

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
ICB - INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
MESTRADO EM IMUNOLOGIA / GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Diego Pandeló José

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DOIS GENES DE
ENZIMAS DA VIA DE TERPENOS EM *Lippia alba* (MILL) N.E.
BROWN (Verbenaceae)**

Juiz de Fora
2009

2009

PGCBIO

Diego Pandeló José

ICB/UFJF

DIEGO PANDELÓ JOSÉ

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DOIS GENES DE
ENZIMAS DA VIA DE TERPENOS EM *Lippia alba* (MILL) N.E.
BROWN (Verbenaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – área de Genética e Biotecnologia – da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos
Co-orientador: Professor Doutor Lyderson Facio Viccini**

Juiz de Fora
2009

José, Diego Pandeló

Clonagem e caracterização parcial de dois genes de enzimas da via de terpenos em *Lippia alba* (MILL) N.E. (Verbenaceae) / Diego Pandeló José. - 2009.
68 f. :il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Imunologia / Genética e Biotecnologia)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Clonagem. 2. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa. I. Título.

CDU 602.7

DIEGO PANDELÓ JOSÉ

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE DOIS GENES DE
ENZIMAS DA VIA DE TERPENOS EM *Lippia alba* (MILL) N.E.
BROWN (Verbenaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – área de Genética e Biotecnologia – da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos
Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Professor Doutor Lyderson Facio Viccini
Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Professor Doutor Francisco José de Lima Aragão
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Antonio José e Maria Lúcia, e à minha irmã Larissa, por todo apoio incondicional e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que ele tem me proporcionado. Aos meus pais e minha irmã por todo o apoio. Agradeço a Bárbara por todo apoio, amor e carinho ao longo desses anos, bem como a toda sua família. A todos os meus familiares, que sempre acreditaram em mim. Ao orientador e amigo Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos pela constante presença nos momentos em que mais precisava. Ao Professor Dr. Lyderson Facio Viccini por todos os seus ensinamentos – científicos e para a vida. À Professora Dra. Cíntia Marques Coelho por sua colaboração nesse trabalho. Ao Dr. Marco Antônio Machado pela colaboração e pelas análises de sequenciamento. Ao grande amigo José Marcello Salabert pelos seus ensinamentos e constante incentivo. À amiga Talita Diniz pela colaboração prestada e pela amizade sincera. Ao amigo Robert Domingues pelo auxílio nas análises de sequenciamento. À Junya Singulani pelo auxílio nas análises cromatográficas. Agradeço a Natália pelo carinho, incentivo e por nossa convivência tão harmoniosa. Aos amigos Valter José Marcelino (Vejota), Luciano Mazzocoli, Raphael Bartoli, Guilherme Gorni, Alessandro Arcoverde, Alexsander Amorim, Fabrício Oliveira, Isabella Barreto, Raphael Vermelho, Clenio Germano, Silvionei Augusto, Gutenberg Nascimento, Maiana Reis, Raquel Simiqueli, Ana Paula Pessoa, João Paulo Braga, Luís Francisco Fazza (Chiquinho) e Patrícia Costa, pela enorme amizade, carinho e apoio. Aos amigos Arthur Damásio, Juliana Mainenti, Lucas Pinheiro e Neima Menezes, pela grande amizade formada no laboratório. A todos os demais amigos e todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho. Aos professores, funcionários e colegas do curso de mestrado, bem como aos amigos do laboratório. À Universidade Federal de Juiz de Fora. À Pós Graduação em Ciências Biológicas – Imunologia/Genética e Biotecnologia. À FAPEMIG e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae, inclusa no clado Asteridaee, ordem Lamiales, compreendendo aproximadamente 175 gêneros e 2800 espécies, onde muitos gêneros apresentam plantas com propriedades medicinais e ornamentais. A espécie *Lippia alba*, originária da América do Sul, também ocorre no Brasil e é uma das mais estudadas do gênero *Lippia*. Ela floresce durante o ano todo e recebe grande destaque no gênero, devido às suas inúmeras propriedades medicinais. O óleo essencial de *Lippia alba* é composto basicamente por sesqui e monoterpenos, que são as substâncias responsáveis por suas propriedades medicinais. O objetivo central do presente trabalho foi clonar e analisar a expressão de dois potenciais genes codificadores de terpeno sintases em *Lippia alba*. Através do alinhamento de genes codificadores de monoterpeno sintases caracterizadas, primers degenerados foram desenhados dentro de regiões conservadas e utilizados para se obter a clonagem de genes codificadores de terpeno sintases em *Lippia alba*. Dois potenciais genes codificadores de terpeno sintases foram clonados, *LaTPS12* e *LaTPS23*. Após a clonagem, técnicas de RT-PCR semiquantitativo foram empregadas para análises de expressão desses dois genes em diferentes estágios foliares e em três diferentes quimiotipos de *Lippia alba*. Os resultados mostraram que em folhas situadas no quarto segmento nodal o gene *LaTPS12* apresenta maior nível de expressão. A diferença na expressão do gene *LaTPS23* foi menos acentuada nos três quimiotipos analisados em relação ao gene *LaTPS12*, que apresentou uma expressão diferencial. Análises filogenéticas foram realizadas comparando-se as seqüências desses dois genes com outros genes codificadores de terpeno sintases já caracterizadas de diferentes espécies de plantas. De acordo com essas análises, *LaTPS12* e *LaTPS23* pertencem à classe TPS-b, que é composta principalmente por monoterpeno sintases de angiospermas.

Palavras chave: *Lippia alba*. Terpeno sintases. Clonagem gênica. Monoterpenos. RT-PCR.

ABSTRACT

The genus *Lippia* belongs to Verbenaceae family, Asteridaee, order Lamiales. This family comprises about 175 genus and 2800 species, and many of them have medicals and ornamentals proprieties. *Lippia alba* is native from South America, and is also found in Brazil and is the most studied species of the genus *Lippia*. This plant blooms throughout the year and has great importance due to its medicinal properties. The *Lippia alba* essential oils are composed by sesquiterpenes and monoterpenes conferring its medicinal properties. The aim of this work was to clone and to analyze gene expression of putative terpene synthases genes (*TPS*) in *Lippia alba*. Alignment of *TPS* genes was used to design degenerate primers into conserved domains for cloning of these genes in *Lippia alba*. We have cloned two putative *TPS* genes, *LaTPS12* and *LaTPS23*. After cloning, semiquantitative RT-PCR was employed to expression analysis of these two genes in different leaf stages and among three different chemotypes of *Lippia alba*. The result of expression level showed that *LaTPS12* occurred at higher level in leaves located in fourth nodal segment and showed a marked differential expression among the chemotypes. The difference of expression of the *LaTPS23* was less prominent comparing the three studied chemotypes. We performed a phylogenetic analysis in order to compare the *LaTPS12* and *LaTPS23* to others *TPS* genes in different plant species. The results showed that these *LaTPS12* and *LaTPS23* belong to the class *TPS-b*, which comprises mainly angiosperms monoterpene synthases genes.

Keywords: *Lippia alba*. Terpene synthases. Gene cloning. Monoterpenes. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Foto dos quimiotipos de <i>Lippia alba</i> localizados na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora.....	14
Figura 2: Representação de compostos terpênicos.....	19
Figura 3: Formas isoméricas do linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol).	21
Figura 4: Biossíntese de terpenóides em plantas.....	24
Figura 5: Ataque nucleofílico prematuro da água ao substrato geranyl difosfato impedindo que o produto formado seja cíclico	26
Figura 6: Esquema de uma limoneno sintase (A) e uma linalol sintase (B)	26
Figura 7: Estágios foliares de <i>Lippia alba</i> quimiotipo linalol utilizados para a extração de RNA.....	34
Tabela 1: Genes codificadores de monoterpene sintases (<i>lis</i> e <i>lms</i>) de diferentes espécies	36
Tabela 2: Sequências dos <i>primers</i> degenerados utilizados para a clonagem dos genes <i>lis</i> em <i>Lippia alba</i>	36
Figura 8: Esquema de um gene <i>tps</i> mostrando suas regiões conservadas e em quais delas cada <i>primer</i> degenerado foi desenhado.....	37
Tabela 3: Componente(s) majoritário(s) e principais monoterpene presentes no óleo essencial dos quimiotipo linalol, geraniol e citral	40
Figura 9: Amplificação de genes codificadores de TPS diretamente do DNA genômico do quimiotipo linalol.	42
Figura 10: Alinhamento das sequências gênicas clonadas <i>LaTPS12</i> e <i>LaTPS23</i> usando o programa ClustalW 1.81.	43

Figura 11: Alinhamento das possíveis sequências de aminoácidos codificadas por <i>LaTPS12</i> e <i>LaTPS23</i> , utilizando o programa ClustalW 1.81	43
Figura 12: Distribuição íntron/exon em genes <i>TPS</i> classe III, de acordo com Trapp e Croteau (2001).	44
Figura 13: Padrão GT/AG indicando a provável distribuição íntron/éxon nas sequências de <i>LaTPS12</i> e <i>LaTPS23</i>	45
Figura 14: Expressão do gene <i>LaTPS12</i> em diferentes estágios foliares do quimiotipo linalol.	46
Figura 15: Expressão do gene <i>LaTPS12</i> nos três quimiotipos de <i>Lippia alba</i> analisados.	47
Figura 16: Expressão do gene <i>LaTPS23</i> nos três quimiotipos de <i>Lippia alba</i> analisados.	48
Figura 17: Árvore filogenética gerada pelo alinhamento de <i>LaTPS12</i> e <i>LaTPS23</i> com terpeno sintases das classes a até g de várias espécies de plantas.	51
Figura 18: Alinhamento da porção C-terminal de linalol sintase, bergamoteno sintase e limoneno sintase de <i>Lavandula angustifolia</i> ; linalol sintase de <i>Mentha citrata</i> e <i>LaTPS23</i> , utilizando-se o programa ClustalW 1.81.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS – Abietadieno sintase

CPS – Copalil difosfato sintase

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

FDP – Farnesil difosfato

GDP – Geranil difosfato

GGDP – Geranil geranil difosfato

LIS – Linalol sintase

LMS – Limoneno sintase

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

TPS – Terpeno sintase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DISTRIBUIÇÃO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE <i>Lippia alba</i>	13
1.2 UTILIZAÇÕES DE <i>Lippia alba</i> COMO PLANTA MEDICINAL E NA INDÚSTRIA	14
1.3 OCORRÊNCIA DE DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE <i>Lippia alba</i>.....	17
1.4 BIOSÍNTESE, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIAS DOS COMPOSTOS TERPÊNICOS	18
1.5 BIOQUÍMICA E EVOLUÇÃO DAS TERPENO SINTASES	23
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DE QUIMIOTIPOS.....	32
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	33
3.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO cDNA	33
3.4 CLONAGEM DOS GENES	34

3.5 RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE)	37
3.6 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENO SINTASES POR RT-PCR SEMIQUANTITATIVO EM <i>Lippia alba</i>	38
3.7 ANÁLISES IN SILICO.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 ANÁLISES CG-MS	40
4.2 CLONAGEM DE POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENO SINTASES (TPS).....	41
4.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TPS <i>LaTPS12</i> E <i>LaTPS23</i> EM <i>Lippia alba</i>	42
4.4 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENO SINTASES EM DIFERENTES ESTÁGIOS FOLIARES DE <i>Lippia alba</i> AVALIADA POR RT-PCR SEMIQUANTITATIVO	45
4.5 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS DOIS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENO SINTASES NOS QUIMIOTIPOS CITRAL, GERANIOL E LINALOL DE <i>Lippia alba</i> AVALIADA POR RT-PCR SEMIQUANTITATIVO.....	46
4.6 CLONAGEM DA EXTREMIDADE 3' DO GENE <i>LaTPS23</i>	48
4.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DE <i>LaTPS12</i> E <i>LaTPS23</i>	49
5 DISCUSSÃO	53

5.1	ESTRUTURA GENÔMICA DOS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TPS <i>LaTPS12</i> E <i>LaTPS23</i> de <i>Lippia alba</i>.....	53
5.2	EXPRESSÃO DOS GENES <i>LaTPS12</i> E <i>LaTPS23</i> EM DIFERENTES ESTÁGIOS FOLIARES.....	55
5.3	EXPRESSÃO DOS GENES <i>LaTPS12</i> E <i>LaTPS23</i> NOS QUIMIOTIPOS CITRAL, GERANIOL E LINALOL DE <i>Lippia alba</i>.....	56
5.4	SIMILARIDADE DE <i>LaTPS23</i> COM GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS TIPO LIMONENO SINTASES E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES	58
5.5	FILOGENIA DE <i>LaTPS12</i> E <i>LaTPS23</i>	58
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....	62

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae, pertencente ao clado Asteridaee, ordem Lamiales (JUDD et al., 2002), compreendendo cerca de 175 gêneros e 2800 espécies, onde muitos desses gêneros apresentam plantas com propriedades medicinais e ornamentais (BARROSO, 1991). De acordo com Salimena (2000), espécies do gênero *Lippia* estão distribuídas principalmente nos neotrópicos e subtrópicos, tendo o Brasil, México e Argentina como três grandes centros de diversidade.

O Brasil é uma das regiões de maior biodiversidade do mundo e uma das principais zonas de crescimento e diversificação de plantas do gênero *Lippia*, contendo aproximadamente 75% das espécies desse gênero. Especificamente no Estado de Minas Gerais encontra-se um grande número dessas espécies (SALIMENAS, 1991; VICCINI et al., 2004; VICCINI et al., 2005). Estas plantas apresentam padrões evolutivos bastante peculiares tanto do ponto de vista cromossômico quanto em análises genético moleculares. Algumas dessas espécies fazem parte de um grupo de plantas medicinais e aromáticas com prioridade para conservação de germoplasma, pois estas se encontram ameaçadas de extinção (VIEIRA, 1999).

Espécies do gênero *Lippia* vêm sendo coletadas em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, para compor um banco de germoplasma de *Lippia spp* da Universidade Federal de Juiz de Fora. Devido aos potenciais de utilização destas plantas na área farmacêutica e a eminente ameaça de extinção de algumas espécies devido ao endemismo e utilização na medicina popular, outros aspectos da biologia destas plantas vêm sendo estudados, principalmente relacionados à genética e ao cultivo *in vitro* (VICCINI et al., 2004; VICCINI et al., 2005; PEIXOTO et al., 2006).

1.1 DISTRIBUIÇÃO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE *Lippia alba*

A espécie *Lippia alba*, originária da América do Sul, é também conhecida por diversos nomes populares, dentre os quais estão erva cidreira do campo, erva

cidreira de arbusto, alecrim do campo, alecrim selvagem, falsa melissa, erva cidreira brasileira, cidró, cidrão, entre outros (MARTINS et al., 1995). Em alguns países latino-americanos, é também conhecida como cidrila, salvia, salvia morada e orégano (MATOS, 1998). A espécie também ocorre no Brasil e é uma das mais estudadas do gênero *Lippia*. Ela floresce durante o ano todo e recebe grande destaque no gênero, devido às suas inúmeras propriedades medicinais (SALIMENA, 2000).

Lippia alba é uma planta com hábito arbustivo perene, muito ramificado, cujas brotações nascem eretas e tendem a ficar arqueadas com o crescimento, chegando a encostar no solo, onde normalmente enraízam, chegando a atingir 1,5 a 2m de altura. Apresenta ramos finos, arqueados e quebradiços, com folhas opostas, elípticas que variam na largura, tendo bordas serradas e ápice agudo. Possuem inflorescências capituliformes de eixo curto portando diferentes tamanhos (MATOS, 1998) (Figura 1).



Figura 1: Foto dos quimiotipos de *Lippia alba* localizados na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora (A). Visualização aproximada de um dos quimiotipos de *Lippia alba* (B).

1.2 UTILIZAÇÕES DE *Lippia alba* COMO PLANTA MEDICINAL E NA INDÚSTRIA

Dos diversos estudos já realizados envolvendo *Lippia alba*, muitos abordam aspectos fitoquímicos e de fitomedicina. O óleo essencial dessa planta apresenta, entre outras inúmeras substâncias, uma grande concentração de compostos terpênicos, assim como na grande maioria de óleos voláteis que ocorrem

em outras espécies de plantas. Dentre estes compostos, encontram-se principalmente monoterpenos e sesquiterpenos (SIMÕES et al., 1999). Terpenóides são substâncias biossinteticamente derivadas do isopreno, que por sua vez tem sua origem derivada do ácido mevalônico. No óleo essencial de *Lippia alba*, são encontrados monoterpenos importantes como, por exemplo, o linalol, o mirceno e o geraniol, que pertencem ao subgrupo dos monoterpenos acíclicos, além do limoneno e da carvona. As propriedades fitoterapêuticas de *L. alba*, devem-se à presença de sesquiterpenos e monoterpenos, monocíclicos e acíclicos presentes no seu óleo essencial, característicos do gênero *Lippia* (VALE, 1999).

Dentre as inúmeras propriedades medicinais de *L. alba* podem-se destacar as atividades antiespasmódicas; ação no tratamento de dores estomacais, de sintomas da gripe, bronquite, infecções cutâneas, diarreia, desordens menstruais, além de propriedades antitérmicas e antiinflamatórias (PASCUAL et al., 2001). Foram relatados ainda efeitos sedativos dependentes da dose, incluindo hipnose, hipotermia e propriedades anticonvulsivas (ELIZABETISK, BRUM E SOUZA, 1999; GHELARDINI et al., 1999; VALE et al., 1999).

