min, e subsequentemente a 15 °C/min até 300 °C. Atingidos os 300 °C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min; temperatura da linha de transferência, 280 °C; temperatura da câmara de ionização, 220 °C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70eV; corrente de ionização, 60µA; gama de massas, 40-300u; tempo de varrimento, 1 s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório.

Resultados

O método da desassimilação permite avaliar o crescimento com base na actividade metabólica das culturas. As culturas *in vitro* perdem peso ao longo do tempo devido à evaporação de H₂O do meio e à relação consumo de O₂/libertação de CO₂ resultante da sua actividade metabólica. Anulando as perdas de H₂O com controlos, a perda de peso por parte das culturas deve-se à perda de carbono. Assim, uma curva de crescimento determinada pelo método de desassimilação permite avaliar sobretudo a actividade metabólica das culturas e não tanto o aumento de biomassa.

Apesar de se poder dever a um crescimento diferencial entre culturas, no gráfico da Figura 1 é visível um afastamento da curva das culturas com adição de mentol em relação à curva controlo. Este afastamento torna-se ainda mais evidente após a adição do mentol na segunda semana. Por volta do 30º dia de cultura ocorre uma diminuição no crescimento das culturas. A fase estacionária é atingida ao mesmo tempo nas duas curvas, cerca dos 32 dias, mas nas culturas com mentol, observa-se ainda algum crescimento até ao final do período em estudo.

As curvas obtidas para o crescimento com base no peso fresco e no peso seco

são muito semelhantes entre si (Figura 1), o que sugere que os valores do peso fresco se devem a um crescimento efectivo e não a um aumento de teor hídrico. Após o trigésimo dia é atingida a fase estacionária cessando o aumento de peso. A adição de mentol antes de atingida a fase estacionária vai reduzir o aumento de peso quando comparado com os valores do controlo embora os iguale quando é atingida a fase estacionária.

A componente volátil constitutiva foi analisada durante o período de cultura de 7 semanas e está representada na Tabela 1. O grupo de compostos dominantes, cuja percentagem é superior a 5% pelo menos uma vez no período experimental de cultura, é constituído por faltarinol, apiole, ácido palmítico, ácido linoleico e *n*-octanal. A porção volátil extraída das raízes transgénicas de *A. graveolens* é caracterizada por uma fraca componente monoterpénica, em que predominam os monoterpénos oxigenados (1-8%) e pela dominância do grupo dos poliacetilenos, representado pelo faltarinol (ou panaxynol), um potencial anti-cancerígeno (Zheng et al. 1999), cuja percentagem relativa variou entre os 5 e 56%. A fracção restante é dominada pelos ácidos gordos (11-23%) como o ácido palmítico (8-16%) e o ácido linoleico (6-9%), e o grupo dos fenilpropanóides cuja percentagem relativa varia entre 6% e 31% durante as 7 semanas, sendo essencialmente dominado pelo éter aromático apiole (4-24%). Ao longo das 7 semanas quase todos os compostos apresentam comportamentos variantes, no entanto é patente um decréscimo na proporção de apiole desde a 1ª semana até à 7ª, quando as culturas já estão plenamente dentro da fase estacionária. O faltarinol é, também, muito afectado pelo fase de crescimento das culturas atingido um pico na 5ª semana (Tabela 1) e diminuindo bruscamente até à última semana. Estes resultados são parcialmente secundados pelos obtidos por Santos et al. (2002) para culturas de raízes transgénicas de *A. graveolens* havendo algumas diferenças significativas quanto aos componentes dominantes. O mais flagrante é a ausência de ácidos gordos no estudo anterior, o que se deve, muito provavelmente, ao uso de um meio de cultura com uma constituição diferente, como recentemente analisado por Costa (2005).

