

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

UNIFAL-MG

HETIENE PEREIRA MARQUES

**INFLUÊNCIA DA GLUTAMINA NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS EM
CALOS DE *Garcinia brasiliensis* MART. (CLUSIACEAE)**

**Alfenas-MG
2014**

HETIENE PEREIRA MARQUES

**INFLUÊNCIA DA GLUTAMINA NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS EM
CALOS DE *Garcinia brasiliensis* MART. (CLUSIACEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG. Linha de Pesquisa: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Plínio Rodrigues dos Santos Filho (ICB/UNIFAL-MG)

Colaboradores: Prof. Dr. Sandro Barbosa (ICN/UNIFAL-MG), Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos (UFV).

**Alfenas - MG
2014**

Marques, Hetiene Pereira.

Influência da glutamina na produção de metabólitos especiais em calos de *Garcinia brasiliensis* MART. (CLUSIACEAE) / Hetiene Pereira Marques. - Alfenas, MG, 2014.

44 f. -

Orientador: Breno Régis Santos

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Tecidos vegetais – Cultura e meios de cultura. 2. Fenóis.
3. Flavonóides. 4. Aminoácidos. I. Santos, Breno Régis. II. Título.

CDD: 581.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ecologia e Tecnologia Ambiental

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1419 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
www.unifal-mg.edu.br/ppgecoambiental/



HETIENE PEREIRA MARQUES

“INFLUÊNCIA DA GLUTAMINA NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ESPECIAIS EM CALOS DE *Garcinia brasiliensis* MART. (CLUSIACEAE).”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Pesquisa: Tecnologia Ambiental.

Aprovado em: 08 de agosto de 2014.

Prof. Dr. Breno Régis Santos
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Sandro Barbosa
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Renato Paiva
Instituição: UFLA

Assinatura: 

Dedico aos meus pais Renato e Hélia e ao Prof.º Dr. Marcelo Polo.

“Ou o século XXI é dedicado aos valores humanos, morais e éticos ou de nada valeram os avanços tecnológicos conquistados até aqui.”

(Gilson Volpato, 2001)

RESUMO

O Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) é uma espécie arbórea de importância medicinal, da qual diversos estudos têm obtido o isolamento e testado a atividade de moléculas como a 7-epiclusianona, guttiferona-A, garciniafenona e fukugetina. Porém, a produção desses compostos *in natura* é limitada, tornando necessário estudos que otimizem a produção destas. Nesse contexto as técnicas de cultura de tecidos vegetais, como o cultivo de calos e suspensões celulares tem sido utilizada para produzir e otimizar a obtenção de metabólitos de interesse farmacêutico *in vitro*. O objetivo desse trabalho foi utilizar a glutamina como fonte de nitrogênio em calos de *G. brasiliensis* com intuito de investigar a influência desse aminoácido na produção de fenóis, flavonoides e proantocianidinas. Explantes de 2 mm de espessura e 4 mm de diâmetro foram obtidos a partir de seguimentos do procâmbio de sementes de bacupari, obtidas de uma população localizada no município de Viçosa-MG e inoculados em meio de cultivo contendo 30 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) complementado com sacarose (3%), ágar (0,7%), BAP (6-Benzilaminopurine, 0,5 mg L⁻¹) e diferentes concentrações de sais que seguem: Meio MS com as concentrações originais de nitrogênio (20 mM NH₄NO₃ e 18,8 mM KNO₃), meio MS com 10 mM NH₄NO₃ e 9,4 mM KNO₃ chamado ½ força (MS ½) e meio MS sem NH₄NO₃ e KNO₃ contendo glutamina em concentrações finais de 5, 10, 30 e 60 mM. Após a inoculação o material foi mantido em sala de crescimento na ausência de luz por um período de 140 dias. As análises bioquímicas foram realizadas em intervalos de 20 dias e as análises fitoquímicas no final do período de cultivo, aos 140 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado contendo 6 tratamentos e 4 repetições. Foi observada diferença significativa na concentração de aminoácidos entre os tratamentos em relação ao tempo de cultivo. A concentração mais baixa para aminoácidos foi a 60 mM de glutamina no tempo de 100 dias. Essa redução pode estar relacionada com a síntese de proteínas, as quais haviam mostraram o decréscimo aos 80 dias de cultivo. Além disso a baixa quantidade de aminoácidos a 60 mM de glutamina indica que esses podem ter sido desviados para a rota metabólica dos metabólitos especiais.