No gênero *Lippia*, tem-se associado à secreção de óleos essenciais a presença de tricomas na epiderme das folhas (BOLZANI et al., 1999). Sendo assim, as folhas de *L. alba* são utilizadas de diferentes maneiras na medicina popular, como, por exemplo, na forma de infusão pela ação calmante, antiespasmódica, digestiva, estomática e até moluscocida (PACIONIRK, 1990). Também é freqüentemente utilizada em substituição à *Melissa officinalis* em forma de chá, macerados, compressas, banhos e extratos alcoólicos. As compressas podem ser usadas para combater as hemorróidas. A folha macerada pode ser usada contra dor de dente e os banhos são utilizados para amenizar a febre. Para o combate a resfriados, utiliza-se a infusão alcoólica friccionalada (CORRÊA, 1992). Ainda não foi verificado nenhum efeito tóxico em animais tratados com extratos da planta.

Em países como Brasil, Guatemala e Venezuela a infusão de *L. alba* tem sido usada para remediar gripe, resfriado, tosse, bronquite e asma. Suas folhas podem ser utilizadas também como tempero para alguns alimentos. No México tal planta é também usada para abrandar dores na vesícula (ZAMORA-MARTINEZ e DE PASCUAL POLA, 1992). *L. alba* pode ser aplicada externamente em casos de queimaduras e doenças cutâneas, como é observado em alguns lugares do Brasil e

na Guatemala. Verificou-se também que extratos etanólicos de *L. alba* podem ter efeito antihipertensivo e vasodilatador (GUERRERO et al., 2001).

De acordo com Abad et al. (1995), substâncias produzidas por essa planta podem apresentar atividade antiviral, como por exemplo, no tratamento da sífilis. A infusão de *L. alba* é bastante empregada no combate a disfunções respiratórias, como bronquite e asma, já acima citados, além de infecções respiratórias bacterianas.

Algumas características de *L. alba* podem torná-la uma excelente fonte industrial de linalol e outros monoterpenos. Além de ser facilmente cultivada por propagação vegetativa (BIASI e COSTA, 2003), foi também demonstrado que por destilação do óleo essencial dessa planta obtém-se a forma dextrógera do linalol, que é a mais utilizada industrialmente, com quase 100% de pureza (SIANI et al., 2002). Os diferentes aromas apresentados por essa planta estão relacionados com os constituintes majoritários dos óleos essenciais, que podem variar qualitativamente e quantitativamente em função de fatores como idade da planta, época de floração, estações do ano, clima, fatores geográficos, disponibilidade de água, entre outros (CORRÊA, 1992; MATOS, 1998). Futuramente, o conteúdo do óleo essencial dessa planta poderá ser melhorado por uma padronização do seu cultivo, bem como por manipulação genética ou, preferencialmente, por associação de ambos.

A síntese de diversos fármacos, a utilização na indústria de cosméticos e de perfumaria, além do uso no tratamento de muitas disfunções orgânicas, justificam a grande utilização de plantas medicinais e aromáticas e a grande demanda por seus produtos, sendo *L. alba* umas das mais utilizadas. Como apresentam uma grande diversidade em seus constituintes, os fitoterápicos possuem um abrangente espectro de ação, e, seus efeitos colaterais são mais brandos ou até inexistentes quando comparados aos medicamentos sintéticos (PINTO e BERTOLUCCI, 2002).

Os estudos supracitados mostram o potencial medicinal e industrial de *L. alba*. Conseqüentemente, essa é uma planta que apresenta um grande potencial econômico, além de sua tradicional utilização na medicina popular. Ainda assim, não há estudos de diferentes aspectos da biologia molecular dessa planta, nem tampouco sobre melhoramento genético a fim de melhorar a qualidade de seu óleo essencial (SIANI et al., 2002). É importante ressaltar que a utilização de plantas medicinais, tanto devido a seus efeitos terapêuticos quanto a pesquisa e produção de novos fármacos, vem ganhando cada vez mais destaque.

Além do mais, estudos genéticos adicionais são fundamentais para um melhor entendimento da natureza dos quimiotipos, visando futura manipulação dos mesmos. Em vinca, Dutta et al. (2005) através de análise da expressão de três genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de vincristina e vinblastina, dois importantes alcalóides do metabolismo secundário, mostraram que o acúmulo destes compostos está relacionado ao nível de expressão dos genes estudados.

Apesar da potencial importância de *L. alba* e outras plantas do mesmo gênero para a indústria farmacêutica, genes relacionados ao metabolismo de terpenóides e outros compostos não foram ainda clonados e caracterizados nesta espécie, tampouco em outras plantas da família Verbenaceae. Portanto, a clonagem e a caracterização de genes que codificam enzimas terpeno sintases em *L. alba* é uma importante linha de pesquisa e o principal alvo desse trabalho.

1.3 OCORRÊNCIA DE DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba*

Diferentes quimiotipos de *L. alba* podem ser encontrados na natureza, devido principalmente à variedade genética dessa espécie (MATOS, 1996). Quimiotipos são também chamados de raças químicas e ocorrem freqüentemente em plantas ricas em óleos voláteis (PASCUAL et al., 2001; TAVARES et al., 2005). Em alguns casos, trata-se de vegetais morfologicamente idênticos, mas que diferem na constituição química do óleo essencial. As designações de cada quimiotipo são dadas de acordo com os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de cada um. Em alguns casos, a variação dos quimiotipos também pode ser atribuída a fatores ambientais, como por exemplo, a influência do clima, do solo, do teor de salinidade, disponibilidade de água, entre outros (MATOS, 1996).

Muitos quimiotipos de *L. alba* podem ser enumerados. Matos (1996) descreveu quimicamente três quimiotipos de *L. alba*, que distinguem-se de acordo com variações quantitativas e qualitativas dos teores de limoneno, carvona, mirceno e citral. Tais substâncias estão associadas a características organolépticas da planta. O quimiotipo 1 apresenta uma predominância de citral (55,1%), β -mirceno (10,5%), e limoneno (1,5%). O quimiotipo 2 apresenta cerca de 63% de citral e

23,2% de limoneno. Já o quimiotipo 3 apresenta carvona (54,7%) e limoneno (12,1%).

Tavares et al. (2005) também caracterizaram outros três quimiotipos: carvona, linalol e citral. O citral é encontrado como uma mistura racêmica de geranial e neral, dispostos na proporção de 3:2 (geranial, neral). Adicionalmente, nos diferentes quimiotipos de *L. alba* vários outros terpenóides foram identificados, variando entre 29 e 42 tipos destes compostos. Alguns destes são encontrados apenas em determinados quimiotipos e constituem um total aproximado de 90% da composição do óleo destas plantas (TAVARES et al, 2005).

Nos Estados Brasileiros encontram-se espalhados uma gama de quimiotipos, como por exemplo, no Paraná (γ -terpineno), em São Paulo (citral), no Ceará e no Maranhão (β -cariofileno) (CASTRO, MING E MARQUES, 2002). No Rio Grande do Sul e em outros estados (linalol) (ATTI-SERAFINI e PANSERA, 2002), vários quimiotipos em Minas Gerais e Goiás, entre outros. Diversos outros estudos já foram realizados abordando as diferenças nos componentes do óleo essencial em quimiotipos de *L. alba*.

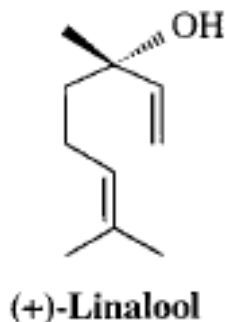
1.4 BIOSSÍNTESE, CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIAS DOS COMPOSTOS TERPÊNICOS

Os terpenos são substâncias derivadas da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade isopreno. Essas substâncias são constituintes do metabolismo secundário, sendo freqüentemente encontrados nos óleos essenciais de inúmeras plantas. A classificação dos terpenos é feita de acordo com a “regra do isopreno”, baseada na quantidade de unidades isopreno contidas na molécula. Cada molécula de isopreno é constituída por 5 carbonos. Assim sendo, um hemiterpeno apresenta 5 carbonos em sua molécula, os monoterpenos, 10 carbonos; sesquiterpenos, 15 carbonos; diterpenos, 20 carbonos; sesterpenos, 25 carbonos; triterpenos, 30 carbonos; tetraterpenos, 40 carbonos e politerpenos, acima de 40 carbonos (SIMÕES et al., 1999).

Os terpenos apresentam funções variadas nos vegetais. Os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando, por exemplo, na

atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenos dão origem a determinados hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenos e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (VICKERY e VICKERY, 1981; HARBONE e BAXTER, 1995).

Os compostos terpênicos mais freqüentemente encontrados nos óleos voláteis são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos. Os monoterpenos são divididos em três subgrupos: acíclicos, como por exemplo, o linalol, geraniol e o mirceno; monocíclicos, tais como o terpinoleno e bicíclicos, como a cânfora, alfa-pineno e a fenchona (Figura 2). Dentro desses subgrupos, existem ainda outras classificações, que variam de acordo com a função orgânica apresentada pelo terpenóide tais como: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (linalol), lactonas (nepatalactona), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona), entre outros. Os sesquiterpenos também apresentam classificações semelhantes aos monoterpenos. Os componentes terpênicos descritos em óleos voláteis chegam a centenas para os monoterpenos e ultrapassam mil para os sesquiterpenos (SIMÕES et al., 1999).



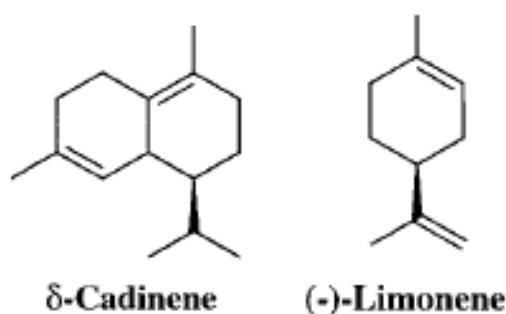


Figura 2: Representação de compostos terpênicos acíclicos (linalol), monocíclicos (limoneno) e bicíclicos (δ -cadieno).

A cada ano, diversos estudos envolvendo terpenóides são realizados. Esses por sua vez, buscam elucidar propriedades terapêuticas, bem como a aplicação dessas substâncias na indústria, principalmente na de cosméticos. Inúmeras aplicações são atribuídas a diversos compostos terpênicos. O limoneno é utilizado de maneira industrial como solvente para produtos à base de resina e óleos, aromatizante em produtos de limpeza, cosméticos e alimentícios. A carvona também é muito usada em produtos cosméticos. Entretanto existem estudos que ressaltam atividades fungicidas e bactericidas dessa substância (BADIES, 1992). Apresenta também ação nematicida, bacteriostática, bactericida e fungicida. (TAVARES et al., 2005).

O citral possui atividade fungicida e nematicida (TAVARES et al., 2005); ansiolítico e hipotérmico em cobaias (VALE et al, 1999); calmante e espasmolítica, analgésico e antiedematoso (MATOS, 1998). A ação analgésica de *L. alba* pode também ser atribuída devido à atividade do mircenol (MATOS, 1998). O linalol pode ser utilizado na indústria de perfumaria, além de apresentar efeitos sedativos atuando sobre o sistema nervoso central, propriedades hipotérmicas e anticonvulsivantes, pode ainda exercer atividades antiinflamatória, analgésica, bactericida, antifúngica e inseticida (TAVARES et al., 2005). Pode apresentar também atividade contra linhagens de células de leucemia e linfoma humano (Chiang et al., 2003).

Dentre os diversos estudos já citados sobre os efeitos dos terpenóides no combate de doenças, os estudos contra o câncer vêm ganhando amplo destaque. Os terpenos podem ser biossintetizados naturalmente por diversos organismos, entre eles plantas, animais, fungos e bactérias. Recentemente foi constatado que um triterpeno denominado jaspólideo B, sintetizado pela esponja *Jasper* sp, induz

atividade apoptótica em células de hepatoma humano Bel-7402 e Hep-G2. Essa substância pode desencadear diferentes processos que irão induzir a apoptose, como, por exemplo, afetando a permeabilidade seletiva da célula ou por desmontagem do citoesqueleto (WEI et al., 2008).

Além da pesquisa de terpenos utilizados como quimioterápicos, existem pesquisas com terpenos de atividade antimicrobiana em bactérias resistentes a antibióticos, que é um grande e atual problema na saúde mundial. Este é o caso, por exemplo, de dois diterpenos isolados de *Cladonia rangifera*, uma espécie de líquen muito encontrado no Japão. A atividade desses diterpenos foi aprovada contra dois tipos de bactérias que demonstram resistência a vários antibióticos, *Staphylococcus aureus* e *Enterococci* sp (YOSHIKAWA et al., 2008).

Os terpenóides apresentam as mais variadas utilizações, dentre as quais, são responsáveis por muitas das propriedades organolépticas dos alimentos. Em algumas variedades de vinho, o linalol é um dos principais constituintes do *bouquet* (PECTKA et al., 2006). Em morangos, altos teores de linalol e nerolidol nos frutos cultivados devem-se à presença e à expressão do gene *FaNES1* (*Fragaria* spp nerolidol sintase), o que torna o fruto mais atrativo e provavelmente direciona a seleção pelo homem na domesticação das plantas produtoras de morangos (AHARONI et al., 2004).

Um dos monoterpenos mais utilizados pela indústria e bastante encontrado no óleo essencial de *L. alba* é o linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol). Ocorre mais frequentemente na natureza em duas formas isoméricas, o 3R-(-)-linalol e o 3S-(+)-linalol, cada um apresentando odores específicos (Figura 3). O isômero levógeno, conhecido como licareol, tem um aroma “doce” semelhante à lavanda; enquanto o isômero dextrógeno, conhecido como coriandrol, tem um aroma cítrico (KOPPENHOEFER et al, 1994).

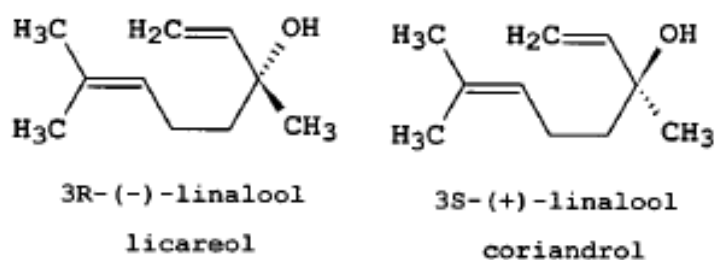


Figura 3: Formas isoméricas do linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol). Retirado de Siani et al, 2002.

Uma importante fonte de linalol é a planta conhecida como pau-rosa (*Aniba sp.*). Entretanto essa é uma espécie ameaçada de extinção e, além disso, apresenta altos teores de cânfora na constituição do seu óleo essencial. Uma alternativa ao pau-rosa que tem sido utilizada é uma Lauracea chinesa denominada Ho (*Ciannamomum camphora*). O óleo dessa planta também apresenta altos índices de cânfora. Somado a isso temos a constituição isomérica de linalol presente nos óleos essenciais dessas duas plantas. O óleo de pau-rosa apresenta especificamente a forma levógera e o óleo de Ho apresenta uma mistura racêmica. A indústria perfumista, por exemplo, busca preferencialmente a forma dextrógera do linalol e que seja obtido de um óleo essencial com o menor teor de cânfora possível, visto que essa substância interfere na fragrância das essências produzidas (OHASHI et al., 1997).

Siani et al. (2002) fez diferentes análises cromatográficas de diferentes acessos de *L. alba* do quimiotipo linalol oriundos de várias partes do Brasil. Em tais análises constatou-se, além do alto teor de linalol presente nas folhas de todos esses acessos, a determinação de quais isômeros estavam presentes através de cromatografia quiral. Os resultados mostraram que em todos os acessos pesquisados apenas o 3S-(+)-linalol foi encontrado, justificando a propriedade dextrorrotatória dos óleos analisados. Sendo assim, em contraste com Ho e o pau-rosa, esse quimiotipo de *L. alba* produz especificamente linalol dextrógero, independente do local de crescimento da planta.

Estudos em cobaias demonstraram que o linalol com alto grau de pureza não apresenta propriedades sensibilizantes, ao passo que sua forma oxidada pode causar problemas se sensibilização (SKOLD et al., 2002). O linalol tem se mostrado um produto de alta cotação no mercado externo, sendo comercializado por cerca de 160 a 220 dólares o quilo do linalol purificado. A busca por fontes de linalol que atendam a demanda comercial e ao mesmo tempo a preservação da flora nativa levam a investigação do potencial de *L. alba* na produção de linalol, especialmente o quimitipo linalol.

Outro monoterpeneo também bastante encontrado na constituição do óleo essencial de *L. alba*, o geraniol, apresenta propriedades odoríferas que compõe o *blend* de aromas nos chás verde e preto (SCHUH e SCHIEBERLE, 2006). Estudos

utilizando o geraniol têm demonstrado que a ação desse monoterpene pode promover a redução de colesterol em cultura de células animais, além de alterar a divisão celular (POLO e DE BRAVO, 2006). Durante a fase inicial de hepatocarcinogênese em ratos, o geraniol inibiu a proliferação de células, provocando danos ao DNA e induziu apoptose, evidenciando propriedades anticarcinogênicas (ONG et al., 2006). Resultados como estes supracitados reforçam a importância de estudos de genes relacionados à síntese de terpenóides em plantas.

1.5 BIOQUÍMICA E EVOLUÇÃO DAS TERPENO SINTASES

Os terpenos são biossintetizados por organismos representantes de todos os reinos e apresentam as mais variadas funções. Nas plantas, os terpenos não estão envolvidos apenas no metabolismo secundário, eles estão presentes também no metabolismo primário. Um importante exemplo é o caroteno, um terpeno de cadeia longa, derivado do geraniol geraniol difosfato que está envolvido na pigmentação e captura de fótons nas plantas. Outro exemplo, também derivado do geraniol geraniol difosfato é o kaureno, um terpeno precursor dos hormônios tipo giberelina e sintetizado pela enzima kaureno sintase (YAMAGUSHI et al., 1996).