A capacidade de biotransformação foi testada pela adição do álcool monoterpénico mentol após a segunda semana de cultura. Na Figura 2 estão representadas as curvas de evolução do substrato adicionado (mentol) e do produto obtido (acetato de mentilo), ausente da composição volátil constitutiva das raízes transgénicas de *A. graveolens*. Nas primeiras 48h após a adição, o mentol é rapidamente transformado em acetato de mentilo. A percentagem de mentol na componente volátil é de 57%, uma hora após a adição, diminuindo até 5% decorridas 48h. Concomitantemente é produzido acetato de mentilo, ascendendo de 4%, na primeira hora após a adição, até 58% passadas 48h. Decorridos 2 dias após a adição, o mentol não é completamente biotransformado, variando a sua proporção entre 2% e 9%, no final do período experimental de cultura. O acetato de mentilo é lentamente assimilado ao longo do tempo chegando, inclusivamente, a percentagens relativas menores do que o mentol na 7ª semana de cultura.

Discussão

Os resultados obtidos para o crescimento das culturas de raízes transgénicas de *A. graveolens* estão em concordância com os obtidos por Santos et al. (2002) onde a concentração de inóculo foi o dobro da utilizada neste trabalho (20g/L). A constituição do meio de cultura é essencial e parcialmente determinante na mistura de voláteis produzidos por culturas de raízes transgénicas (Santos et al., 2002; Costa, 2005).

As raízes transgénicas de *A. graveolens* parecem possuir um sistema

biossintético que é capaz de rapidamente assimilar o álcool monoterpénico mentol e transformá-lo em acetato de mentilo. Na origem deste comportamento poderá estar uma transacetilase semelhante à estudada em *Mentha x piperita* (Kjonaas et al., 1982) que activamente promove uma reacção de acetilação sobre o substrato.

Os resultados, aparentemente diferentes, obtidos para o crescimento das culturas com base no peso fresco ou seco e com base na desassimilação, sugerem uma maior actividade metabólica das culturas de raízes transgénicas de *A. graveolens* após a adição de mentol, provavelmente direccionada para a sua biotransformação em acetato de mentilo.

Referências

- Costa, M.M. 2005. Raízes transgénicas de *Levisticum officinale* como sistema modelo para o estudo da produção de voláteis. *Tese de Mestrado*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C.C., Singh, A., Ward O.P. & Narasua, M.L. 2001. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances* 19, 175-199.
- Giri, A., Narasu, M.L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances* 18, 1-22.
- Kjonaas, R., Martinikus-Taylor, C. & Croteau, R. 1982. Metabolism of monoterpenes: conversion of l-menthone to l-menthol and d-neomenthol by stereospecific dehydrogenases from Peppermint (*Mentha x piperita*) leaves. *Plant Physiology* 69, 1013-1017.
- Likens, S.T. & Nickerson, G.B. 1964. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *American Society of Brewing Chemists, Proceedings*, 5-13.
- Rao, S.R. & Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20, 101-153.
- Santos, P.A.G., Figueiredo, A.C., Lourenço, P.M.L., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Oliveira M.M., Schripsema, J., Deans, S.G. & Scheffer, J.C. 2002. Hairy roots of *Anethum graveolens* (dill): establishment, growth, time-course study of their essential oil and its comparison with parent plant oils. *Biotechnology Letters* 24, 1031-1036.
- Schenk, U.R. & Hildebrandt, A.C. 1972. Medium techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50, 199-204.
- Simon, J.E., Chadwick, A.F. & Craker, L.E. 1984. An Indexed Bibliography 1971-1980 – The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Elsevier Science Publishers. Amesterdão. p:33-34.
- Zheng, G., Lu, W., Aisa, H.A., & Cai, J. (1999). Absolute configuration of falcarinol, a potent antitumor agent commonly occurring in plants. *Tetrahedron Letters*. 40, 2181-2182.