Palavras-chave: Cultura de Tecidos. Fenóis. Flavonóides. Proantocinidinas. Aminoácidos.

ABSTRACT

The Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) is an arboreal species of medicinal importance, where through various studies have demonstrated the isolation and activity of important molecules such as 7-epiclusianone, guttiferona-A, garciniafenona and fukugetina. However, the production of these compounds *in nature* is limited, so seen the need for studies that optimize the production of these compounds. In this context the techniques of plant tissue culture, such as *in vitro* cultivation of cells (callus) has been used to produce and optimize the production of metabolites of pharmaceutical interest *in vitro*. The objective of this study was to use glutamine as a nitrogen source in callus of *G. brasiliensis* in order to investigate the influence of the amino acid in the production of phenols, flavonoids and proanthocyanidins. The explants were inoculated in MS medium, MS with half concentration of the nitrogen salts, and MS absent of nitrogen sources supplemented with glutamine (5, 10, 30 and 60 mM). Biochemical analyzes were performed at intervals of 20 days and phytochemical analysis at the end of the culture period. At the 20 th and 100 th days, there was no difference in the amino acid content, between the treatments. In the remaining periods, the treatment with 60 mM of glutamine showed the lowest concentrations of amino acids. With respect to proteins, there were differences only at the 140 th day of cultivation, and the use of 60 mM of glutamine resulted in higher concentrations, while MS had the lowest concentrations. Similarly, the treatment with 60 mM glutamine resulted in higher levels of phenolic compounds, flavonoids and proanthocyanidins, and the lower levels were observed in MS. Thus, it is concluded that the use of 60 mM glutamine to replace the nitrogen sources in MS medium in the 140 th day promoted the accumulation of proteins and synthesis of secondary metabolites in callus of Bacupari.

Keywords: Plant Tissue. Glutamine. Phenols. Flavonoids. Proanthocyanidins. amino acids

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	DESENVOLVIMENTO	10
2.1	<i>Garcinia brasiliensis</i> MART.: Características gerais	10
2.2	Aspectos farmacológicos do Bacupari	10
2.3	Metabólitos especiais	12
2.4	Produção de metabólitos especiais e a cultura de tecidos	14
3	JUSTIFICATIVA	16
4	OBJETIVO GERAL	17
4.1	Objetivos Específicos	17
	REFERÊNCIAS	18
	SEGUNDA PARTE	24
	ARTIGO: EFEITO DA NUTRIÇÃO NITROGENADA SOBRE A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CALOS DE BACUPARI	24
	INTRODUÇÃO	28
	MATERIAL E MÉTODOS	29
	Material vegetal e indução de calogênese	29
	Conteúdo total de aminoácidos e proteínas	30
	Determinação do conteúdo total de fenólicos, flavonóides e proantocianidinas.....	30
	RESULTADOS	31
	CONCLUSÕES	38
	BIBLIOGRAFIA	38

1 INTRODUÇÃO

O Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) é uma espécie arbórea frutífera nativa de regiões brasileiras como a floresta Amazônia e de Mata Atlântica. Possui como principal característica a importância medicinal, que por meio de diversos estudos tem demonstrado atividade leishmanicida, antiproteolítica, anticancerígena, antimicrobiana, entre outras. Assim, importantes moléculas de interesse farmacêutico têm sido isoladas a partir de frutos da espécie como a fukugetina, a guttiferona-A e a 7-epiclusianona. Porém, a produção dessas moléculas na planta *in natura*, é reduzida.