Como já anteriormente citado, os terpenóides são derivados do isopreno, considerado o precursor universal dessa classe de moléculas. Eles apresentam peso molecular variado, devido às diferentes associações que o isopreno pode realizar, uma vez que este pode formar esqueletos carbônicos múltiplos de 5 de acordo com a regra do isopreno. Os terpenóides são substâncias voláteis, a maioria com baixo peso molecular, derivados diretamente do geraniol difosfato (GDP), farnesil difosfato (FDP) ou do geraniol geraniol difosfato (GGDP), que são precursores imediatos de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, respectivamente (Figura 4). Praticamente todos os terpenóides são derivados desses três precursores (CROTEAU, KUTCHAN, LEWIS, 2000). A liberação destes compostos pelas plantas tem funções variadas como atrair predadores durante o ataque de herbívoros, atraírem polinizadores ou mesmo agir diretamente nos ovos e larvas dos herbívoros; embora saiba-se que os primeiros compostos terpênicos produzidos deveriam ter essencialmente função antioxidante (KESSLER e BALDWIN, 2002).

O desenvolvimento de técnicas de clonagem e ferramentas de bioinformática permitiram a identificação de motivos conservados de diferentes enzimas envolvidas na síntese dos terpenóides. Esta classe de enzimas é conhecida como terpeno sintases (TPS), ou quando o produto formado é um composto cíclico essas são também chamadas de terpenos ciclases (AHARONI et al., 2003). Ainda assim existem relativamente poucos trabalhos que caracterizam a expressão de genes responsáveis pela produção de enzimas TPS (MARTIN, FALDT, BOHLMANN, 2004; HOSOI et al., 2004).

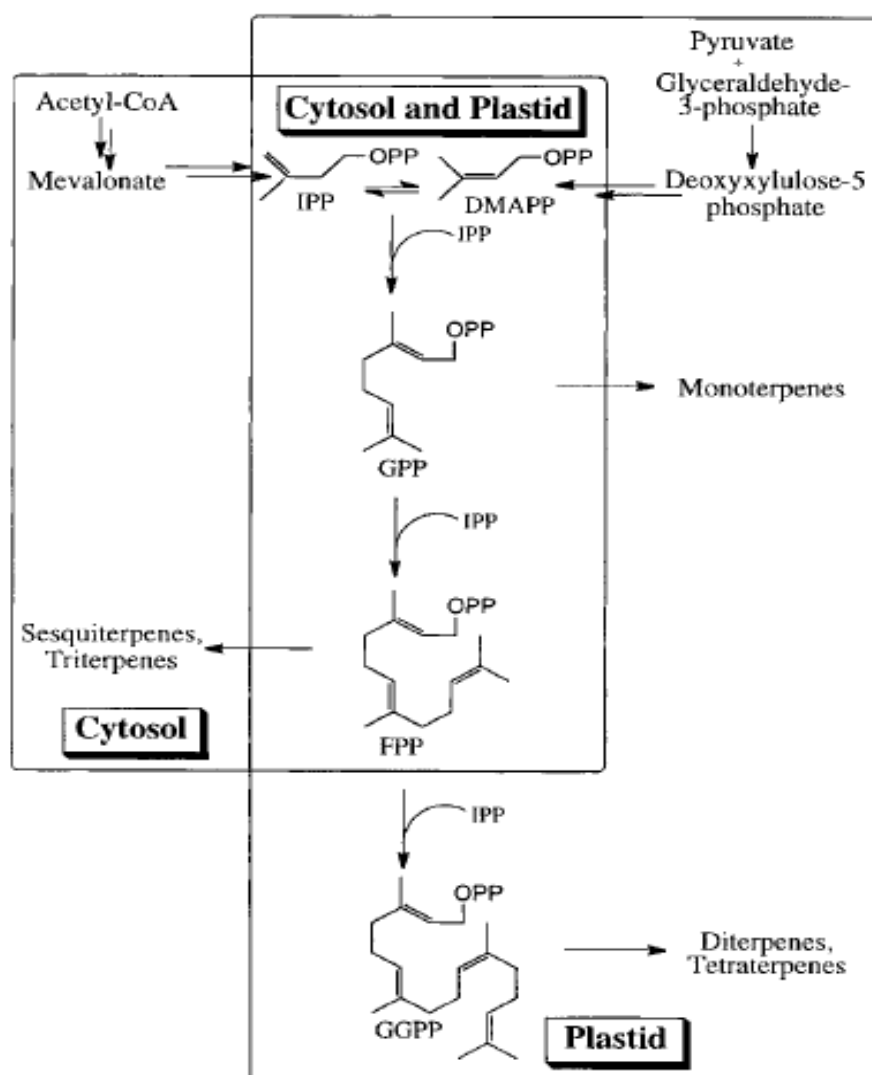


Figura 4: Biossíntese de terpenóides em plantas. As substâncias precursoras dos compostos terpênicos isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) e seus derivados geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e geranyl geranyl difosfato (GGPP) estão representados na figura. Nota-se que a síntese de monoterpênicos, diterpenos e tetraterpenos ocorrem nos plastídeos, ao passo que a síntese de sesquiterpenos e triterpenos ocorre no citoplasma. Retirado de Trapp e Croteau (2001).

As reações das enzimas terpeno sintases com seus respectivos substratos são bastante variadas. O linalol é uma molécula pertencente à classe dos monoterpenos e deriva-se do geranyl difosfato (GDP) por reação da linalol sintase (LIS) que converte GDP diretamente em linalol de maneira específica (Iijima et al., 2004). A reação de enzimas linalol sintases, por exemplo, com seu substrato geranyl difosfato é muito mais simples do que a reação de monoterpenos ciclases com esse mesmo substrato, visto que essas últimas precisam superar a barreira topológica existente entre o carbono 2 e o carbono 3 da molécula de geranyl difosfato para que ocorra sua ciclização. Após a ionização do geranyl difosfato, ocorre uma reação direta com a água, resultando em R ou S linalol, dependendo do lado da molécula onde ocorrerá o ataque nucleofílico (LANDMANN et al, 2007) (Figura 5).

O sítio ativo modelado de duas terpeno ciclases em *Menta citrata* mostrou que existe a presença de uma “alça” de aminoácidos que previne o acesso à água para a formação carbocatiônica do geranyl difosfato nessa fase (Figura 6). Essa “alça” está ausente na linalol sintase de *M. citrata*. Tal estrutura compreende três aminoácidos na região C-terminal presente nas terpeno ciclases, que não estão presentes na linalol sintase de *M. citrata* (CROWELL et al., 2002). Essa mesma deleção é encontrada na linalol sintase de *Lavandula angustifolia* (LANDMANN et al., 2007).

As enzimas terpeno sintases são subdivididas atualmente em sete subfamílias ou classes, TPS-a até TPS-g (DUDAREVA et al., 2003). Essas subdivisões são baseadas na filogenia dessas proteínas, nas suas sequências de aminoácidos ou nas suas funções em diferentes partes do metabolismo ou mesmo em quais organismos elas estão presentes. As poucas enzimas linalol sintases já caracterizadas até o momento se encaixam em diferentes grupos, o que mostra a diversidade entre elas (LANDMANN et al, 2007).

Alguns autores definem que genes codificadores de TPS fazem parte de uma superfamília (AUBORG, LECHARNY e BOHLMANN, 2002). Em *Arabidopsis thaliana*, Auborg, Lecharny e Bohlmann (2002) constataram que genes codificadores de enzimas TPS situavam-se em todos os cromossomos dessa planta. Muitos deles formavam *clusters* e estavam distribuídos em tandem. Os genes codificadores de TPS também recebem classificações. Trapp e Croteau (2001) dividiram os genes codificadores de terpeno sintases em plantas nas classes I, II e III. Tal divisão baseou-se na estrutura genômica desses genes. Os critérios para classificação

foram o tamanho e quantidade de éxons e íntrons; as posições em que esses se encontravam; as fases dos íntrons; na presença ou ausência do domínio CDIS, relativo a uma diterpeno sintase encontrada em gimnosperma e segundo os autores, comum nas sequências gênicas de terpenos sintases mais primitivas. De acordo com os autores, além da perda do domínio CDIS, os íntrons de genes codificadores de TPS mais derivadas também são perdidos com o passar do tempo.

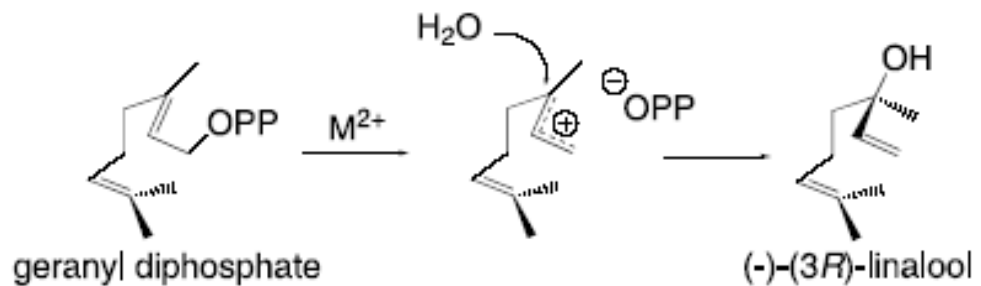


Figura 5: Ataque nucleofílico prematuro da água ao substrato geranyl difosfato impedindo que o produto formado seja cíclico. A estrutura em “alça” presente em proteínas como, por exemplo, em limoneno sintases gera uma barreira física, impedindo que esse ataque ocorra prematuramente, permitindo que o produto formado seja um terpenóide cíclico. Retirado de Crowell et al. (2002).

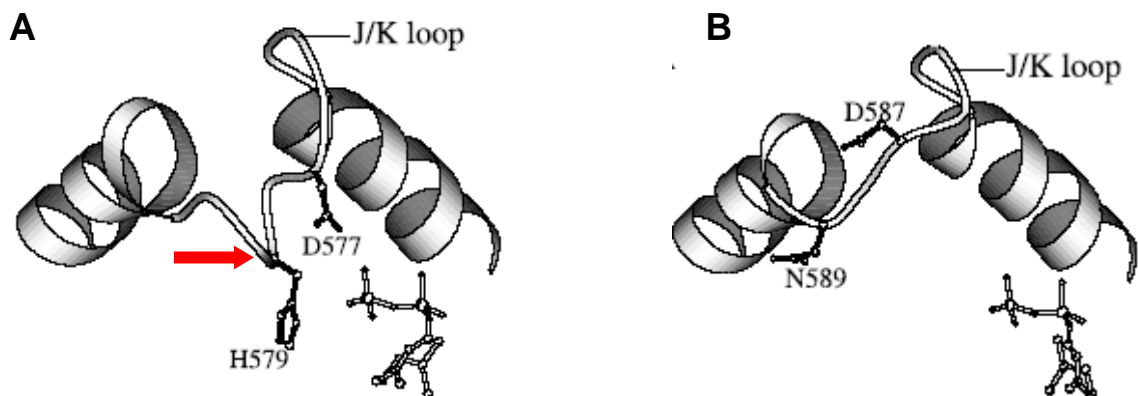


Figura 6: Esquema de uma limoneno sintase (A) e uma linalol sintase (B), destacando a presença e ausência respectivamente de uma estrutura em “alça” devido à presença de três aminoácidos em posições conservadas. Essa estrutura em alça presente nas terpeno ciclastes que é responsável pela barreira física que impede o ataque nucleofílico prematuro da água ao substrato geranyl difosfato. Figura retirada de Crowell et al. (2002).

Trapp e Croteau (2001) propõem que as enzimas terpeno sintases de plantas tiveram um gene ancestral que em um dado momento evoluiu

separadamente nas gimnospermas e em angiospermas, e, que as terpeno sintases do metabolismo secundário provavelmente derivaram das terpeno sintases do metabolismo primário. Eles também reforçam a teoria de que genes codificadores de terpeno sintases de origem recente, como por exemplo, o gene da linalol sintase, provavelmente surgiu a partir de duplicação seguida de posterior recombinação de genes codificadores de outras enzimas TPS. No caso específico de enzimas linalol sintase, essa recombinação seria entre genes codificadores de enzimas tipo limoneno sintases (LMS) e copalil difosfato sintases (CPS). Entretanto, os próprios autores consideram que essas classificações ainda são controversas e que um maior número de sequências gênicas de terpeno sintases ainda precisam ser clonadas e caracterizadas para se chegar a resultados mais conclusivos.

Curiosamente, o nível de identidade de sequências nucleotídicas e de aminoácidos entre o mesmo tipo de terpeno sintase, isto é, enzima com o mesmo substrato e o mesmo produto, pode ser menor do que entre duas terpeno sintases diferentes em espécies distintas. A sequência nucleotídica da 3R(-)-linalol sintase de *Menta citrata* é similar à sequência de várias outras monoterpênicos ciclases da família Lamiacea (62-72% de identidade). Entretanto, ela se difere substancialmente da sequência da 3S-linalol sintase de *Clarkia* sp, apresentando 41% de identidade e da 3R-linalol sintase de *Artemísia*, com cerca de 52% de identidade (CROWELL et al., 2002). Algumas enzimas terpeno sintases também já foram caracterizadas em *Lavandula angustifolia*, entre elas uma R-(+)-linalol sintase. Ela mostrou ter cerca de 60% de identidade entre aminoácidos com a R-(+)-limoneno sintase dessa mesma espécie (LANDMANN et al., 2007).

Existem alguns motivos protéicos bastante conservados entre enzimas terpeno sintases. Um dos principais é o motivo DDXXD, localizado na região C-terminal, responsável pela ligação a um cofator íon metálico e catálise. O motivo (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE também é conservado e aparentemente apresenta as mesmas funções de DDXXD (WHITTINGTON et al., 2002; CHRISTIANSON, 2006). Outro motivo frequentemente encontrado em enzimas terpeno sintases é LQLYEASFLL, e parece fazer parte do sítio ativo de algumas dessas enzimas (MCGEADY e CROTEAU, 1995; WISE et al, 1998).

Uma outra sequência de aminoácidos também é muito conservada em terpeno sintases. É um peptídeo encontrado na região N-terminal de algumas TPS, cuja sequência é RR(X)8W, que parece ser essencial para atividade enzimática.

Adjacente a essa sequência é encontrada uma sequência com cerca de 26 aminoácidos na linalol sintase e de 58 aminoácidos na limoneno sintase, ambas da espécie *Lavandula angustifolia* (LANDMANN et al., 2007). As análises dessas sequências confirmam que essas enzimas, assim como a grande maioria de proteínas localizadas em compartimentos celulares, apresentam um peptídeo sinal em sua porção N-terminal. Essas duas enzimas de lavândula foram classificadas de acordo com sua estrutura genômica na Classe III, definida por Trapp e Croteau (2001), apresentando 6 íntrons e 7 éxons cada em posições conservadas (LANDMANN et al., 2007).

No caso das duas enzimas supracitadas, elas atuam nos plastídeos, mais precisamente nos leucoplastos em regiões de glândulas de óleo, assim como todas as monoterpene sintases, onde é produzido o geranyl difosfato que é o substrato dessas enzimas (TURNER et al., 1999) (Figura 4). Uma vez dentro do plastídeo, o peptídeo sinal é clivado e a enzima assume então sua forma madura, já que em sua forma imatura, isto é, com o peptídeo sinal, enzimas monoterpene sintases exibem propriedades cinéticas diferentes (WILLIAMS et al., 1998). Enzimas terpeno sintases também atuam em outras partes da célula, dependendo de onde está localizado o *pool* de seu substrato. É o caso, por exemplo, da enzima trans-alfa-bergamoteno sintase, que atua no citoplasma, onde seu substrato farnesil difosfato é encontrado (LANDMANN et al., 2007).

Como já citado, a diversidade de sequências tanto nucleotídica quanto de aminoácidos entre terpeno sintases é bem grande. As enzimas 3R-(+)-linalol sintase de *Lavandula angustifolia* e *Menta citrata* apresentaram cerca de 63% de identidade entre aminoácidos. Por outro lado, entre enzimas linalol sintase de outras espécies, tais como a 3R-(+)-linalol sintase de *O. basilicum* e de *A. annua*, assim como a 3S - (-)-linalol sintase de *C. breweri* e *A. thaliana*, essa identidade foi muito mais baixa (LANDMANN et al., 2007). Apesar de toda essa variabilidade, todas elas apresentaram apenas o geranyl difosfato como substrato e o linalol como único produto, indicando que, particularmente no caso das enzimas linalol sintase, ocorre uma especificidade com o seu substrato e com o produto gerado.

Embora algumas regiões se conservem entre algumas das diversas classes de terpeno sintases, os relatos anteriormente mencionados demonstram a dificuldade na classificação dessas enzimas, suas origens e inferências evolutivas.

Sendo assim, a clonagem e caracterização de um gene codificador de uma enzima terpeno sintase ainda desconhecida torna-se uma tarefa bastante trabalhosa.

Os mecanismos de ação e a evolução dessas enzimas são de grande interesse para o entendimento de diversos processos em plantas nos quais os terpenos estão envolvidos. Entretanto, proteínas terpeno sintases não são facilmente classificadas baseadas na comparação da sequência de aminoácidos. É o caso, por exemplo, de enzimas como as abietadieno sintase (ABS) e a própria linalol sintase (LIS). Isso ocorre devido ao fato delas terem altas similaridades na parte N-terminal com enzimas CPS e na parte C-terminal com enzimas tipo limoneno sintases. Devido a tal fato, sugere-se que LIS e ABS são de origem composta (DUDAREVA et al., 1996).