Quadros e figuras

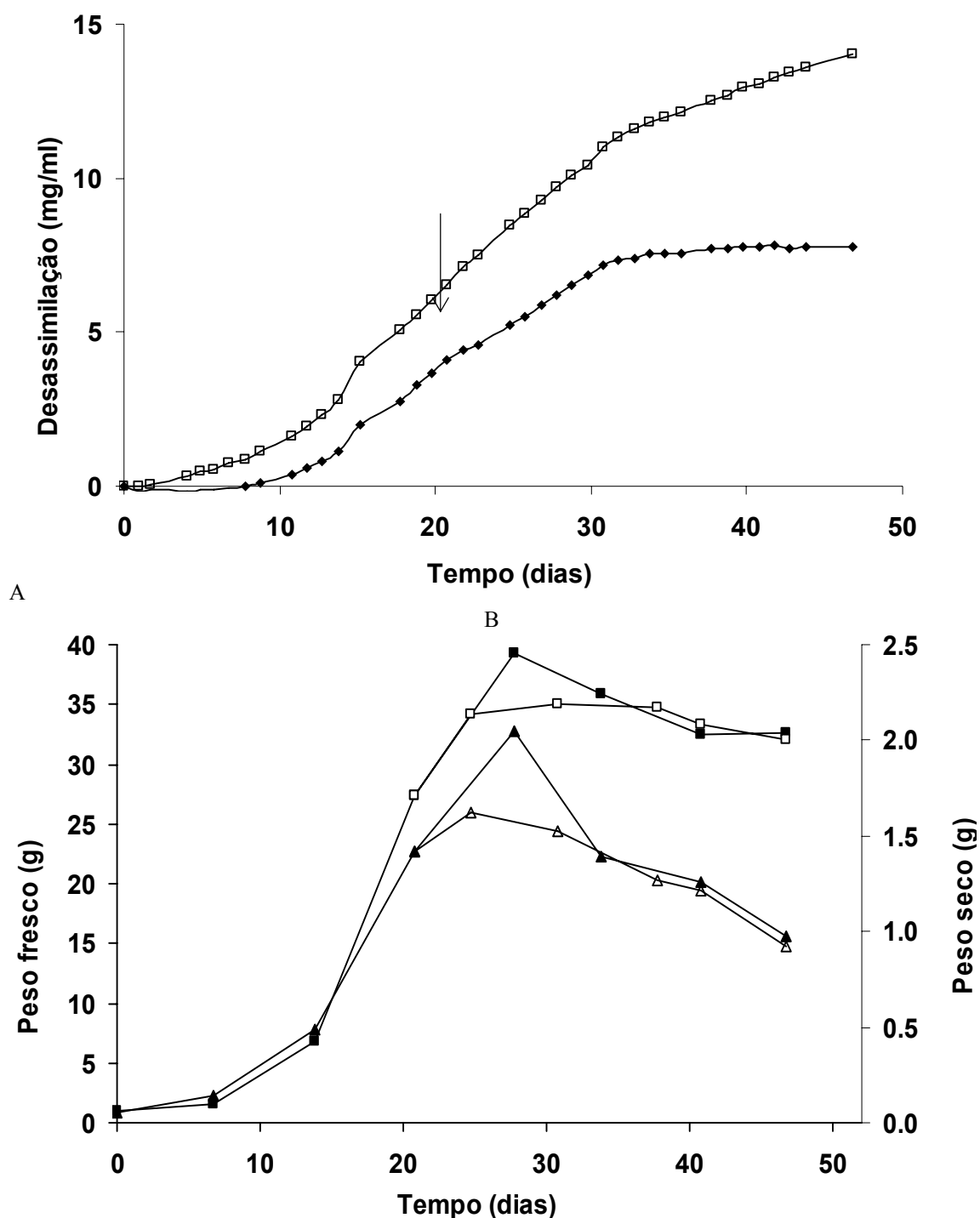


Figura 1. Curvas de crescimento obtidas pelo método da desassimilação (A): controle (◆) e com mentol (◻); pela medição do peso fresco (B): controle (■) e com mentol (◻); e pela medição do peso seco (B): controle (▲) e com mentol (◻). Momento de adição de mentol no 18º dia (↓)