Muitos estudos buscam otimizar e estabelecer protocolos para obtenção de metabólitos em escala maior do que produzido naturalmente. Pesquisas dentro da cultura de células vegetais tem demonstrado que a produção de metabólitos de interesse medicinal *in vitro* pode se tornar uma interessante alternativa, otimizando a produção de composto em larga escala, em espaços laboratoriais reduzidos, preservando-se a espécie e atendendo a demanda de indústrias farmacêuticas.

Em *G. brasiliensis* foram identificados os compostos fukugetina e guttiferona-A por meio de cultivo de calos obtidos pelo procâmbio da semente (SANTOS FILHO, et al., 2014). A produção de metabólitos secundários via cultura de células pode estar aliada a adição de reguladores de crescimento, mudanças nutricionais do meio de cultivo e uso de precursores e de elicitores. A glutamina, um aminoácido que participa da assimilação do nitrogênio na célula, sendo precursor na biossíntese de compostos secundários, tem sido utilizada como elicitador em cultivos de células, aumentando a produção de compostos *in vitro*, como do composto psolarem (PARAST et al., 2011).

Devido à importância medicinal da *G. brasiliensis* e a necessidade de estudos que viabilizem e otimizem a produção de compostos secundários, o presente estudo teve como objetivo utilizar a glutamina como elicitador e precursor na produção de metabólitos especiais em calos de *G. brasiliensis*

2 DESENVOLVIMENTO

O referencial teórico do presente trabalho aborda sobre as características gerais, aspectos farmacológicos de *Garcinia brasiliensis* Mart., e as aplicações da cultura de tecidos vegetais na obtenção de produtos secundários de plantas.

2.1 *Garcinia brasiliensis* MART.: Características gerais

O Bacupari (*Garcinia brasiliensis* Mart.) pertence à família botânica Clusiaceae. É uma espécie nativa de florestas tropicais da Amazônia, onde passa por longos períodos de inundação (DA SILVA MARINHO et al., 2013; SOUZA et al., 2013); e na Mata Atlântica, incluindo as regiões de restingas (LEAL et al., 2013).

A espécie possui sistema sexual dioico, onde as folhas apresentam filotaxia oposta cruzada, forma elíptica e bordos do limbo lisos. Inicialmente são avermelhadas, passando a verde-claras e posteriormente a verde-escuras. As suas flores possuem antenas diurnas e o aroma é suave e adocicado. A polinização ocorre de maneira generalista, sendo as espécies *Apis mellífera* e *Trigona spinipes* polinizadores eficientes. O florescimento ocorre entre agosto e setembro. O fruto é indeiscente, do tipo bacoide campomanesóide, arredondado, amarelo, com estaminódios persistentes, onde a polpa que envolve as sementes é alva, adocicada e escassa. As sementes são elipsoides marrons com linhas longitudinais mais claras e, internamente são amarelas e exsudam látex. A dispersão das sementes ocorre de forma zoocória e quando não dispersos, os frutos secam e caem no solo liberando as sementes, sendo que a germinação é do tipo criptocotiledonar e apresenta germinação lenta e recalcitrância nas sementes. O período de frutificação vai de dezembro a janeiro (CORRÊA et al., 1926; CORREIA et al., 2013; LEAL et al., 2012).

2.2 Aspectos farmacológicos do Bacupari

A diversidade de atividades biológicas e a importância medicinal de produtos naturais instigam um interesse em estudos que viabilizem a utilização desses compostos para o desenvolvimento de novas drogas (KUMAR et al., 2013), e as investigações histoquímicas e fitoquímicas subsidiam esse tipo de estudo.

O bacupari tem sido apontado como espécie de grande importância farmacológica. Em estudos histoquímicos das folhas foram identificadas inclusões inorgânicas na forma de drusas e orgânicas como grãos de amido e compostos fenólicos dispostos ao longo de toda lâmina foliar e pecíolo, havendo também a presença de canais secretores com conteúdo lipídico no parênquima fundamental e próximos ao feixe vascular (SANTA-CECÍLIA et al., 2013).