Dessa forma, o gene *lis* parece ser um gene composto, derivado de um evento de recombinação entre dois diferentes tipos de genes codificadores de terpeno sintases. O fato da primeira metade de genes *lis* ser semelhante com genes *cps* e a segunda metade ser semelhante a genes codificadores de limoneno sintases (*lms*), reforça essa teoria (CSEKE, DUDAREVA e PICHERSKY, 1998). A combinação de mecanismos como a duplicação de um gene acompanhada por um processo de recombinação, servem como base para explicar a enorme diversidade de proteínas terpeno sintases encontrada nos vários organismos de todos os reinos, principalmente nas plantas. Crowell et al. (2002), por exemplo, verificou que a enzima 3R- (-)-linalol sintase de *Menta citrata*, apresenta similaridade muito maior com terpeno ciclases do que com outras linalol sintases.

Alguns trabalhos já revelaram que enzimas monoterpênicos sintases apresentam amplo espectro de produtos e especificidade ao substrato, ou seja, podem originar diferentes produtos do mesmo substrato. Isso é um dos motivos que podem ajudar a explicar a grande abundância de monoterpênicos nos óleos essenciais de diversas plantas (WISE et al., 1998; IJIMA et al., 2004). Curiosamente a enzima linalol sintase não apresenta essa variabilidade de produtos, sintetizando exclusivamente o linalol, como já mencionado.

Baseado nos dados apresentados relativos à enzimas tipo linalol sintase e em similaridades de sequências nucleotídicas apresentadas por essas com outras enzimas tipo terpeno ciclases, as enzimas tipo linalol sintase tem sido consideradas como formas variantes de terpeno ciclases, pois são capazes apenas de catalisar a primeira ionização do seu substrato (CSEKE, DUDAREVA e PICHERSKY, 1998;

CROWELL et al., 2002; LANDMANN et al., 2007). Dessa maneira, pode-se acreditar que enzimas linalol sintases classificadas nos diferentes grupos de *TPS* podem ter evoluído independentemente, representando formas “recombinantes” de outras enzimas, provavelmente de terpeno ciclases (LANDMANN et al., 2007).

O controle de expressão de genes codificadores de enzimas terpeno sintases ainda não é muito conhecido. Relativamente poucos trabalhos foram realizados sobre esse assunto. Por exemplo, a regulação da expressão de genes codificadores de enzimas relativas à síntese do caroteno ocorre provavelmente no nível traducional, visto que a quantidade de mRNA transcrito desses genes não diminui sob determinadas condições genéticas e ambientais (ALMEIDA e CERDÁ-OLMEDO, 2008). Entretanto, não se conhece precisamente em qual etapa ocorre à regulação de outros genes *TPS*. Muito ainda tem a ser descoberto sobre a regulação de genes codificadores de enzimas *TPS*.

Devido à complexidade e diversidade de compostos terpênicos e suas enzimas sintetizadoras, bem como suas aplicações medicinais e industriais, a clonagem de genes codificadores de terpeno sintases se torna uma importante linha de pesquisa. Sabe-se ainda do grande potencial medicinal de *L. alba* e da riqueza de compostos terpênicos no óleo essencial dos seus diversos quimiotipos, o que torna ainda mais relevante a clonagem e caracterização de genes codificadores de *TPS* nessa planta. Além disso, a caracterização de novos genes *TPS* é fundamental para um melhor entendimento e elucidação de estudos filogenéticos relacionados a esse grupo de genes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Clonar e analisar a expressão de genes codificadores de enzimas terpeno sintases em *Lippia alba*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar o gene codificador da enzima linalol sintase (LIS) em *Lippia alba*.
- Verificar se a expressão de potenciais genes codificadores de terpeno sintases clonados ocorre diferencialmente em estágios foliares distintos.
- Avaliar a expressão de potenciais genes codificadores de terpeno sintases clonados, ao nível de mRNA, em três diferentes quimiotipos de *Lippia alba*, citral, geraniol e linalol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DE QUIMIOTIPOS

Folhas de três diferentes quimiotipos de *Lippia alba*, identificados como citral, geraniol e linalol, foram coletados na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os três quimiotipos apresentam número de exsicata depositada no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, são eles quimitipo citral (CESJ 29423), linalol (CESJ 29422) e geraniol (CESJ 29421). A caracterização desses quimiotipos foi confirmada por análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), realizadas no Centro de Pesquisa René Rachou da FIOCRUZ, em Belo Horizonte – MG.

Foram coletadas aleatoriamente três amostras de folhas de indivíduos diferentes nos três quimiotipos, em agosto de 2008, período de seca na região de Juiz de Fora – MG. Os materiais vegetais (folhas frescas e folhas secas) foram imersos em 20 ml de etanol em tubos de 50 ml, os quais foram mantidos fechados e sob refrigeração até a realização da análise química. Alíquotas de 1 ml dos extratos etanólicos obtidos foram transferidas para microtubos previamente lavados com etanol e hexano, nos quais também foi adicionado o mesmo volume de água destilada e hexano. As misturas bifásicas foram agitadas em vortex e a fase superior, que é a fração hexânica, foi separada em microtubo para a subsequente análise. A partição com hexano do extrato etanólico extrai os componentes apolares, constituintes do óleo essencial.

As frações hexânicas obtidas foram analisadas por meio de um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa Shimadzu QP5050A sob as seguintes condições: injetor a 200°C; hélio como gás carreador (6,3 ml, min), coluna capilar Supleco DB 5 (30m X 250 µm) com temperatura programada a partir de 50°C, mantida por 2 min, seguida de elevação até 250°C, com taxa de aquecimento a 4°C/min até 35 min e a 15°C/min até o tempo final; razão de *split* 1:20; faixa de tempo 7 a 39,7 min e faixa dos fragmentos detectados de 40 a 300m/Z. O volume injetado de amostra foi de 1µl e para cada quimiotipo foram analisadas três amostras. A identificação das substâncias foi realizada pela interpretação dos espectros de massa por comparação com espectros de massa do banco de dados Shimadzu e com dados da literatura (ADAMS, 1995).

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Folhas jovens expandidas do quimiotipo linalol foram coletadas, envolvidas em papel alumínio, identificadas e colocadas imediatamente em garrafas térmicas contendo nitrogênio líquido. Em seguida, transportou-se o material até o Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora. As folhas foram então maceradas utilizando-se almofarizes e morteiros de porcelana até se tornarem um pó bastante fino. Logo após extraiu-se o DNA genômico de acordo com o método CTAB (ROMÃO, 1998). As amostras foram então ressuspendidas em TE (Tris-HCL 10mM, EDTA 1mM) e após serem quantificadas em espectrômetro UV (Thermo Biomate3), foram estocadas em freezer a temperatura de -20°C.

3.3 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DO cDNA

Para isolamento de genes codificadores de terpeno sintases em *Lippia alba*, folhas jovens situadas no segundo segmento nodal, folhas do quarto segmento nodal e folhas do oitavo segmento nodal (Figura 7) do quimiotipo linalol e apenas folhas situadas no quarto segmento nodal dos quimiotipos geraniol e citral foram coletados no dia 20 de agosto de 2008 (período de seca na região de Juiz de Fora –

MG), na Estação Experimental de Plantas da Universidade Federal de Juiz de Fora. As folhas foram então maceradas em nitrogênio líquido utilizando-se morteiros e almofarizes de porcelana estéril RNase free.

O RNA total foi extraído utilizando-se o kit *RNeasy* (Qiagen, Hilden, Alemanha) a partir de 100 mg de tecido macerado, de acordo com instruções do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado em espectrômetro UV (Thermo Biomate3). A partir de dois microgramas de RNA total foi sintetizada a primeira fita do cDNA. A transcrição reversa do RNA total foi realizada usando-se *primers* de ancoramento oligo(dT) e a enzima MuMLV (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com o protocolo dos fabricantes.



Figura 7: Estágios foliares de *Lippia alba* quimiotio linalol utilizados para a extração de RNA: 1 – folhas situadas no oitavo segmento nodal; 2 e 3 – folhas situadas no quarto segmento nodal; 4 – folhas situadas no segundo segmento nodal

3.4 CLONAGEM DOS GENES

Inicialmente, seqüências de genes codificadores de linalol e limoneno sintases depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foram alinhadas utilizando-se o programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007). As seqüências utilizadas encontram-se na tabela 1. *Primers* degenerados foram então desenhados de acordo com regiões conservadas nas referidas seqüências. Foram desenhados

os *primers forwards* TPSF1, TPSF2, TPSF3, e os *reverses* TPSR1, TPSR2, TPSR3 e TPSR4 (Tabela 2). As regiões conservadas utilizadas para o desenho dos primers encontram-se na figura 8.

A amplificação do DNA foi feita em termociclador (Eppendorf *MasterCycle Gradient*), utilizando GoTaq DNA polimerase (2,5U) (Promega, Madison, U.S.A); tampão PCR 5X contendo MgCl₂ (5mM); dNTP mix (0,4mM); *primer forward* (4µM); *primer reverse* (4µM); DNA (200ng) de folha do quarto segmento nodal do quimiotipo linalol; totalizando uma reação de 25µl. As condições de amplificação foram: 3 min a 94° C; 34X (94° C por 1 min; 54° C durante 1 min; 72° C por 1 min) mais um passo de extensão final de 10 min a 72° C.

Após a amplificação, os produtos da reação de PCR foram separados em gel de agarose a 1% e corados com Sybr Green. A eletroforese foi realizada a 80 V por 45 minutos. As imagens dos géis foram capturadas em transiluminador UVP *GelDoc-It Imaging System* e analisadas utilizando-se o programa Vision Works LS.

Os fragmentos de DNA obtidos do quimiotipo linalol foram eluídos do gel com *Pure Link Quick Gel Extraction kit* (Invitrogen, Carlsbad, USA). Em seguida, foram ligados ao pGEM-T Easy *Vector System* (Promega, Madison, USA). Células competentes de *E. coli One Shot Top-10* (Invitrogen, Carlsbad, USA) foram transformadas com a ligação acima por choque térmico (SAMBROOK e RUSSEL, 2006). Placas de Petri contendo 30 ml de meio LB sólido, ampicilina (50mg/L) e X-gal (20mg/mL) foram preparadas para o plaqueamento das células e posterior seleção dos clones que apresentavam o inserto.

As placas foram então incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias isoladas foram coletadas e multiplicadas em meio LB líquido contendo ampicilina (50 mg/L), sob agitação de 300 RPM, *overnight* à 37°C. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmidial dessas bactérias, de acordo com Aragão e Rech (1998). As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e em seguida, utilizando-se o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSUL et al., 1990) comparadas com sequências de genes relacionados à síntese de monoterpenos depositadas no NCBI.

Após a clonagem dos fragmentos dos genes a partir do DNA genômico, *primers* específicos foram desenhados para a clonagem dos genes a partir de cDNA e para os posteriores estudos de expressão gênica. Os pares de *primers*

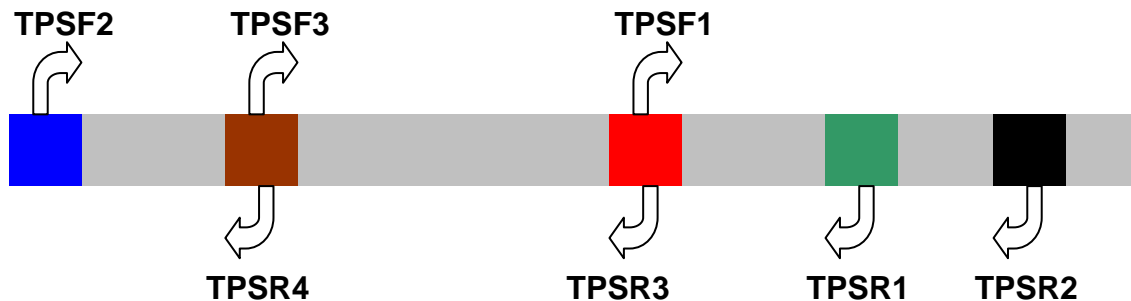
sintetizados foram denominados TPS12F (GAA TTA CGA CTC TTC CGC GA), TPS12R (GCG GAA CCT CTA ACT ACA TCA T), TPS23F (GAA TTA CAA CTC TTC TGT GAT TGT T) e TPS23R (CAT CTA ACT ACA TCG TGA TCT TTG T); já que as melhores sequências correspondiam aos clones 12 e 23, assim denominados aqueles que apresentaram similaridade a genes codificadores de TPS. O procedimento de clonagem dos genes a partir do cDNA do quimiotipo linalol foi realizado utilizando-se da mesma metodologia acima descrita.

Tabela 1: Genes codificadores de monoterpene sintases (*lis* e *lms*) de diferentes espécies que foram alinhados no programa Mega 4 e utilizados para a construção dos *primers* degenerados.

Espécie	Gene	N no NCBI
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>lis</i>	DQ263741
<i>Mentha spicata</i>	<i>lis</i>	L13459
<i>Mentha citrata</i>	<i>lis</i>	AY083653
<i>Lavandula latifolia</i>	<i>lis</i>	DQ421801
<i>Perilla frutescens</i>	<i>lis</i>	AF444798
<i>Perilla citriodora</i>	<i>lis</i>	AY917193
<i>Artemisia annua</i>	<i>lis</i>	AF154124
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>lms</i>	DQ263740
<i>Mentha x piperita</i>	<i>lms</i>	EU108697
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>lms</i>	DQ421800
<i>Mentha longifolia</i>	<i>lms</i>	AF175323
<i>Agastache rugosa</i>	<i>lms</i>	AY055214
<i>Perilla citriodora</i>	<i>lms</i>	AF241790
<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	<i>lms</i>	AF282875
<i>Perilla frutescens</i>	<i>lms</i>	AF317695
<i>Mentha haplocalyx</i>	<i>lms</i>	EF426463
<i>Citrus jambhiri</i>	<i>lms</i>	AB266584
<i>Cannabis sativa</i>	<i>lms</i>	DQ839404
<i>Citrus limon</i>	<i>lms</i>	AF514289

Tabela 2: Sequências dos *primers* degenerados utilizados para a clonagem dos genes *lis* em *Lippia alba*.

PRIMER	SEQUÊNCIA
TPSF1	GAT GAY RTT TAY GAT RTH TAY GG
TPSF2	RMG HTC YGS MAA CTA YVR N
TPSF3	GAN TRY TGM RVY TBT AYG
TPSR1	TRR TAY TCY TCS ADD BTM GG
TPSR2	TYC CHA RRT CAT TDK SMA GN
TPSR3	CCR TAD AYA TCR TAA AYR TCA TC
TPSR4	TCR TAV ARB YKC ARY ANT C



Legenda: Azul - RRX₈W
 Marrom - LQLYEASFLL
 Vermelho - DDXXD
 Verde - PSLEEYF
 Preto - (N, D)D(L, I, V)X(S, T)XXXE

Figura 8: Esquema de um gene *tps* mostrando suas regiões conservadas e em quais delas cada *primer* degenerado foi desenhado. As setas indicam o sentido de cada *primer*.

3.5 RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE)

A amplificação das extremidades 5' e 3' foram realizadas com o *GeneRacer Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Dois microgramas de RNA total foram tratados com uma unidade de *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) para retirar o fosfato da extremidade 5'. Em seguida, procedeu-se a eliminação do 5' *cap* e foram adicionados adaptadores nas duas extremidades contendo seqüências para *primers* específicos nestas regiões por ligação com a enzima T4-RNA-Ligase. Posteriormente foi gerado o cDNA e a partir deste foram amplificadas ambas as

regiões utilizando-se a enzima *SuperscriptII* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nas condições descritas para a enzima com 1 minuto de elongação. Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T *Easy Vector System* (Promega, Madison, USA), do mesmo modo descrito no item 3.4. A amostra foi então sequenciada em seqüenciador automático *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e em seguida, utilizando-se o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al, 1990), comparada com seqüências de genes relacionados à síntese de monoterpenos depositadas no NCBI.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENO SINTASES POR RT-PCR SEMIQUANTITATIVO EM *Lippia alba*

A técnica de RT-PCR semiquantitativo foi utilizada para verificar em qual estágio foliar os dois genes candidatos se expressavam com mais intensidade. Como controle interno, foi desenhado um par de *primers* para o gene codificador da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em região conservada para a maioria das plantas (BARSALOBRES-CAVALLARI et al., 2009), amplificando um fragmento com cerca de 400 pares de base, compatível com o tamanho dos fragmentos gênicos em estudo.

As reações de RT-PCR foram realizadas para os dois pares de *primers* a partir de 200ng de cDNA e com 50 ng de cDNA para o controle interno, de folhas jovens situadas no segundo segmento nodal, folhas do quarto segmento nodal e folhas do oitavo segmento nodal do quimiotipo linalol, em termociclador *MasterCycle Gradiente* (Eppendorf), utilizando Taq DNA polimerase (2,5U) (LGC, Cotia, Brazil); MgCl₂ (2,0mM); tampão PCR 10X; dNTP mix (0,4mM); *primer* F (0.4μM); *primer* R (0.4μM); totalizando uma reação de 25μl. As condições de amplificação foram com 25, 30 e 35 ciclos com a seguinte rotina (94° C por 1 min; 58° C por 1 min; 72° C por 1 min) mais um passo de extensão final por 10 min a 72° C.

Os mesmos procedimentos supracitados foram utilizados para realização de RT-PCR semiquantitativo entre os três diferentes quimiotipos, a fim de verificar a

eventual ocorrência de expressão diferencial dos dois potenciais genes codificadores de terpeno sintases entre os três quimiotipos estudados. Nessas reações, apenas cDNA de folhas situadas no quarto segmento nodal foram utilizadas.