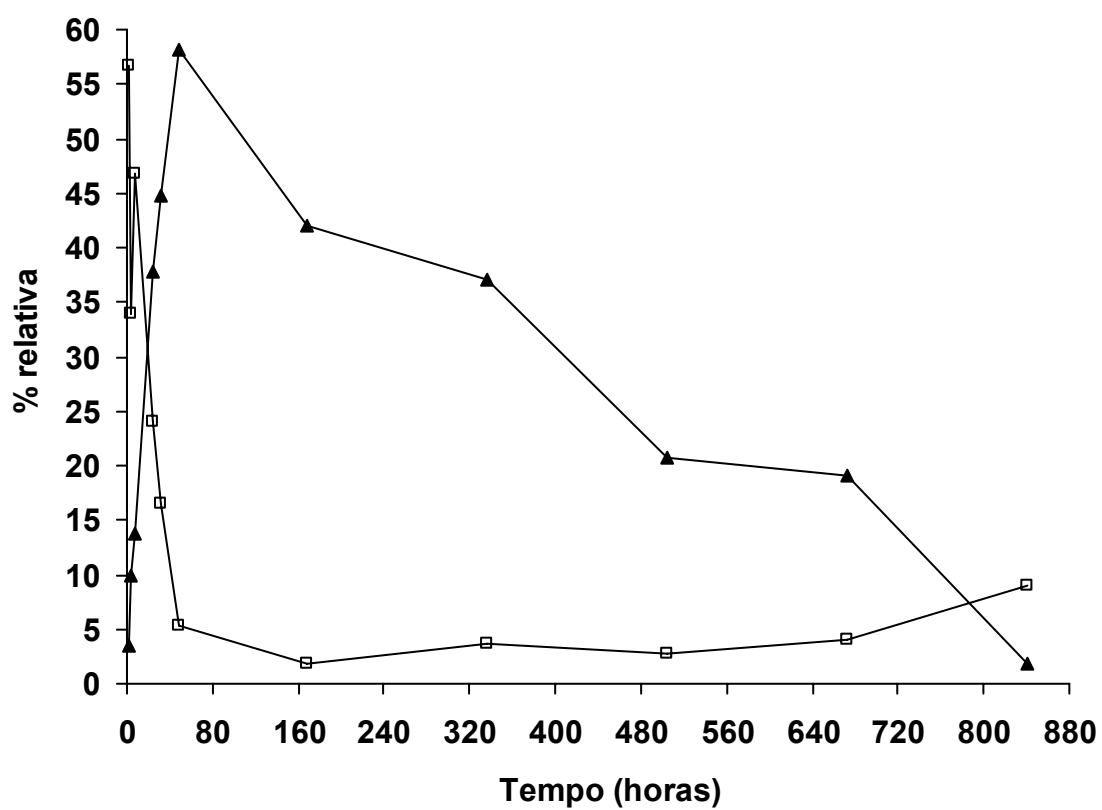


Figura 2. Variação das percentagens relativas de mentol (—□—) e de acetato de mentilo (—▲—) desde o momento da adição do substrato até ao final do tempo de cultura

Tabela 1. Composição percentual relativa da componente volátil de raízes transgênicas de *Anethum graveolens* mantidas em meio SH durante 7 semanas em condições de obscuridade