Investigações fitoquímicas em extratos de frutos, sementes, folhas e raízes de *G. brasiliensis* têm resultado no isolamento de diferentes substâncias com propriedades farmacológicas, como é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Substâncias isoladas em *Garcinia brasiliensis*, atividade biológica e referências.

(Continua)

Tipo de órgão	Substância	Atividade	Referência
Folha	Lupeol	Não testado	CORRÊA et al., 2009.
	7-epiclusianona	Antinoceptiva Anti-inflamatória	SANTA-CECÍLIA et al., 2011. SANTA-CECÍLIA et al., 2012.
Semente	7-epiclusianona Guttiferona	Não Testado	MARTINS et al., 2011.
	7-epiclusianona Guttiferona-A	Antimicrobiana	NALDONI et al., 2009.
Calos Procâmbio de sementes	Fukugetina Guttiferona-A 7-epiclusianona	Não Testado	SANTOS-FILHO, et al., 2014.
Fruto	Óleos voláteis	Antioxidante Anti-inflamatória	MARTINS et al., 2008.
	Garciniafenona 7-epiclusianona	Leishimanicida	DEROGIS et al., 2008; PEREIRA et al., 2010.

			(Conclusão)
Tipo de órgão	Substância	Atividade	Referência
	Guttiferona-A	Leishimanicida	PEREIRA et al., 2010.
	Fukugetina	Leishimanicida	PEREIRA et al., 2011; GONTIJO et al., 2012.
	Biflavonóide 4''-O- β -D-glicosil Moreloflavona, Moreloflavona	Leishimanicida	GONTIJO et al., 2012.
	7-epiclusianona Guttiferona	Não testado	MARTINS et al., 2011
	7-epiclusianona	Antimicrobiana	ALMEIDA et al., 2008; NALDONI et al., 2009.
	Guttiferona-A	Antimicrobiana	NALDONI et al., 2009.
	7-epiclusianona	Antioxidante Citotóxica Antimutagênica	CARVALHO-SILVA et al., 2012.
	7-epiclusianona	Antiproliferativa	MURATA et al., 2010.
	Guttiferona-A 7-epiclusianona	Fotoproteção Fotoquimioprevenção	FIGUEIREDO et al., 2014.

Fonte: do autor.

2.3 Metabólitos especiais

Nos últimos 200 anos, a biologia e a química descreveram as funções vitais básicas dos vegetais, como: divisão celular, crescimento, reprodução, desenvolvimento e armazenamento de substâncias orgânicas atribuídas aos metabólitos primários (BOURGAUD et al., 2001).

Paralelo a isso, haviam substâncias produzidas pelos vegetais, das quais não se sabia a verdadeira função. Essas substâncias, chamadas de metabólitos secundários, “Produtos Naturais” ou “produtos secundários” não apresentavam ação direta no metabolismo básico vegetal.

Contudo, devido a importância dos metabólitos como base para produção de medicamentos, venenos, veneno, aromatizantes e materiais industriais, além de possuírem função ecológica, foi entre o final do século XIX e o início do século XX os químicos orgânicos começaram a se interessar pelos metabólitos secundários.

Entretanto, devido às diversas funções atribuídas aos nos metabólitos secundários, estes se apresentam divididos em três classes principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O grupo dos compostos fenólicos tem sido muito pesquisado devido as funções desempenhadas nas plantas e a importância para seus consumidores (LEE, 2014). Esses compostos contituem um grupo com mais de 6000 substâncias identificadas. (MAEDA; DUDAREVA, 2012), possuindo diversas funções específicas nas plantas, como proteção ultravioleta, pigmentação, propriedades antifúngicas e antimicrobianas, sinalização hormonal, atração e repulsão de polinizadores, dispersores de sementes e produção de nódulos (AGATI et al., 2012; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011).