3.7 ANÁLISES IN SILICO

As sequências de DNA genômico e cDNA clonadas do quimiotipo linalol foram comparadas a fim de detectar a presença, o tamanho e a posição de éxons e íntrons; bem como o tamanho das possíveis sequências de aminoácidos sintetizadas. Essas análises foram realizadas com o auxílio dos programas MEGA 4 (TAMURA et al, 2007), CLUSTAL W (1.81) *Multiple Sequences Alignments* (THOMPSON, HIGGINS e GIBSON, 1994) e do algoritmo BLAST (ALTSZULI et al, 1990), especialmente o BLASTx e o BLAST 2 *sequences*. As análises filogenéticas também foram realizadas com o auxílio do programa MEGA 4 (TAMURA et al, 2007), utilizando-se o método *neighbour-joining*, contendo 1000 repetições com *bootstraps*.

4 Resultados

4.1 ANÁLISES CG-MS

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa confirmaram os componentes majoritários dos três quimiotipos estudados. Sendo assim, o quimiotipo geraniol apresentou 33,4% desse terpeno na composição de seu óleo essencial; enquanto o quimiotipo linalol, apresentou 23,4% de linalol. Já o quimiotipo citral apresentou como componentes majoritários geraniol e neral, com 36% e 29% na composição do óleo essencial respectivamente.

A porcentagem dos principais monoterpenos encontrados no óleo essencial dos três quimiotipos pode ser observada na tabela 3. Alguns monoterpenos foram encontrados nos três quimiotipos, porém com porcentagens diferentes na composição do óleo essencial de cada um, como é o caso do linalol, do limoneno e do geraniol. O último, por sua vez, tinha alta porcentagem na composição do óleo essencial dos três quimiotipos.

Tabela 3: Componente(s) majoritário(s) e principais monoterpenos presentes no óleo essencial dos quimiotipo linalol, geraniol e citral de *Lippia alba*, de acordo com as análises CG-EM realizadas.

Quimiotipo	Componente(s) majoritário(s)	Principais Componentes
Linalol	linalol 23,4%	linalol 23,4%; geraniol 6%; neral 1,25%; limoneno 0,87%
Geraniol	geraniol 33,4%	geraniol 33,4%; neral 15,96%; linalol 1,25%; limoneno 1,02%
Citral	neral 36%, geraniol 29%	neral 36%; geraniol 29%; limoneno 1%; beta-felandreno 0,78%; linalol 0,5%

4.2 CLONAGEM DE POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENO SINTASES (TPS)

De todas as combinações possíveis entre os *primers* degenerados *forward* e *reverse*, três combinações obtiveram as melhores amplificações de DNA genômico do quimiotipo linalol, sendo elas TPSF1/TPSR1, TPSF1/TPSR2 e TPSF3/TPSR1 (Figura 9). Dentre essas combinações, destacou-se o par TPSF1/TPSR2, que foi utilizado para a clonagem e sequenciamento do DNA genômico. O primer TPSF1 foi desenhado dentro da região correspondente ao motivo rico em aspartato, localizado na porção C-terminal, DDxxD, altamente conservada entre terpeno sintases, ao passo que o *primer* TPSR2 foi desenhado dentro da região conservada (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXE, que encontra-se ao final da porção C-terminal (WHITTINGTON et al., 2002; CHRISTIANSON, 2006).

Diversos fragmentos foram clonados e dentre os fragmentos sequenciados dois diferentes clones foram encontrados e considerados como potenciais genes codificadores de terpeno sintases em função do *E-value*, sendo então denominados de *LaTPS12* e *LaTPS23*. A partir dessas sequências, *primers* específicos foram desenhados para cada uma delas, visando à clonagem dos respectivos genes a partir do cDNA do quimiotipo linalol.

Após a clonagem e sequenciamento desses potenciais genes *TPS*, verificou-se a similaridade dessas seqüências com outras seqüências de terpeno sintases depositadas no NCBI através do algoritmo Blastx. As duas seqüências, *LaTPS12* e *LaTPS23* foram similares a diversas outras monoterpeno sintases. Em relação ao clone *LaTPS12*, destacam-se as similaridades com pineno sintase de *Quercus ilex* ($E\text{-value} = 6e - 34$), α -terpineol sintase de *Vitis vinifera* ($E\text{-value} = 5e - 32$), limoneno sintase de *Rosmarinus officinalis* e *Perilla citriodora* ($E\text{-value} = 6e - 30$ e $1e - 28$, respectivamente) e linalol sintase de *Lavandula latifolia* ($E\text{-value} = 3e - 28$), entre outras diversas monoterpeno sintases.

Já em relação ao clone *LaTPS23*, podem-se destacar as similaridades com cineol sintase de *Rosmarinus officinalis* ($E\text{-value} = 2e - 31$), limoneno sintase de *Perilla frutescens* e *Lavandula angustifolia* (ambas com $E\text{-value} = 2e - 31$), geraniol sintase de *Perilla frutescens* ($E\text{-value} = 1e - 29$), entre outras. Todas as terpeno sintases acima listadas sintetizam compostos terpênicos de importância industrial e/ou medicinal. É importante ressaltar que para os dois potenciais genes *TPS* o *score* estava entre 147 e 200 para todas as monoterpeno sintases listadas. Um terceiro clone apresentou similaridade a terpeno sintases, sendo denominado *LaTPS25*. Todavia, devido ao alto $E\text{-value}$ apresentado por sua sequência no Blastx, não foi utilizado nas análises subsequentes.

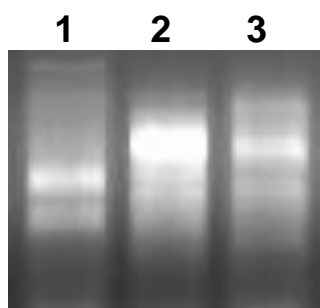


Figura 9: Amplificação de genes codificadores de TPS diretamente do DNA genômico do quimiotipo linalol. Sequência: 1 - TPSF1/TPSR1; 2 - TPSF1/TPSR2; 3 - TPSF1/TPSR3.

4.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TPS *LaTPS12* E *LaTPS23* EM *Lippia alba*

As sequências gênicas clonadas, *LaTPS12* e *LaTPS23*, apresentam um tamanho de 445 pb cada (Figura 10), sendo correspondentes a 148 aminoácidos para cada uma (Figura 11), ambas partindo de um *frame* +1. Nas duas sequências, ocorrem a presença dos motivos DDxxD e (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE, ambos altamente conservados em terpeno sintases e que aparentemente são regiões responsáveis pela ligação a um cofator íon metálico e catálise (WHITTINGTON et al., 2002; CHRISTIANSON, 2006). As sequências clonadas estão situadas na porção C-terminal de suas respectivas enzimas TPSs, visto que esses motivos

conservados se encontram no início (DDxxD) e no fim ((N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXE) de cada seqüência e situam-se na parte C-terminal dessas enzimas (Figura 11).

```

LaTPS12      GATGATGTTTATGATATATACGGCACCTTGGGAAGAATTACGACTCTTCCGCGATATTGTT 60
LaTPS23      GATGACGTTTATGATGTATATGGCACCTTGGGAAGAATTACAACTCTTCTGTGATTGTTTT 60
*****

LaTPS12      CAAAGATGGGACATTGAAGCAATGGACCAACTTCCTCACTATATGCAAATGTGTTTTCTA 120
LaTPS23      GAAAGATGGGATATTGAAGCAGTGGACCAACTCCCTCACTATATGAAAATATGTTTTCTA 120
*****

LaTPS12      GCAATCGACAACCTTCATCAATGAGATGGCATATGATGTTTTGAAAGAGCAAGAATTTGTC 180
LaTPS23      GCAATCAACAACCTTCGTCAATGAGATGGCATATGATGTTCTCAAAGAGCAAGGATTTCTC 180
*****

LaTPS12      ATCATCCCTCATTAAAGAAAATAAGTGGTCAGATTTATGCGCAAGTTAATTTCCAAGAGGCG 240
LaTPS23      ATCATCCCTCATTAAAGAAAATGTGGGCATATTTATGCGTAGGTTAATTTCCAAGAGGCG 240
*****

LaTPS12      GAGTGGTATTACAACAAGTACATGCCAATAATGGACGAATATATCAACAATGCGTGCATG 300
LaTPS23      AAGTGGTATTACGATAAGTATATACCGACAATGGAGGAGTATATCAACAATGCGTGCATT 300
*****

LaTPS12      TCAATATCAACTCCTTTGATACTATCCAACACGTA CTTTGTGTGACAAACCCCATAGAT 360
LaTPS23      TCAATATCAACTCAITTTGATACTATCCAATACGTA CTTCTGTGACAAACCCCATAGAG 360
*****

LaTPS12      AGGGAGGTTGTTCAAAGCTTCTATAAGAATCATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 420
LaTPS23      GACGAGGTTGTTCAAACCTTCTACAAAGATCACGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 420
*****

LaTPS12      CTACGGCTTCCCAATGATCTTGGAA 445
LaTPS23      CTACGGCTGCACAATGATTTGGGGA 445
*****

```

Figura 10: Alinhamento das seqüências gênicas clonadas *LaTPS12* e *LaTPS23* usando o programa ClustalW 1.81.

```

LaTPS12      DDVYDLYGTLEELRLFRDIVQRWDIEAMDQLPHYMQMCF LAIDNFINEMAYDVLKEQEFV 60
LaTPS23      DDVYDLYGTLEELQLFCDCFERWDIEAVDQLPHYMKICFLA INNFVNEMAYDVLKEQGFL 60
*****:*****:* * .:*****:*****:;*****:;*****:***** *;

LaTPS12      IIPHLRNKWSDLCAS YFQEA EWYNNKYMPIMDEYINNACMSISTPLILSNTYFVVTNPID 120
LaTPS23      IIPHLRKMWAYLCVGYFQEA KWYDYKIPTMEEYINNACISISTH LILSNTYSLVTNPIE 120
*****: *; *;.*****:***:*;* *;*****:**** ***** :*****;

LaTPS12      REVVQSFYKNHDVVRGSAMILRLNDLG 148
LaTPS23      DEVVQNFYKDHVVRCSAVILRLNDLG 148
****.***:***** **:****

```

Figura 11: Alinhamento das possíveis seqüências de aminoácidos codificadas por *LaTPS12* e *LaTPS23*, utilizando o programa ClustalW 1.81. O motivos conservados em terpeno sintases DDxxD (vermelho) e parte do motivo (N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE, representado nas seqüências clonadas por NDLG (azul), estão destacados na figura.

Para avaliar a organização íntron-éxon dos dois potenciais genes *TPS* clonados, as seqüências de cDNA e DNA genômico clonadas foram alinhadas e comparadas utilizando-se o programa MEGA 4 e o algoritmo BLAST 2 *sequences*. Nas duas seqüências genômicas ocorrem a presença de dois íntrons, dois éxons e parte de outro éxon. O motivo DDxxD, que é onde se iniciam as duas seqüências *TPS* clonadas, encontra-se no éxon 4 de genes *TPS* da classe III (TRAPP e CROTEAU, 2001). Dessa maneira, tendo o éxon 4 como ponto de partida, pode-se inferir que em ambas, *LaTPS12* e *LaTPS23*, obtivemos parte do éxon 4 e os éxons 5 e 6, bem como os íntrons 4 e 5 (Figura 12). Também devido ao alinhamento das seqüências de DNA e cDNA clonadas utilizando-se o programa MEGA 4 e o algoritmo BLAST 2 *sequences*, foi possível notar que as duas seqüências de DNA genômico clonadas apresentam sítios de junção íntron-éxons que seguem o padrão GT/AG, onde estão determinadas as prováveis seqüências de splicing (BROWN e SIMPSON, 1998) (Figura 13).

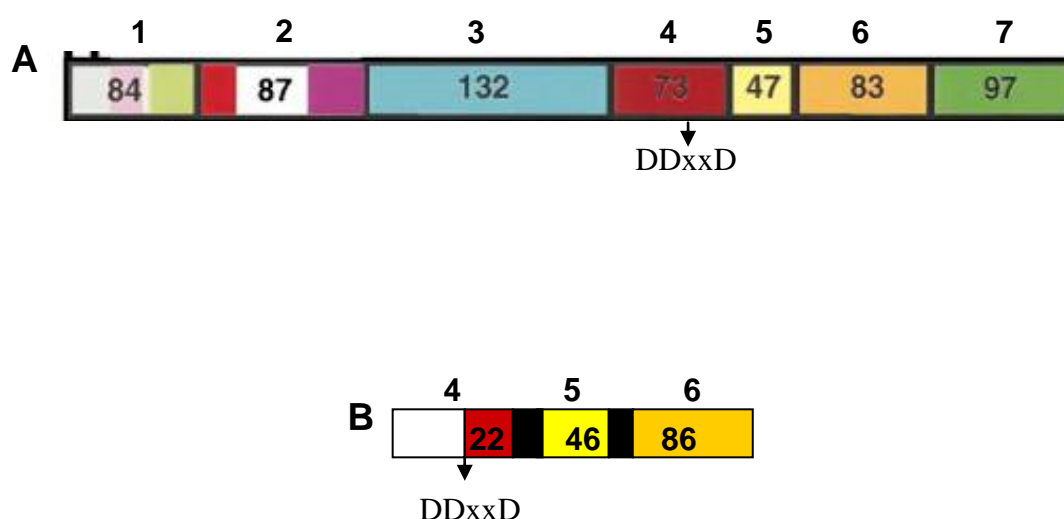


Figura 12: **A** - Distribuição íntron/exon em genes *TPS* classe III, de acordo com Trapp e Croteau (2001). O exemplo destacado é de um gene codificador de limoneno sintase de *Perilla frutescens*. Os algarismos arábicos dentro de cada retângulo (éxons) representam o número de códons de cada um dos sete éxons. Os seis íntrons estão representados pelas barras negras verticais. A região onde se encontra o motivo conservado DDxxD é destacada na figura. **B** - Esquema representando as seqüências *LaTPS12* e *LaTPS23*. Parte do éxon 4 e os éxons 5 e 6 completos foram clonados, bem como os íntrons 4 e 5. Os algarismos arábicos dentro dos retângulos (éxons) indicam o número de

códons clonados em cada éxon. O motivo DDxxD, que é onde se iniciam as seqüências clonadas, está destacado na figura.

LaTPS12

GATGATGTTTATGATATATACGGCACCTTGGAAGAATTACGACTCTTCCGCGATA
 TTGTTCAAAGGTACTAATAATTGACATATACAAATAAATAATCACATTTTTTTTCAG
 TTGAAAACTTAATTCTATCTTCCACCTCAAATATCATGCATGTATGAACTACTT
 TTTCTTTTTGTTTTTCGTAATAACATTAATATCAGATGGGACATTGAAGCAATGG
 ATCAACTTCCTCACTATATGCAAATGTGTTTTCTAGCAATCGACAACCTTCATCAAT
 GAGATGGCATATGATGTTTTGAAAGAGCAAGAATTTTGTGCATCATCCCTCATTTA
 AGAAATAAGGTGATAATATACCGTCTTGCATAAATACCTTCTTTATCTGCATATTT
 ATATATGAGGCATTAATTAGATTGTTCTGTGAAATAAATTCTGGCAGTGGTCAGA
 TTTATGCGCAAGTTATTTCCAAGAGGCGGAGTGGTATTACAACAAGTACATGCC
 AACAATGGACGAAT...

LaTPS23

GATGACGTTTATGATGTATATGGCACCTTGGAAGAATTACAACCTCTTCTGTGATT
 GTTTTGAAAGGTGGAAATAATCAACATTTACAAAAAAAAAAACATAACTCAAATC
 GTCCATCTCAAATTAATATCATGCATGTATGAACTAATAAAATTTTTTTTCTTTAA
 ATAAAATTTCAAGTGGATATTGAAGCAGTGGACCAACTCCCTCACTATATGAAA
 ATATGTTTTCTAGCAATCAACAACCTTCATCAATGAGATGGCATATTATGTTCTCAA
 AGAGCAAGAATTTCTCATCATCCCTCATTTAAGAAAAATGGTGAATATTACACTTTC
 TTGCAAAAATACTTTATTTATCTGTATTTTGGGTATAAATTATTAATAATTTGTCT
 ATGAAATATGTCTGGCAGTGGCATATTTATGCGCAGGTTATTTCCAAGAGGCG
 AAGTGGTATTACGATAAGTATATACCGACAATG...

Figura 13: Padrão GT/AG indicando a provável distribuição íntron/éxon nas seqüências de *LaTPS12* e *LaTPS23*. As bases destacadas em amarelo marcam o início e o fim de cada íntron, enquanto que as verdes marcam o início e fim dos éxons.

4.4 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENÓ SINTASES EM DIFERENTES ESTÁGIOS FOLIARES DE *Lippia alba* AVALIADA POR RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

No gênero *Lippia*, a maior parte da produção de óleo essencial ocorre nos tricomas foliares (BOLZANI et al., 1999). Assim sendo, análises de RT-PCR semiquantitativo foram empregadas a fim de verificar a ocorrência de algum estágio

foliar em que os genes codificadores de terpeno sintases eram expressos diferencialmente. Os estágios foliares foram analisados em relação à expressão do gene *LaTPS12* no quimiotipo linalol. As reações de RT-PCR semiquantitativo foram realizadas com 200 ng de cDNA para os três estágios foliares.

A melhor visualização para a ocorrência de expressão diferencial relativo ao gene *LaTPS12* ocorreu no 35º ciclo de amplificação (dado não mostrado). Como controle interno, foi realizada a amplificação de um fragmento do gene *housekeeping* GAPDH. Dos três estágios foliares analisados, verificou-se que em folhas jovens situadas no quarto segmento nodal o gene *LaTPS12* é mais fortemente expresso, seguido por folhas situadas no segundo e oitavo segmento nodal, respectivamente (Figura 14). A densidade das bandas foi mensurada utilizando-se o programa *Vison Works LS*.