Componentes	IR	Dias						
		7	14	21	28	35	42	49
Benzaldeído	927	0.1	v	v	v	v	0.3	0.2
α -Pineno	930	0.5	0.1	0.4	0.1	v	0.3	0.3
<i>n</i> -Heptanol	952	0.1	0.1	v	0.1	v	0.1	0.3
Sabineno	958	v	v	v	v	v	v	v
1-Octen-3-ol	961	v	v	v	v	v	v	v
β -Pineno	963	0.4	0.7	1.2	0.2	v	0.3	0.4
2-Octanona	967	0.2	v	v	v	v	v	0.3
2-Pentilfurano	973	v	v	v	1.9	v	v	1.5
Octanal	973	2.6	2.8	2.9	v	0.3	5.8	5.3
Benzeno acetaldeído	1002	0.3	0.1	0.2	0.1	v	0.2	0.6
<i>p</i> -Cimeno	1003	0.3	v	v	v	v	v	v
Limoneno	1009	0.3	0.2	0.3	0.2	v	0.2	0.2
<i>n</i> -Octanol	1045	0.1	v	v	v	v	v	0.1
2-Nonanona	1058	0.3	0.3	0.4	0.3	v	0.6	0.6
Terpinoleno	1064	0.3	0.2	0.3	v	v	0.1	1.0
2-Hexilfurano*	1064	v	v	v	v	v	v	0.1
Feniletilalcolol	1064	v	v	v	v	v	v	0.1
Nonanal	1073	0.4	0.8	0.5	0.4	1.0	1.1	1.2
Vertocitral C*	1077	0.3	0.2	0.4	0.3	v	0.5	0.6
<i>trans</i> -Tagetona	1116	0.3	0.6	1.1	0.9	v	2.3	2.9
<i>cis</i> -Tagetona	1123	v	v	0.5	v	v	1.1	v
2- <i>trans</i> -Nonen-1-al	1114	0.9	1.0	1.0	1.1	v	2.1	3.5
Decanal	1180	0.4	0.3	0.2	0.3	v	0.5	0.6
<i>cis</i> -Ocimenona	1200	0.7	0.2	0.2	0.3	v	0.5	0.7
<i>trans</i> -Ocimenona	1207	v	v	0.2	v	v	0.2	0.5
2- <i>trans</i> -Decenal	1224	0.5	0.4	0.4	0.4	v	0.9	2.0
2 <i>trans</i> -4 <i>cis</i> -Decadienal	1242	0.1	0.2	0.3	0.3	v	0.4	0.9
2-Undecanona	1271	0.4	0.1	0.1	0.2	v	0.5	0.4
Carvacrol	1286	0.7	2.0	1.3	2.2	0.7	2.9	3.2
2 <i>trans</i> -4 <i>trans</i> -Decadienal	1286	0.5	0.2	v	v	0.6	1.2	1.3
<i>trans</i> -4-Undecenal*	1402	0.6	0.2	0.5	1.0	v	1.6	1.9
Miristicina	1493	4.2	3.6	2.5	1.4	1.4	1.6	1.7
Dill apiole	1587	2.6	1.9	0.8	1.1	0.5	2.0	v
Apiole	1640	23.7	13.4	8.0	6.6	7.6	16.7	3.8
Ácido Mirístico	1723	0.5	0.1	v	0.5	v	v	0.1
Ácido Palmítico	1908	16.4	11.7	9.2	8.3	12.0	8.4	12.4
Falcarinol	2002	17.2	40.3	48.3	53.1	55.8	24.7	5.3
Ácido Linoleico	2125	5.8	8.0	8.8	7.6	6.0	2.9	6.3
% de Identificação		81.7	89.7	90.0	88.9	85.9	80.0	60.3
Componentes agrupados								
Hidrocarbonetos monoterpênicos		1.8	1.2	2.2	0.5	v	0.9	1.9
Monoterpenos oxigenados		2.0	3.0	3.7	3.7	0.7	7.5	7.9
Poliacetilenos		17.2	40.3	48.3	53.1	55.8	24.7	5.3
Fenilpropanoides		30.5	18.9	11.3	9.1	9.5	20.3	5.5
Ácidos gordos		22.7	19.8	18.0	16.4	18.0	11.3	18.8
Outros		7.5	6.5	6.5	6.1	1.9	15.3	20.9

v = vestigial (<0,1%). IR = índice de retenção relativa a uma série de C₉-C₂₄ *n*-alcanos na coluna DB-1.

* = identificação baseada apenas no espectro de massa.