Os compostos fenólicos podem ainda ser subdivididos em dois grupos com base em sua estrutura: não-flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos e elagitaninos) e flavonoides (antocianinas, flavonois-glicosídeos, monômeros flavanol e proantocianidinas), onde ambos vêm sendo estudados quanto a sua distribuição na planta e quanto a elucidação estrutural (ARAPITAS, 2012; LEE et al., 2012).

Os flavonoides compõem uma grande classe de metabólitos especiais constituído de mais de 10.000 estruturas. Esses compostos estão relacionados com o estresse ambiental, possuindo atividade antioxidante em plantas superiores (AGATI, et al., 2012). Dentro da classe dos flavonoides, encontram-se as proantocianidinas ou taninos condensados, os quais possuem ação adstringente, existindo abundantemente em diversas partes da planta, como em frutos, sementes e cascas. O seu uso e ação *in vivo* e *in vitro* demonstraram diante de muitos estudos o potencial anticancerígeno dessas substâncias (NANDAKUMAR et al., 2008).

2.4 Produção de metabólitos especiais e a cultura de tecidos

A principal limitação na produção de metabólitos secundários pela tecnologia do cultivo de células vegetais é o baixo rendimento desses compostos (ZULDIN et al., 2013). Todavia, esse rendimento pode ser otimizado através da otimização dos meios de cultura (RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002) e manipulação de culturas celulares vegetais, elevando a produção de compostos-alvo com o uso de elicitores (ZHONG, 2001).

Staba et al. (1963) marcaram o início de inúmeras tentativas de demonstrar que a cultura de células vegetais poderia constituir uma via alternativa para a produção de metabólitos especiais. A partir de então, a técnica de cultura de tecidos vegetais tem sido aplicada como alternativa que visa a obtenção de compostos *in vitro* por meio da cultura de células (JAIN; SAXENA 2009; JAIN et al., 2012; PALACIO, 2008; ZARE et al., 2011).

Estudos variando o tipo de cultura (suspensão celular e calos), a composição do meio de cultura e reguladores de crescimento têm mostrado que a produção de compostos medicinais de interesse, como os alcaloides, terpenoides, esteroides, saponinas, compostos fenólicos e aminoácidos, tem sido igual ou superior a de plantas *in natura* (VANISREE et al., 2003).

Congruente ao exposto, a cultura de calos e suspensões celulares têm sido utilizada para obter metabólitos secundários em diferentes espécies vegetais. Por exemplo, o cultivo de células em suspensão de *Habenaria edgeworthii* foi significativamente mais eficiente em produzir compostos fenólicos quando comparado aos tubérculos selvagens (GIRI et al., 2012).

Em outro estudo, o cultivo de calos de *Artemisia absinthium* L. usando meio MS acrescido dos reguladores de crescimento Thidiazuron (TDZ) em combinações com ácido α -naftaleno acético (ANA) e ácido indolacético (AIA), também foi eficiente no aumento da quantidade de fenóis e flavonoides totais (ALI et al., 2013). Além disso, o cultivo de calos de *Scutellaria columnae*, em meio MS solidificado e acrescentado de cinetina (CIN), proporcionou a identificação de triterpenos e compostos fenólicos (STOJAKOWSKA; KISIEL, 1998).

A variação inorgânica do meio de cultura também pode influenciar na produção de metabólitos secundários, como em calos obtidos a partir de explantes foliares de *Tagetes patula* e *Tagetes minuta*, onde a variação inorgânica do meio influenciou quantitativamente na produção de tiofenos e outros compostos secundários não polares (KETEL, 1986; NCUBE et al., 2014).