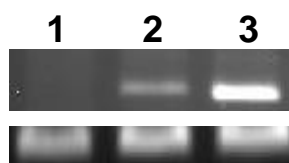


Figura 14: Expressão do gene *LaTPS12* em diferentes estágios foliares do quimiotipo linalol. Sequência: 1 – folha do oitavo segmento nodal; 2- folha do segundo segmento nodal; 3 – folha do quarto segmento nodal. Abaixo estão as amplificações do cDNA dos três estágios foliares com o gene GAPDH

4.5 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS DOIS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TERPENO SINTASES NOS QUIMIOTIPOS CITRAL, GERANIOL E LINALOL DE *Lippia alba* AVALIADA POR RT-PCR SEMIQUANTITATIVO

Folhas jovens expandidas dos quimiotipos citral, geraniol e linalol foram analisadas a fim de verificar a ocorrência de expressão diferencial dos genes *LaTPS12* e *LaTPS23* entre os três quimiotipos analisados. As reações de RT-PCR semiquantitativo foram realizadas com 200 ng de cDNA para os três quimiotipos. A melhor visualização da expressão diferencial relativo a ambos os genes ocorreu no

35º ciclo de amplificação (dados não mostrados). Como controle interno, realizou-se a amplificação de um fragmento do gene *housekeeping* GAPDH.

As reações de RT-PCR para o gene *LaTPS12* foram repetidas três vezes e a densidade das bandas foi mensurada utilizando-se o programa *Vision Works LS*. De acordo com os resultados, a expressão do gene *LaTPS12* ocorre mais fortemente no quimiotipo linalol, seguido pelo quimiotipo citral. No quimiotipo geraniol a expressão desse gene foi nitidamente mais baixa em relação aos outros dois quimiotipos (Figura 15A). A confirmação desse resultado foi feita através da aplicação do teste Tukey com $\alpha=0,05$ (Figura 15B).

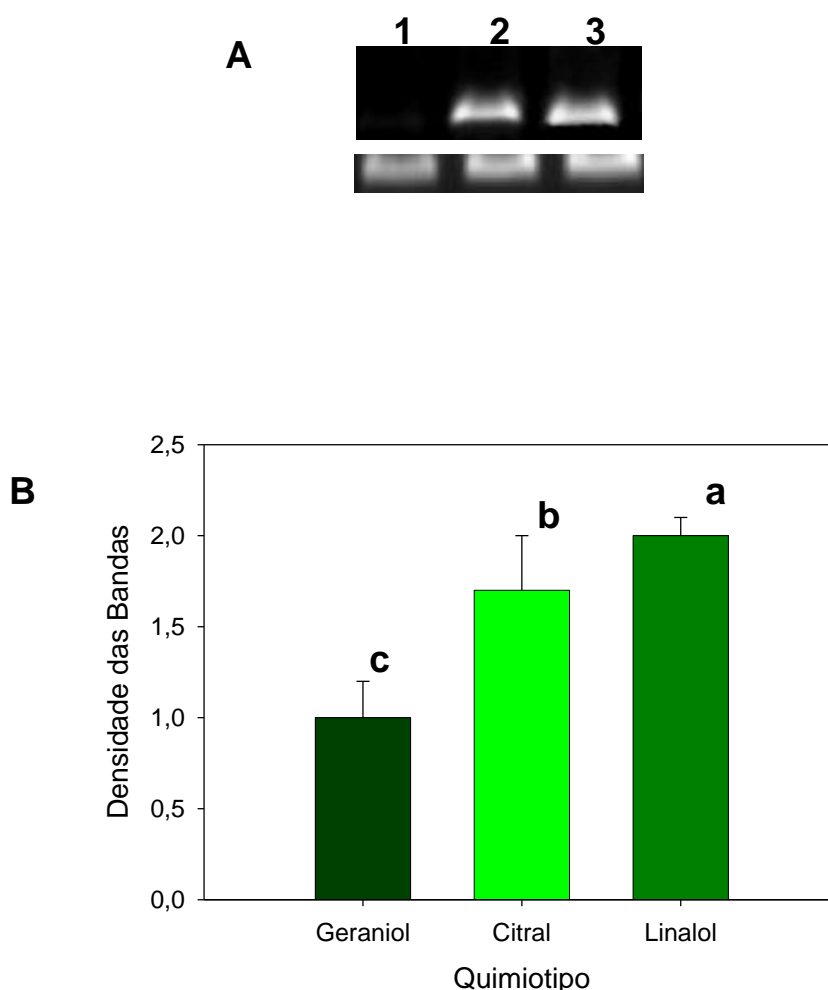


Figura 15: **A** - Expressão do gene *LaTPS12* nos três quimiotipos de *Lippia alba* analisados. Sequência: 1 - geraniol, 2- citral, 3 – linalol. Abaixo estão as amplificações do cDNA dos três estágios foliares com o gene GAPDH. **B** – Gráfico correspondente ao cálculo das médias das densidades das bandas geradas por RT-PCR nos três quimiotipos. A expressão do gene *LaTPS12* foi maior no quimiotipo linalol, seguido pelo quimiotipo citral e geraniol, respectivamente, de acordo com o teste Tukey com $\alpha=0,05$.

Em relação ao gene *LaTPS23*, a diferença de expressão entre os quimiotipos analisados foi menos acentuada. A densidade das bandas geradas por RT-PCR foi muito similar nos três quimiotipos (Figura 16). No quimiotipo geraniol e linalol, a densidade do fragmento amplificado era quase indiferenciável, mas era um pouco maior em relação ao quimiotipo citral (Figura 16), de acordo com as análises feitas no programa *Vision Works LS*. Os fragmentos amplificados tanto do gene *LaTPS12* quanto do gene *LaTPS23* apresentaram um tamanho próximo a 450 pb.

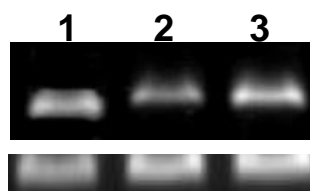


Figura 16: Expressão do gene *LaTPS23* nos três quimiotipos de *Lippia alba* analisados. Sequência: 1 – geraniol; 2 – citral; 3 – linalol. Abaixo estão as amplificações do cDNA dos três estágios foliares com o gene GAPDH.

4.6 CLONAGEM DA EXTREMIDADE 3' DO GENE *LaTPS23*

Após a clonagem e sequenciamento dos genes *LaTPS12* e *LaTPS23*, *primers* específicos foram desenhados para a clonagem das extremidades 5' e 3' desses potenciais genes codificadores de TPS. Até o momento, apenas a extremidade 3' do gene *LaTPS23* foi clonada com sucesso. O par de *primers* 23TPS 3' RACE (ACA AAG ATC ACG ATG TAG TTA GAT G) (*forward*) e *GeneRacer* 3' (*reverse*), foi a única amplificação satisfatória. O primer utilizado foi desenhado dentro do motivo conservado ((N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE), que foi justamente a extremidade da sequência *LaTPS23* anteriormente clonada. A clonagem da extremidade 3' do clone 12 e a extremidade 5' dos clones 12 e 23 não foram bem sucedidas e novos *primers* deverão ser desenhados para a clonagem completa dos genes e posterior expressão das enzimas.

Analisando-se a sequência da extremidade 3' clonada com o algoritmo Blastx, verificou-se similaridade com diversas monoterpeno sintases. Entre elas,

destacam-se limoneno sintase de *Rosmarinus officinalis* e *Perilla frutescens* (E-value = $4e - 34$ e $4e - 28$, respectivamente), pineno sintase de *Quercus ilex* (E-value = $1e - 38$) e cineol sintase de *Rosmarinus officinalis* (E-value = $1e - 28$). O score estava entre 100 e 147 para todas as enzimas relacionadas. A sequência clonada tem como último aminoácido uma leucina e se encerra com o códon de terminação TAG. A extremidade 3' de *LaTPS23* aqui clonada apresenta um tamanho de 359 nucleotídeos, codificando cerca de 118 aminoácidos.

Realizando a justaposição da sequência da extremidade 3' com a outra parte do gene *LaTPS23* anteriormente clonada, também ocorreu similaridade e altos valores de score para diversas monoterpene sintases, como para limoneno sintase de *Rosmarinus officinalis* que atingiu um score 303 (maior valor de score) e de *Perilla citriodora* (E-value = $1e - 80$ e $1e - 71$, respectivamente), pineno sintase de *Quercus ilex* (E-value = $3e - 75$) e α -terpineol sintase de *Vitis vinifera* (E-value = $2e - 74$). O menor score foi para E-beta-ocimeno sintase de *Arabidopsis thaliana*, que apresentou um valor igual a 219.

A sequência gerada pela justaposição da extremidade 3' com o interior do gene *LaTPS23* clonado, originou uma sequência com o tamanho de 741 nucleotídeos, codificando cerca de 246 aminoácidos e um códon de terminação TAG. Ela inicia-se no motivo altamente conservado DDxxD e apresenta também o motivo ((N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE). Como o motivo DDxxD está no início da porção C-terminal de enzimas TPSs (TRAPP e CROTEAU, 2001), a sequência em questão corresponde a praticamente toda a região C-terminal da enzima TPS codificada pelo gene *LaTPS23*.

4.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DE *LaTPS12* E *LaTPS23*

As seqüências de *LaTPS12* e *LaTPS23* foram alinhadas e analisadas com o programa MEGA 4 em conjunto com outras terpeno sintases bioquimicamente caracterizadas de várias espécies diferentes. Uma árvore filogenética também foi gerada utilizando-se esse mesmo programa. Essa por sua vez foi calculada com o método *neighbour-joining*, utilizando 1000 repetições com *bootstraps*. As sete classes de enzimas terpeno sintases (a até g) são representadas na árvore e estão

claramente separadas (BOHLMANN, STEELE e CROTEAU, 1997; DUDAREVA et al., 2003) (Figura 17).

Os dois potenciais genes *TPS* clonados se encaixaram, como esperado, na classe TPS-b (Figura 17), que é composto por monoterpene sintases de angiospermas, e, portanto, considerado o grupo mais derivado de enzimas terpeno sintases (DUDAREVA et al., 2003). Os maiores valores de *bootstrap* envolvendo os clones *LaTPS12* e *LaTPS23* foram para a ramificação com limoneno sintase de *Rosmarinus officinalis*, assim como foram os maiores valores de score e melhores valores de E-value especialmente para o clone *LaTPS23*. A espécie *Rosmarinus officinalis* pertence à família Lamiaceae, e é vulgarmente conhecida como alecrim. A família Lamiaceae é filogeneticamente próxima à família Verbanaceae (JUDD et al., 2002), o que reforça os resultados da análise filogenética para os dois genes clonados.

Apenas a região 3' terminal do gene *LaTPS23* foi clonada. Devido a isso, conseguimos notar a presença de três aminoácidos no final dessa sequência, que frequentemente estão ausentes em enzimas linalol sintases (LANDMANN et al., 2007). Alinhando-se a sequência de aminoácidos codificada por *LaTPS23* com as três TPSs caracterizadas por Landmann et al (2007) no programa *ClustalW* 1.8, sendo uma linalol sintase, e com linalol sintase de *Mentha citrata*, fica clara a presença desses três aminoácidos na sequência de *LaTPS23* (Figura18). Esses três aminoácidos geralmente estão ausentes em TPS que não sintetizam terpenos cíclicos.

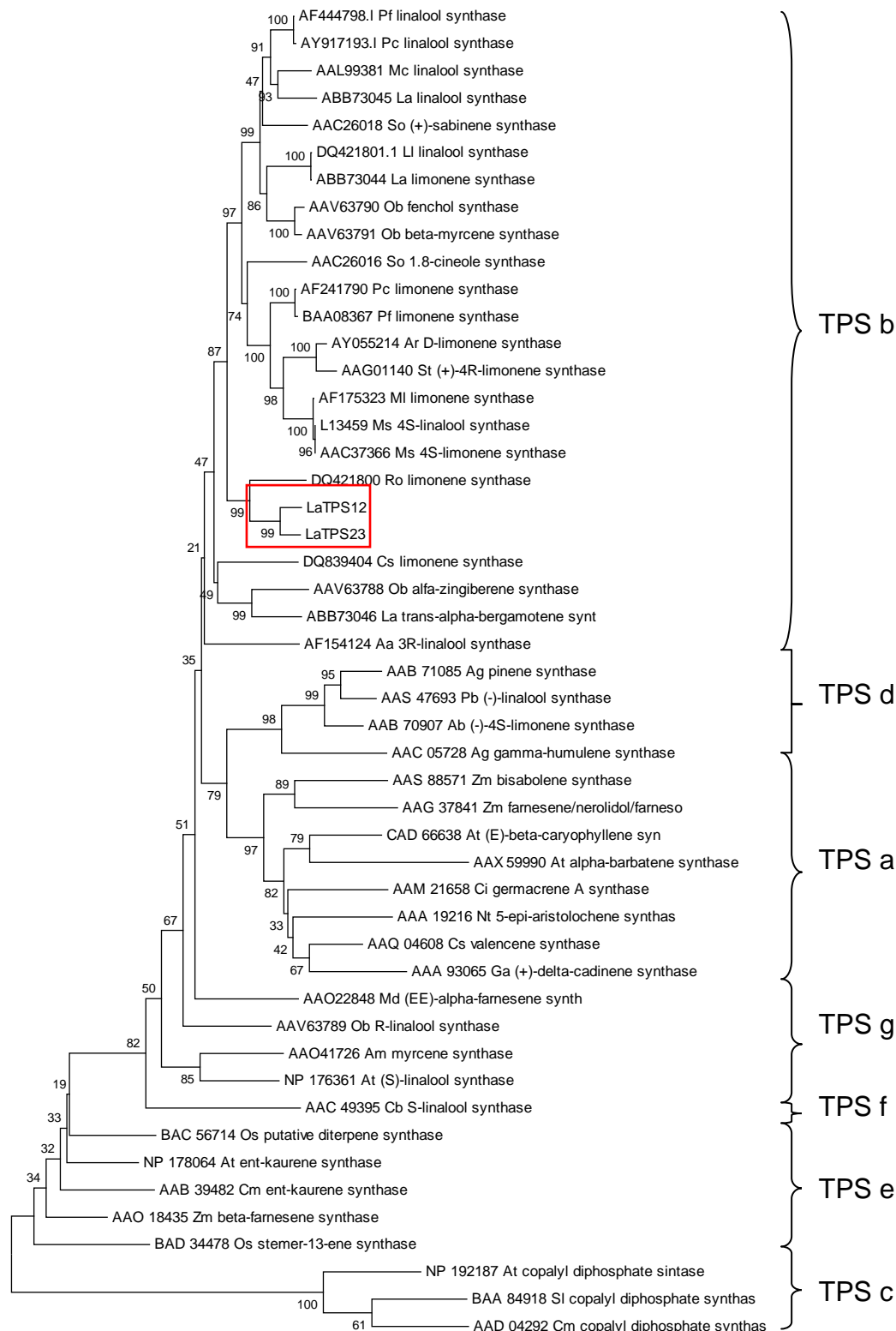


Figura 17: Árvore filogenética gerada pelo alinhamento de *LaTPS12* e *LaTPS23* com terpeno sintases das classes a até g de várias espécies de plantas. Na base da árvore está a classe TPS-c, que compreende enzimas do tipo CPS, relacionadas ao metabolismo primário. *LaTPS12* e *LaTPS23* estão na classe TPS-b. As abreviações usadas são: Aa, *Artemisia annua*; Ag, *Abies grandis*; Am, *Antirrhinum majus*; Ar, *Agastache rugosa*; At, *Arabidopsis thaliana*; Cb, *Clarkia breweri*; Ci, *Cichorium intybus*; Cm, *Cucurbita maxima*; Cs, *Citrus sinensis*; La, *Lavandula angustifolia*; Ll, *Lavandula latifolia*; Ls, *Lactuca sativa*; Mc, *Mentha citrata*; Md, *Malus domestica*; Ml, *Mentha longifolia*; Ms, *Mentha spicata*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Ob, *Ocimum basilicum*; Os, *Oryza sativa*; Pa, *Populus alba x Populus tremula*; Pb, *Picea abies*; Pc, *Perilla citriodora*; Pf, *Perilla frutescens*; Ro, *Rosmarinus officinalis*; So, *Salvia officinalis*; St, *Schizunepeta tenuifolia*; Zm, *Zea mays*.

```

LIS_M.citrata      ITLITALDDVVDIYGTLDLQLFTHVIRRDTE SATQLPYLQLFYFVLYNFVSEVAYHI
LIS_L.angustifolia ITLITSLDDVVDIYGTLDLQLFNTL FERWDNASIGRLPEYLQLFYFAIHN FVSEVAYDI
LMS_L.angustifolia IALATVVDVVDVYGTLEELQLFCD CFERWDIEAVDQLPHYMKICFLAINNFVEMAYDV
LaTPS23           -----DDVVDVYGTLEELQLFCD CFERWDIEAVDQLPHYMKICFLAINNFVEMAYDV
BERS_L.angustifolia AVLITITDDIYDIYGALEELQEFTEAFERWD INSLDLLPEYMQICFLAIFNSANELGYQI
                  **:***:**:**: * . :.*** : ** *:: :::: * . *:::

LIS_M.citrata      LKEEGFISIPFLHRAWVDLVEGYLQEARWYTKYPTMEEYLNYSITIGAPAVISQIYF
LIS_L.angustifolia LKEKGFTSIVYLQRSWVDLLKGYLKEARWYNSGYTPSLEEYFDNAFMTIGAPPVLSQAYF
LMS_L.angustifolia LKDKSFNCLPHLQRSWLDLAEAYLVEARWYHSRYTPSLEEYLNIA RVSVTCPTIVSQMYF
LaTPS23           LKEQGFLIIPHLRKNWAYLVCVGYFQEARWYDKYIPTMEEYINNACISISTHLLSNTYS
BERS_L.angustifolia LRDQGLNIIPNLKRSWAELS RAYYLEARWFHNGFVPTTDQYLNTAWISISGPLLLSYGYL
                  *::: : ** * * .* **: * : * : * : * : * : * : * : *

LIS_M.citrata      MLAKSKEKPVIESFYEYDEIIRLSGMLVRLPDDLGTLPFEMKRGDVAKSIQIYMKEQ NAT
LIS_L.angustifolia TLGSSMEKPIIESMYEYDNILRVSGMLVRLPDDLGTSSFEMERGDVPKSVQLYMKE TNAT
LMS_L.angustifolia ALPIPIEKPVIEIMYKYHDILYLSGMLLRLPDDLGTASFELKRGDVQKAVQCYM KERNVP
LaTPS23           LVTNPIEDEVVQNFYKDHVVRCSAVILRLADDLGT SQFEATRGDVPKAIECYMNESGAS
BERS_L.angustifolia TITNPIINNELKSLKHP SIIRWPSMVLRLADDLGTSS EIKRGDVSKSIQCYMNETGCC
                  . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

LIS_M.citrata      REEAEEHVRFMIREAWKEMNTTMAAN-SDLRGDVVM AAANLGRDAQFMYLDGDGW---HS
LIS_L.angustifolia EEEAVEHVRFLNREAWKMMNTAEAGD SFLVSDVVAVAAANLGRAAQFMYFDGDGW---QS
LMS_L.angustifolia ENEAREHVKFLIREASKQINTAMATD-CPFTEDFAVAAANLGRVANFVYVDGDGFGVQHS
LaTPS23           PEEAREYVKSMIWEAWKMMN KELLVN-SSFPQFFLKNAADVGRAGQFIYQHGDGFGIQH Q
BERS_L.angustifolia EGDARHHVKS LIEVALKRMNDEILME--KPFKS FDTNAMNLARISLCFYQYGDGFGKHHS
                  :* .:* : * *:* . * ::* . .* *** :.

LIS_M.citrata      QLQHRIANLLFKPYV--
LIS_L.angustifolia SLQQWIVSMLFEPYA--
LMS_L.angustifolia KIYEQIGTLMFEPYP--
LaTPS23           QNKEHISSLFFEPL---
BERS_L.angustifolia DTIKNLVSLIVLPFHMP
                  . . : : : . *