O uso de elicitores também tem sido uma alternativa para otimizar a produção de metabólitos em culturas *in vitro* (KARUPPUSAMY, 2009). O “Elicitor” pode ser definido

como uma substância que, quando introduzida em pequenas concentrações em cultivos de células, pode iniciar ou aumentar a biossíntese de compostos específicos, pois pode proporcionar efeitos semelhantes aos do estresse natural e, assim, ativar o sistema bioquímico da planta; resultando na indução da produção de metabólitos secundários nos tecidos vegetais (NAMDEO, 2007; SAW et al., 2010). Esses elicitores podem ser classificados de acordo com a sua natureza: bióticos ou abióticos e com base na sua origem: endógenos ou exógenos (ANTOGNONI, et al., 2007; BIONDI et al., 2002; NAMDEO, 2007; STANISZEWSKA et al., 2003;).

Nesse contexto, a glutamina, aminoácido pertencente ao grupo do ácido 2-oxoglutárico, tem sido utilizada com muito sucesso na complementação das fontes inorgânicas de nitrogênio, bem como a única fonte desse elemento, estimulando o crescimento de diversos tecidos *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Muitos trabalhos têm investigado os fatores em que a glutamina pode influenciar seja no cultivo *in vivo* (AMIN et al., 2011), ou no cultivo *in vitro* como o crescimento de células de calos (XU; SUNDERLAND, 1981), regeneração de embriões somáticos (ASAD et al., 2009) e na assimilação de nitrogênio e viabilidade em cultura de células (SEELYE et al., 1995). Além disso, a glutamina tem sido utilizada como elicitador na produção de metabólitos secundários cultivados *in vitro*, como por exemplo, o cultivo de calos de *Psoralea corylifolia* em que a glutamina proporcionou um aumento significativo na quantidade de psolarem, uma furanocumarina com propriedades anticancerígenas. (PARAST et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Garcinia brasiliensis é uma espécie medicinal que possui metabólitos de interesse farmacêutico. Porém, a espécie possui um crescimento lento e difícil germinação devido a característica recalcitrante de suas sementes. Além disso, os principais metabólitos são extraídos de frutos e sementes, o que induz o extrativismo intenso reduzindo a dispersão e a reprodução natural da espécie.

Apesar da produção *in vivo* de metabólitos especiais em *G. brasiliensis*, a quantidade de compostos ainda é insuficiente para atender a demanda industrial. Assim muitas técnicas dentro da biotecnologia vegetal têm sido utilizadas para aumentar a produção de compostos. A cultura de células (calos), aliada ao uso de precursores de vias biossintéticas de metabólitos secundários e de elicitores.

A glutamina se torna uma ótima opção para esse tipo de estudo visto que este aminoácido é precursor de vias metabólicas de compostos secundários, sendo o primeiro aminoácido a se formar no metabolismo do nitrogênio. A glutamina também tem sido utilizada como elicitador, aumentando a produção de importantes substâncias, como por exemplo, o composto psolarem (PARAST et al., 2011). Como o protocolo para a o cultivo de calos do procâmbio do embrião de sementes já encontra-se descrito por Santos-Filho et al. (2014) o uso da glutamina pode tornar-se uma ferramenta interessante para a otimização da produção dos metabólitos *in vitro* em *G. brasiliensis*.

Portanto, as análises bioquímicas e fitoquímicas de extratos obtidos a partir de calos de *G. brasiliensis* e a viabilidade de seu cultivo em diferentes concentrações de glutamina permitirá obter informações sobre o melhor tratamento para a obtenção de metabólitos secundários, e oferecendo novas contribuições para a cultura de tecidos.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de metabólitos em calos de *Garcinia brasiliensis* Mart.

4.1 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de glutamina no meio de cultura sobre a produção de compostos especiais;

Quantificar a produção de fenólicos, flavonóide e proantocinidinas nos calos em resposta aos tratamentos com glutamina;

Determinar o efeito dos tratamentos com glutamina sobre a viabilidade celular dos calos.

REFERÊNCIAS

- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- ALI, M.; ABBASI, B. H.; IHSAN-UL-HAQ. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 400-406, 2013.
- ALMEIDA, L. S. B. D. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against in *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 886-91, 2008.
- AMIN, A.A. et al. Physiological response of onion plants to foliar application of putrescine and glutamine. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 3, p. 353-360, 2011.
- ANTOIGNONI, F. et al. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 345-352, 2007.
- ARAPITAS P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1708-1717, 2012.
- ASAD, S. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1214-1218, 2009.
- BIONDI, S. et al. Secondary metabolism in root and callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L.: the relationship between morphological organization and response to methyl jasmonate. **Plant Science**, v. 163, n. 3, p. 563-569, 2002.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.
- CARVALHO-SILVA, et al. Antioxidant, cytotoxic and antimutagenic activities of 7-epiclusianone obtained from pericarp of *Garcinia brasiliensis*. **Food Research International**, v. 48, p. 180-186, 2012.
- CORRÊA, S. R. et al. Lupeol. **Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry**, v. 65, p. 097-099, 2009.

CORREIA, M. C. R.; DE LIMA, H. A.; DA SILVA, R.; C.; P. Caracterização dos frutos, sementes e plântulas de espécies de Clusiaceae das restingas do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 64, n. 1, p. 061-073, 2013.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

DA SILVA MARINHO, T. A. et al. Distribuição e crescimentos de *Garcinia Brasiliensis* Mart. E *Hevea Spruceana* (Benth.) Müll. Arg. Em uma floresta inundável em Manaus, Amazonas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 223-232, 2013.

DEROGIS, P.B.C. et al. Complete assignment of the Hand ¹³CNMR spectra of *Garcinia* phenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones.

Magnetic Resonance in Chemistry, v. 46, n. 3, p: 278-282, 2008.

FIGUEIREDO, S. A. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65-73, 2014.

GIRI, L. et al. *In vitro* production of phenolic compounds and antioxidant activity in callus suspension cultures of *Habenaria edgeworthii*: A rare Himalayan medicinal orchid. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 1-6, 2012.

GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1230-1235, 2012.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 58, p. 613-23, 2012.

HAMASAKI, R. M.; PURGATTO, E.; MERCIER, H. Glutamine enhances competence for organogenesis *in* pineapple leaves cultivated *in vitro*. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 4, n. 17, p. 383-389, 2005.

JAIN, S. C.; PANCHOLI, B.; JAIN, R. *In vitro* callus propagation and secondary metabolite quantification in *Sericostoma pauciflorum*. **Iranian Journal Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 4, p. 1103-1109, 2012.

JAIN, S.M.; SAXENA, P.K. Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants. **Methods in Molecular Biology**, v. 547, 2009.

KENNEDY, O. DAVID; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 32-50, 2011.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/ EMBRAPA, 1999, p. 519-531.

KETEL, D. H. Inorganic nutrition of callus tissues of tagetes species: the effects on morphogenesis and accumulation of thiophenes and other non-polar secondary metabolites. **Journal of Plant Physiology**, v. 125, n. 1-2, p. 69-77, 1986.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; CHATTOPADHYAY, S.K. The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethno botanical and therapeutic importance. **Fitoterapia**, v. 89, p. 86-125, 2013.

LEAL, D. O., et al. Floral structure of *Garcinia brasiliensis* in relation to flower biology and evolution. **Journal. Plant Science**, v. 173, n. 2, p. 172-183, 2012.

LEAL, D. O., et al. *Garcinia brasiliensis*: insights into reproductive phenology and sexual system in a Neotropical environment. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 1577-1585, 2013.

LEE, J. Establishing a case for improved food phenolic analysis. **Food Science & Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2013.

LEE, J.; DOSSETT, M.; FINN, C.E. *Rubus* fruit phenolic research: the good, the bad, and the confusing. **Food Chemistry**, v. 130, p. 785-796, 2012

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual. Review Plant Biolology**, v. 63, p. 73-105, 2012.

NAMDEO, A. G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review, **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 69-79, 2007.

MARTINS, F.T. et al. Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry e Biodiversit**, v. 5, n. 2, p. 251-258, 2008.

MARTINS, F.T. et al. A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 451-457, 2011.