```

Figura 18: Alinhamento da porção c-terminal de linalol sintase, bergamoteno sintase e limoneno sintase de *Lavandula angustifolia*; linalol sintase de *Mentha citrata* e *LaTPS23*, utilizando-se o programa ClustaW 1.81. A região destacada indica uma deleção de três aminoácidos, típica de enzimas linalol sintases. Em todas as outras sequencias, inclusive em *LaTPS23*, esses aminoácidos estão presentes.

5 Discussão

5.1 ESTRUTURA GENÔMICA DOS POTENCIAIS GENES CODIFICADORES DE TPS *LaTPS12* E *LaTPS23* DE *Lippia alba*

De acordo com Trapp e Croteau (2001), os genes *TPS* estão divididos em três classes (I, II e III), e da classe I para a classe III ocorre um processo de perda de íntrons e perda de um domínio interno encontrado em genes *TPS* de coníferas, denominado domínio CDIS. Os genes *TPS* da classe III, apresentam 6 íntrons e 7 éxons, todos em posições conservadas e com poucas variações em relação ao tamanho dos éxons. A essa classe pertencem mono, sesqui e diterpeno sintases do metabolismo secundário de angiospermas, o que reforça a hipótese de que os genes *LaTPS12* e *LaTPS23* realmente pertencem a essa classe.

O motivo DDxxD, que é onde se iniciam as duas sequências de TPS clonadas, encontra-se no éxon 4 de genes *TPS* da classe III (TRAPP e CROTEAU, 2001). Dessa maneira, tendo o éxon 4 como ponto de partida, pode-se inferir que em ambas, *LaTPS12* e *LaTPS23*, foram obtidos parte do éxon 4, o éxon 5 e 6 inteiros, bem como os íntrons 4 e 5 (Figura 12).

O tamanho parcial do éxon 4 para as duas seqüências clonadas foi de 22 códonos, 46 códonos para o éxon 5 e cerca de 86 códonos para o éxon 6. É importante ressaltar que as duas sequências se iniciam no motivo DDxxD, situado na segunda metade do éxon 4, o que explica a clonagem de apenas parte desse éxon. Para muitos genes *TPS* da classe III, o tamanho do éxon 4 varia em torno de 73 e 74 códonos. Já em relação ao éxon 5, que está completo, em ambas apresentou um tamanho de 46 códonos, o que condiz com descrições anteriores de genes *TPS* classe III, nas quais o tamanho desse éxon varia entre 46 e 48 códonos (TRAPP e CROTEAU, 2001). Já em relação ao éxon 6, é mais difícil precisar, por enquanto, seu tamanho exato nas duas sequências. Isso se deve ao fato do último íntron, o íntron 6, adjacente *upstream* a esse códon, não ter sido clonado. Portanto, não há como estabelecer onde exatamente termina o éxon 6 de *LaTPS12* e *LaTPS23*. O tamanho do éxon 6 de genes *TPS* classe III varia em torno de 80 a 84 códonos (TRAPP e CROTEAU, 2001). Sendo assim, existe a possibilidade do éxon 6 ter sido

completamente clonado, juntamente com os primeiros códons do último éxon, o éxon 7. Todavia, é importante lembrar que o tamanho dos códons dos genes *TPS* variam de enzima para enzima e de espécie para espécie.

Novas teorias sobre a evolução de genes *TPS* tem sido elaboradas, e a classificação proposta por Trapp e Croteau (2001) pode ser alterada em breve. Um número maior de sequências de genes codificadores de terpeno sintases precisa ser conhecido, para então se obter maior suporte para tais classificações. Em *Magnolia grandiflora*, que é uma angiosperma basal, três genes *TPS* foram clonados e caracterizados, entre eles uma monoterpene sintase, uma sesquiterpene sintase e um pseudogene que se assemelha a uma monoterpene sintase (LEE e CHAPPELL, 2008). Por ser uma angiosperma basal, os autores esperavam um número maior de íntrons, o que não foi constatado.

Das três sequências clonadas por Lee e Chapell (2008), apenas o pseudogene, denominado *Mg17*, encaixava-se na classificação proposta por Trapp e Croteau (2001), e pertencia a classe III. O gene da sesquiterpene sintase, denominado *Mg25*, apresentava um único grande íntron e o gene da monoterpene sintase, denominado *Mg11*, apresentava apenas 4 íntrons. Ambos não se encaixam em nenhuma das divisões propostas por Trapp e Croteau (2001).

O fato desses genes codificadores de *TPS* pertencentes a uma angiosperma basal apresentarem poucos íntrons, não se encaixando nas classes I e II onde se situam genes codificadores de *TPS* de gimnospermas, torna necessário a elucidação de novas teorias sobre a evolução de genes codificadores de *TPS*. Assim, a teoria de perda de íntrons proposta por Trapp e Croteau (2001) passa a não mais figurar sozinha, visto que Lee e Chapell (2008) sugerem que pode ter ocorrido justamente o inverso, ou seja, um mecanismo de ganho de íntrons. Desse modo, genes *TPS* considerados recentes teriam surgido por mecanismos de quebra de íntrons, acompanhados por duplicação e embaralhamento de éxons (LEE e CHAPPELL, 2008).

Entretanto, não se pode afirmar ainda qual das duas hipóteses realmente explica a evolução de genes *TPS*, ou se ambas podem ter ocorrido em momentos distintos, ou se os genes *TPS* tiveram mais de uma origem. Sendo assim, antes de se afirmar qualquer uma dessas possibilidades, torna-se necessário a descoberta de mais sequências de genes *TPS*, não só de angiospermas mais derivadas como os genes do presente trabalho, mas também de outras angiospermas basais como da

ordem Laurales, por exemplo, e de outros taxas, tais como samambaias, musgos e hepáticas.

5.2 EXPRESSÃO DOS GENES *LaTPS12* E *LaTPS23* EM DIFERENTES ESTÁGIOS FOLIARES

De acordo com os resultados apresentados entende-se que, para o gene *LaTPS12* e, provavelmente, para muitos outros genes codificadores de TPS que fazem parte da composição do óleo essencial de *L. alba*, sua expressão já é iniciada em folhas jovens situadas no segundo segmento nodal. Essa expressão acentua-se à medida que a folha se desenvolve para estágios mais intermediários e cai gradativamente à medida que a folha atinge estágios mais maduros. Em folhas situadas no oitavo segmento nodal, a expressão desse gene já é bastante reduzida (Figura 14). Isso pode indicar que a folha, ao atingir esse estágio, apresenta pouca síntese de mRNA relativos a genes *TPS*. Assim, nesse estágio, enzimas *TPS* têm sua síntese reduzida, e como consequência, ocorre uma produção mais baixa de terpenos, diminuindo conseqüentemente a qualidade e quantidade do óleo essencial.

Em *Magnolia grandiflora*, Lee e Chappel (2008) também verificaram a expressão de três diferentes genes *TPS*, duas mono e uma sesquiterpeno sintase, em dois diferentes estágios foliares. No estágio de folha jovem em desenvolvimento, a expressão desses três genes foi muito mais evidente do que em estágios foliares mais maduros. Adicionalmente, verificou-se também que dois desses genes, um codificador de uma enzima sesquiterpeno e outro codificador de uma potencial monoterpene sintase, eram também transcritos nos estames de *Magnolia grandiflora*, mas não foi constatado se as respectivas *TPSs* eram ou não sintetizadas nesse tecido.

5.3 EXPRESSÃO DOS GENES *LaTPS12* E *LaTPS23* NOS QUIMIOTIPOS CITRAL, GERANIOL E LINALOL DE *Lippia alba*

Apesar de terem sido realizados experimentos com RT-PCR semiquantitativo para o gene *LaTPS12* e, análises cromatográficas nos correspondentes quimiotipos, ainda não é possível afirmar qual terpeno sintase esse gene codifica. De qualquer maneira, a possibilidade desse gene codificar uma linalol sintase não pode ser excluída. Para afirmar a qual terpeno sintase *LaTPS12* corresponde, é necessário sintetizar sua respectiva enzima, isolar e testar sua atividade. Dessa forma, quando se obtém a enzima purificada, é realizada a reação da mesma com os três possíveis substratos, geranyl difosfato, farnesil difosfato e geranyl geranyl difosfato e analisando posteriormente o(s) produto(s) gerado(s), bem como a especificidade da enzima ao substrato, pode-se obter uma conclusão fidedigna de qual TPS está sendo produzida (LANDMANN et al., 2007). Por enquanto, sabe-se apenas que o gene *LaTPS12* é mais fortemente expresso no quimiotipo linalol em relação ao citral e que sua expressão é bem mais baixa no quimiotipo geraniol.

Associando-se os resultados observados com as análises cromatográficas, o gene *LaTPS23* poderia codificar uma geraniol sintase, devido ao fato do geraniol ser um monoterpene disponível em altas concentrações no óleo essencial dos três quimiotipos (tabela 3). Outros dois monoterpenos presentes no óleo essencial desses três quimiotipos é o neral e o limoneno. Vale lembrar que a maior similaridade para o gene *LaTPS23*, de acordo com o algoritmo Blastx, foi com limoneno sintase de *Rosmarinus officinales*. Todavia, assim como no caso do gene *LaTPS12*, é preciso ter muita cautela antes de se afirmar qual terpeno sintase esses genes codificam. Como já supracitado, a obtenção da sequência completa desses genes para posterior expressão e análises da atividade dessas enzimas são indispensáveis para essa conclusão.

É bem conhecido que a expressão de metabólitos secundários não é controlada apenas por fatores genéticos, mas também por influência das condições ambientais. Diversos fatores bióticos e abióticos tais como danos teciduais, ataque de patógenos e herbívoros, estresse hídrico, exposição excessiva a raios ultravioletas, entre outros, podem fazer com que a planta produza diversas

substâncias de defesa, tais como polifenol oxidase e R-amilase. Dentre as diferentes classes de metabólitos secundários, encontram-se compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides (BENNETT e WALLSGROVE, 1994; DIXON, HARRISON e PAIVA, 1995; KESSLER e BALDWIN, 2002; KLIEBENSTEIN, 2004).

Assim sendo, especialmente o caso da expressão dos genes em questão pode ser associada a alguma monoterpene sintase cujo(s) produto(s) esteja relacionado com as condições ambientais nas quais estavam expostos os três quimiotipos de *L. alba* naquele momento. É importante ressaltar que a coleta do material tanto para a extração do mRNA quanto para a realização das análises cromatográficas, ocorreram na mesma época, agosto de 2008, que é caracterizado como um período de seca na região de Juiz de Fora, o que pode ter induzido a alguma condição de estresse nos indivíduos analisados. Conseqüentemente, esse fator pode ter ocasionado uma maior expressão e posterior síntese de algum composto terpênico comum nos três quimiotipos.

Existem também vários estudos mostrando que elicitores tais como ácido jasmônico e metil jasmonato podem agir induzindo alguma forma de estresse nas plantas. Elicitores são moléculas sinalizadoras, que induzem a produção de diversas substâncias dentro de uma população de plantas para que essas se protejam de uma futura condição adversa (GRAHAM e GRAHAM, 1996; GAGNON et al., 1997).

Em *Ocimum basilicum*, sob condições de estresse induzidas pela pulverização de metil jasmonato, a produção de diversos metabólitos secundários foi consideravelmente acentuada, principalmente de terpenóides, destacando-se o linalol (ZHIGANG et al., 2007). Assim, a indução de condições de estresse por substâncias elicitoras como as acima citadas em *L. alba* pode ocasionar a produção diferencial de diversos compostos terpênicos, possibilitando que haja um melhor entendimento da expressão dos potenciais genes codificadores de TPS aqui clonados.

5.4 SIMILARIDADE DE *LaTPS23* COM GENES CODIFICADORES DE ENZIMAS TIPO LIMONENO SINTASES E POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES

Dentre as diversas monoterpene sintases que apresentaram similaridade com *LaTPS23*, a grande maioria foi de limoneno sintases de várias espécies de plantas, inclusive o maior *score*, como anteriormente citado. De qualquer forma ainda resta a clonagem da extremidade 5' desse gene para que assim ocorra sua expressão e as análises enzimáticas de sua TPS correspondente para que possamos afirmar qual TPS esse gene codifica.

Em algumas plantas como, por exemplo, em tabaco, tem-se realizado a transformação com genes codificadores de enzimas tipo limoneno sintases, buscando a produção de óleo essencial com altos teores de limoneno devido a sua utilização industrial, especialmente na produção de essências (LUCKER et al., 2004).

Além disso, o número de relatos do envolvimento de substâncias presentes nos óleos voláteis relacionados com a defesa de plantas contra patógenos e herbívoros, sugere que a proteção das plantas na agricultura contra esses organismos pode ser acentuada por engenharia genética, tornando-se uma estratégia para controle biológico, por exemplo, superexpressando o gene codificador de alguma terpeno sintase que sintetize um terpeno com atividade pesticida (DICKE, SCHUTTE e DIJKMAN, 2000). Como exemplo, podemos citar a superexpressão do gene codificador de linalol sintase (*FaNES1*) em morango, onde a produção de altos índices de linalol repeliu o ataque do afídeo *Myzus persicae* nessa planta (AHARONI et al., 2004).

5.5 FILOGENIA DE *LaTPS12* E *LaTPS23*

As sete classes de enzimas terpeno sintases (a até g) são representadas na árvore filogenética construída e estão claramente separadas (figura 17). Nota-se que todas as classes de enzimas terpeno sintases enraízam da classe TPS-c, que é constituída por terpeno sintases de metabolismo primário, especialmente por enzimas tipo copalil difosfato sintase. A classe TPS-e, que também está situada

numa porção mais basal da árvore, é também representada por terpeno sintases de metabolismo primário, mas é constituída principalmente por enzimas tipo kaureno sintase.

Enzimas tipo linalol sintase estão incluídas em todas as classes TPS, menos nas duas já citadas. A classe TPS-f é representada basicamente pela linalool sintase de *Clarkia breweri*. A classe TPS-a é representada por sesquiterpenos sintases de angiospermas; TPS-d por monoterpene sintases de gimnospermas; TPS-g por monoterpene sintases que não possuem o motivo conservado RRR₃W (BOHLMANN, MEYER-GAUEN e CROTEAU, 1998; DUDAREVA et al., 2003). *LaTPS12* e *LaTPS23* foram agrupadas na classe TPS-b, que é composto por monoterpene sintases do metabolismo secundário de angiospermas, e, portanto, considerado um grupo mais derivado de enzimas terpeno sintases (DUDAREVA et al., 2003).

Como já discutido anteriormente, ainda resta a possibilidade de *LaTPS12* codificar uma linalol sintase, ao contrário de *LaTPS23*. Além dos resultados relativos à expressão desses dois genes, existem outros fatores que corroboram com essas hipóteses. Mesmo sendo uma linalol sintase, era de se esperar que os dois genes aqui clonados fossem filogeneticamente próximos a enzimas tipo limoneno sintases, como foi constatado. Genes codificadores de enzimas linalol sintases apresentam a porção relativa à região N-terminal semelhante à região N-terminal de genes codificadores de enzimas tipo copalil difosfato sintases, ao passo que a porção relativa à região C-terminal se assemelha a região C-terminal de genes codificadores de enzimas tipo limoneno sintases (CSEKE, DUDAREVA e PICHERSKY, 1998).

O rearranjo de genes codificadores de enzimas tipo copalil difosfato sintase e limoneno sintases, compõem uma das hipóteses do surgimento de genes codificadores de enzimas linalol sintases (CSEKE, DUDAREVA e PICHERSKY, 1998; CROWELL et al., 2002). As sequências aqui clonadas se iniciam no motivo conservado DDxxD, sendo portanto correspondentes a região C-terminal, que em genes codificadores de linalol sintases é semelhante a genes tipo limoneno sintases.

A presença dos três aminoácidos na porção 3' terminal de *LaTPS23*, geralmente ocorre em enzimas que sintetizam produtos cíclicos. Esses aminoácidos formam uma espécie de alça na estrutura quaternária da enzima TPS (Figura 6) que impede o ataque nucleofílico prematuro da água durante a reação da enzima com o

substrato, permitindo que o produto formado seja um terpenóide cíclico (CROWELL et al., 2002) (Figura 5). Como sabemos, o linalol é um terpenóide de cadeia aberta (Figuras 2 e 3). Esse fato, somado aos resultados relativos á expressão desses dois genes em *L. alba*, praticamente exclui a possibilidade de *LaTPS23* codificar uma linalol sintase, mas ainda mantém essa possibilidade para *LaTPS12*. Contudo, como já discutido, apenas com a caracterização desses dois genes poderemos afirmar a quais terpeno sintases eles correspondem.

6 CONCLUSÕES

Dois potenciais genes codificadores de terpeno sintases, *LaTPS12* e *LaTPS23*, foram parcialmente clonados em *Lippia alba*. Análises de RT-PCR semiquantitativo mostraram que a expressão desses genes ocorre em maior nível no em folhas situadas no quarto segmento nodal, do que em a folhas jovens situadas no segundo segmento nodal e folhas mais maduras situadas no oitavo segmento nodal. Conclui-se também que a diferença na expressão do gene *LaTPS23* nos três quimiotipos aqui analisados é pouco acentuada. Já a diferença na expressão do gene *LaTPS12* é mais acentuada nesses quimiotipos, sendo mais expresso no quimiotipo linalol, seguido pelo quimiotipo citral e geraniol, respectivamente.

Análises genômicas realizadas nas duas sequências sugerem que as sequências dos genes *LaTPS12* e *LaTPS23* fazem parte da classe III de genes codificadores de terpeno sintases definidas por Trapp e Croteau (2001), que compreende genes codificadores de mono, sesqui e diterpeno sintases de angiospermas. De acordo com a análise filogenética, os dois genes codificadores de enzimas terpeno sintases clonados se agrupam na subfamília TPS-b, que é composta predominantemente por monoterpeno sintases do metabolismo secundário de angiospermas. As sequências de *LaTPS12* e *LaTPS23* foram similares a diversas monoterpeno sintases, sobretudo com limoneno sintase de *Rosmarinus officinales*.

A clonagem da seqüência completa de *LaTPS12* e *LaTPS23*, seguida pela expressão de ambos em sistemas heterólogos torna-se uma etapa crucial para a definição de qual terpeno sintase cada um desses genes codifica. Ainda assim, esse trabalho contribuiu para o entendimento da expressão de genes codificadores de terpeno sintases em *L. alba*, e as sequências aqui clonadas certamente irão colaborar com posteriores estudos filogenéticos e inferências evolutivas relativas a genes *TPSs*. Por fim, os genes *TPS* clonados de *L. alba* poderão ser aproveitados para estudos relativos ao melhoramento do óleo essencial dessa e de outras plantas, visando possíveis utilizações dos respectivos terpenos sintetizados na indústria e como fitoterápicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. 2000. Antiviral activity of some medicinal plants. **Phytotherapy Research** **14**: 604-607.

ADAMS, R.P. 1995. **Identefication of essencial oil components by gas cromatografy/mass espectrometry**. Allured Publishing Corporation, Carol Strem, IL, USA, 469p.

AHARONI, A.; GIRI, A.P.; DEUERLEIN, S.; GRIEPINK, F.; DE KOGEL, W.J.; VERSTAPPEN, F.W.; VERHOEVEN, H.A.; JONGSMA, M.A.; SCHWAB, W.;BOUWMEESTER, H.J. 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. **Plant Cell** **15**: 2866-2884.

AHARONI A., GIRI A.P., VERSTAPPEN F.W.A., BERTEA C.M., SEVENIER R., SUN Z., JONGSMA M.A., SCHWAB W., BOUWMEESTERA, H.J. 2004. Gain and Loss of Fruit Flavor Compounds Produced by Wild and Cultivated Strawberry Species. **The Plant Cell** **16**: 3110–3131.

ALMEIDA, E.R.A.; CERDA-OLMEDO, E. 2008. Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in Phycomyces. **Current Genetics** **53**: 129-137.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology** **215**: 403-410.

ARAGÃO, F.J.L.; RECH, E.L. 1998. Isolamento de vetores para transformação direta. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Editora da Embrapa, Brasília, cap 1, p.17-33.

ATTI-SERAFINI, L.; PANSEIRA, M.R. 2002. Variation in essencial oil yield and composition of lippia alba (Mill) N.E.Br. grown in southern. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** **4**: 15-19.

AUBORG, S.; LECHARNY, A.; BOHLMANN, J. 2002. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabdopsis thaliana. **Molecular Genetics Genomics** **267**: 730-745.

BADIES, A.Z. 1992. Antimycotic effects of Cardomom essencial oil components on toxigenic models. **Egyptian Journal Food Sciencie** **20**: 441-452.

BARROSO, G. 1991. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Editora da UFV, Viçosa, Minas Gerais, 326p

BARSALOBRES-CAVALLARI, C.; SEVERINO, F.E.; MALUF, M.P.; MAIA, I.G. 2009. Identification of suitable internal control genes for expression studies in Coffea arabica under different experimental conditions. **Biomed Central Molecular Biology** **10(1)**: 186-197.

BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. 1994. Secondary Metabolites in Plant Defense-Mechanisms. **New Phytologist** **127**: 617-633.

BIASI, A.L.; COSTA, G. 2003. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural** **33:3**: 455-459

BOHLMANN, J., STEELE, C.L., CROTEAU, R. 1997. Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*): cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (2)-(4S)-limonene synthase, and (2)-(1s,5s)-pinene synthase. **Journal of Biological Chemistry** **272(35)**: 21784-21792.

BOHLMANN, J.G.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **95**: 4126-4133.

BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R; SILVA, D.H.; LOPES, M.N. 1999. Search of antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais Academia Brasileira de Ciência** **71**: 181-187.

BROWN, J.W.S.; SIMPSON, C.G. 1998. Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **49**: 77-95.

CASTRO, D.M.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. 2002. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Ex Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. **Acta Horticulturae** **1**: 561-569.

CHIANG, L.C.; NING, L.T.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; LIN C.C. 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of plantago species. **Planta Medica** **69**: 600-604.

CHRISTIANSON, D.W. 2006. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. **Chemical Reviews** **106**: 3412-3442.

CORREA, C.B.V. 1992. Anatomical and histochemical study of *Lippia alba* (mil.) N.E.Br. EX Britt & Wilson, know as erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmacologia** **73**: 57-64.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.; LEWIS, N. 2000. Natural products (secondary metabolism). In Buchanan, B.B.G.W.; Jones, R.L. [ed.], **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Biologists. p. 1250–1318

CROWELL, A.L.; WILLIAMS, D.C.; DAVIS, E.M.; WILDUNG, M.R.; CROTEAU, R. 2002. Molecular cloning and characterization of a new linalool synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **405**: 112-121.

CSEKE, L.; DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. 1998. Structure and evolution of linalool synthase. **Molecular Biology and Evolution** **15**: 1491-1498.

DICKE, M.; SCHUTTE C.; DIJKMAN, H. 2000. Change in behavioral response to herbivore-induced plant volatiles in a predatory mite population. **Journal of Chemical Ecology** **26**: 1497-1514.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; PAIVA, N.L. 1995. The Isoflavonoid Phytoalexin Pathway - from Enzymes to Genes to Transcription Factors. **Physiologia Plantarum** **93**: 385-392.

DUDAREVA, N.; CSEKE L.; BLANC, V.M.; PICHERSKY, E. 1996. Molecular characterization and cell type-specific expression of linalool synthase gene from *Clarkia*. **Plant Physiology** **111**: 815-815.

DUDAREVA, N.; MARTIN, D.; KISH, C.M.; KOLOSOVA, N.; GORESTEIN, N.; FALDT, J.; MILLER, B.; BOHLMANN, J. 2003. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. **Plant Cell** **15**: 1227-1241.

DUTTA, A.; BATRA, J.; PANDEY-RAI, S.; SINGH, D.; KUMAR, S.; SEN, J. 2005. Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Planta** **220**: 376-383.

ELIZABETSK, E.; BRUM, L.F.S.; SOUZA, D.O. 1999. Anticonvulsivantproperties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine** **6**: 107-113.

GAGNON, G.A.; BOOTH, S.D.J.; PELDSZUS, S.; MUTTI, D.; SMITH, F.; HUCK. 1997. Carboxylic acids: formation and removal in P. M. full-scale plants. **Journal American Water Works Association** **89**: 88-97.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. 1999. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica** **65**: 700-703.

GRAHAM, T.L.; GRAHAM, M.Y. 1996. Signaling in soybean phenylpropanoid responses - Dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments. **Plant Physiology** **110**: 1123-1133.

GUERRERO, M.F.; CARRON, R.; MARTIN, M.L; SAN ROMAN, L.; REGUERO, M.T. 2001. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. **Journal Ethnopharmacology** **75**: 33-36.

HARBONE, J.B.; BAXTER, H. 1995. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. Taylor & Francis. London, England. 791p

HOSOI, M.; ITO, M.; YAGURA, T.; ADAMS, R.P.; HONDA, G. 2004. cDNA isolation and functional expression of myrcene synthase from *Perilla frutescens*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** **27**: 1979-1985.

IJIMA, Y.; GANG, D.R.; FRIDMAN, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. 2004. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. **Plant Physiology** **134**: 370-379.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2002. **Plant systematics: a phylogenetic approach**, 2 nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA, 576p.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology** **53**: 299-328.

KLIEBENSTEIN, D.J. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. **Plant Cell and Environment** **27**: 675-684.

KOPPENHOFER, B.; BEHNISCH, R.; EPPERLEIN, U.; HOLZSCHUH, H.; BERNREUTHER, A. 1994. Enantiomeric odor differences and gas chromatographic properties of flavors and fragrances. **Perfum Flavor** **19**: 1-14.

LANDMANN, C.; FINK, B.; FESTNER, M.; DREGUS, M.; ENGEL, K.H.; SCHWAB, W. 2007. Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). **Archives of Biochemistry and Biophysics** **465**: 417-429.

LEE, S.; CHAPPELL, J. 2008. Biochemical and genomic characterization of terpene synthases in *Magnolia grandiflora*. **Plant Physiology** **147**: 1017-1033.

LUCKER, J.; SCHWAB, W.; FRANSSSEN, M.C.R.; VAN DER PLAS, L.H.W.; BOUWMEESTER, H.J.; VERHOEVEN, H.A. 2004. Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis: two-step production of (+)-trans-isopiperitenol by tobacco. **Plant Journal** **39**: 135-145.

MARTIN, D.M.; FALDT, J.; BOHLMANN, J. 2004. Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. **Plant Physiology** **135**: 1908-1927.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. 1995. **Plantas medicinais**. Editora da UFV. Viçosa, Minas Gerais. 220p.

MATOS, F.J.A. 1996. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia** **77**: 137-141

MATOS, F.J.A. 1998. **Farmácias Vivas**. Editora da EUFC, Fortaleza, Ceará, 220p.

McGEADY, P.; CROTEAU, R. 1995. Isolation and Characterization of an Active-Site Peptide from a Monoterpene Cyclase Labeled with a Mechanism-Based Inhibitor. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **317**: 149-155.

OHASHI, S.T.; ROSA, L.S.; SANTANA, J.A.; GRENN, C.L. 1997. Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management. **Perfum Flavor** **22**: 1-5.

ONG, T.P.; HEIDOR, R.; DE CONTI, A.; DAGLI, M.L.Z.; MORENO, F.S. 2006. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage,

but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis** **27**: 1194-1203.

PACIONIRK, E.F. 1990. **A planta nossa de cada dia: Plantas medicinais, descrição e uso**, 2 ed. Copygraf, Curitiba, Paraná, 92p.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology** **76**: 201-214.

PECTKA, J.; FERREIRA, V.; GONZALEZ-VINAS, M.A.; CACHO, J. 2006. Sensory and chemical characterization of the aroma of a white wine made with Devin grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **54**: 909-915.

PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.; SANTOS, M.; GARCIA, L.; PIERRE, P.; VICCINI, L.; OTONI, W. 2006. In vitro propagation of endangered Lippia filifolia mart. and schauer ex schauer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** **42**: 558-561.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S.K.V. 2002. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Editora da UFLA. Lavras, Minas Gerais. 169p.

POLO, M.P.; DE BRAVO, M.G. 2006. Effect of geraniol an fatty-acid and mevalonate metabolism in the human hapatoma cell line Hep G2. **Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire** **84**: 102-111.

ROMÃO, E. 1998. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Editora da Embrapa, Brasília, cap 11. p. 163-167.

SALIMENA, F. 2000. **Revisão taxonômica de Lippia alba L. sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)**. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 208 p.

SALIMENA-PIRES, F. 1991. **Verbenaceae da serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 302 p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. 2006. **The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 800p.

SCHUH, C.; SCHIEBERLE, P. 2006. Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea: Quantitative differences between tea leaves and infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **54**: 916-924.

SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.; RAMOS, M.F.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.C.; DE AQUINO NETO, F.R.; FRIGHETTO, N. 2002. Linalool from Lippia alba: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **50**: 3518-3521.

SIMÕES, C.M.O.;SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 1999. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC, Florianópolis, Santa Catarina.

SKOLD, M.; BORJE, A.; MATURA, M.; KARLBERG, A.T. 2002. Studies on the autoxidation and sensitizing capacity of the fragrance chemical linalool, identifying a linalool hydroperoxide. **Contact Dermatitis** **46**: 267-272

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** **24**:1596-1599.

TAVARES, E.S.; JULIÃO L.S.; LEITÃO, S.G.; LAGE, C.L.S.; VICCINI, L.; PIERRE, P.M.O.; DAVIDE, L.C. 2003. **Diferenças morfológicas, anatômicas e fisiológicas de dois quimiotipos de Lippia alba (Mill) N. E. Br. relacionadas à poliploidia**, p. 99. VI Congresso de Ecologia do Brasil, Simpósios Biodiversidade, Unidades de Conservação, Indicadores Ambientais, Cerrado e Caatinga. Editora da UFC. Fortaleza, Ceará.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res** **22**:4673-4680

TRAPP, S.C.; CROTEAU, R. B. 2001. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics** **158**: 811-832.

TURNER, G., GERSHENZON, J.; NIELSON, E.E.; FROEHLICH, J.E.; CROTEAU, R. 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. **Plant Physiology** **120**: 879-886.

VALE, T.G.; MATOS, F.J.A; DE LIMA, T.C.M; VIANA, G.S.B. 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology** **67**: 127-133.

VIANA, G.S.B.; DO VALE, T.G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. 1998. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A comparative study. **Pharmaceutical Biology** **36**: 347-351.

VIANA, G.S.D.; DO VALE, T.G; SILVA, C.M.M.; MATOS, F.J.D. 2000. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** **23**: 1314-1317.

VICCINI, L.F.; DA COSTA, D.C.S.; MACHADO, M.A; CAMPOS, A.L. 2004. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD Markers. **Plant Systematics and Evolution** **246**: 1-8.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P.M.O.; PRACA, M.M.; DA COSTA, D.C.S.; ROMANEL, E.D.; DE SOUSA, S.M.; PEIXOTO, P.H.P; SALIMENA, F.R.G. 2005. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution** **256**: 171-178.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. 1981. **Secondary Plant Metabolism**. The Macmillan Press Ltd, Hong kong, 335p.

VIEIRA, R. F. 1999. Conservation of Medicinal and Aromatic Plants in Brazil. In J. Janick [ed.], **Perspectives on new crops and new uses**. ASHS Press. p. 152-159

WEI, S.Y.; LI, M.; TANG, S.A.; SUN, W.; XU, B.; CUI, J.R.; LIN, W.H. 2008. Induction of apoptosis accompanying with G(1) phase arrest and microtubule disassembly in human hepatoma cells by jaspolide B, a new isomalabaricane-type triterpene. **Cancer Letters**. **38(4)**:91-98

WHITTINGTON, D.A.; WISE, M.L.; URBANSKY, M.; COATES, R.M; CROTEAU, R.B.; CHRISTIANSON, D.W. 2002. Bornyl diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **99**: 15375-15380.

WILLIAMS, D.C.; MCGARVEY, D.J.; KATAHIRA, E.J.; CROTEAU, R. 1998. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'Pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. **Biochemistry** **37**: 12213-12220.

WISE, M.L.; SAVAGE, T.J.; KATAHIRA, E.; CROTEAU, R. 1998. Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) - cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. **Journal of Biological Chemistry** **273**: 14891-14899.

YAMAGUCHI, S.; SUN, T.P.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y. 1996. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme entkaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L). **Plant Journal** **10**: 203-213.

YOSHIKAWA, K.; KOKUDO, N.; TANAKA, M.; NAKANO, T.; SHIBATA, H. 2008. Novel abietane diterpenoids and aromatic compounds from *Cladonia rangiferina* and their antimicrobial activity against antibiotics resistant bacteria. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** **56**: 89-92.

ZAMORA-MARTINEZ, M. C.; DE PASCUAL POLA, C. N. 1992. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology** **35**: 229-257.

ZHIGANG, L.; WANG, X.; CHEN, F.; KIM, H.J. 2007. Chemical changes and overexpressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment. **Journal of Agricultural and Food chemistry** **55**: 706-713.