MURATA, R.M. et al. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 379-83, 2010.

NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S.K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Letters**, v. 269, p. 378-387, 2008.

NALDONI, F.J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 403-7, 2009.

NCUBE, B., FENNIE, J.F., VAN-STADEN, J. Carbon–nitrogen ratio and *in vitro* assimilate partitioning patterns in *Cyrtanthus guthrieae* L. **Plant Physiol Biochem**, v. 74, n. 246-54, 2013.

PALACIO L. et al. *In vitro* propagation of "jarilla" (*Larrea divaricata* CAV.) and secondary metabolite production. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 12, p. 2321-5, 2008.

PARAST, B.M.; CHETRI, S.K.; SHARMA, K.; AGRAWAL V. *In vitro* isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1138-1146, 2011.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.

PEREIRA, I. O. et al. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as leishmania protease inhibitors. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 6, p. 557-562, 2011.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 280-285, 2011.

SANTA-CECÍLIA, F.V. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 397-404, 2013.

SANTA-CECÍLIA, F.V. et al. 7-Epiclusianone, the natural prenylated benzophenone, inhibits superoxide anions in the neutrophil respiratory burst. **Journal of medicinal of food**, v, 15, n. 2, p. 200-205, 2012.

SANTOS-FILHO, P.R. et al. Growth curve, biochemical profile and phytochemical analyses in calli obtained from the procambium segments of bacupari. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 1-8, 2014.

SAW, N. M. M. T. et al. Effect of elicitors and precursors on the synthesis of anthocyanin in grape *Vitis vinifera* cell cultures. **Energy Research Journal**, v. 1, n. 2, p. 189–192, 2010.

SEELYE, J.F. et al. Glutamine synthetase activity ammonium accumulation and growth of callus cultures of *Asparagus officinalis* L. exposed to high ammonium or phosphinothricin, **Journal. Plant Physiology**, v. 146, p. 686-692, 1995.

SOUZA, C. T. et al. Seedlings of *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae) subjected to root flooding: Physiological, morphoanatomical, and antioxidant responses to the stress. **Aquatic Botany**, v.111, p. 43-49, 2013.

STANISZEWSKA, I. et al. Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 5, p. 565-568, 2003.

STOJAKOWSKA, A.; KISIEL, W. Secondary metabolites from a callus culture of *Scutellaria columnae*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 3, p. 324-325, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal: Metabólitos secundários e defesa vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013, p. 309-320.

VANISREE, M. et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, n. 1, p. 1-22, 2004.

XU, Z. H., SUNDERLAND, N. Glutamine, inositol and conditioning factor in the production of barley pollen callus *in vitro*. **Plant Science**, v. 23, n. 2, p. 161-168, 1981.

ZARE, K.H. et al. Callus culture of *Echium italicum* L. towards production of a shikonin derivative. **Natural Products Research**, v. 25, n. 16, p. 1480-7, 2011.

ZHONG, J. J. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 72, p. 1–26, 2001.

ZULDIN, N. N. M. et al. Induction and analysis of the alkaloid mitragynine content of a *Mitragyna speciosa* suspension culture system upon elicitation and precursor feeding. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO: EFEITO DA NUTRIÇÃO NITROGENADA SOBRE A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CALOS DE BACUPARI

Autores: Hetiene Pereira Marques, Breno Régis Santos, Plínio Rodrigues dos Santos Filho, Fabiana Couto Zanin, Denismar Nogueira, Breno Régis dos Santos*

*Autor correspondente.

Artigo submetido ao periódico da Acta Amazonica

Efeito da nutrição nitrogenada sobre a produção de metabólitos em calos de Bacupari

Hetiene Pereira MARQUES¹, Plinio Rodrigues dos SANTOS FILHO², Sandro BARBOSA¹,
Fabiana Couto ZANIN¹, Denismar Alves NOGUEIRA³, Breno Régis SANTOS^{1*}

¹ Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, Instituto de Ciências da Natureza, Alfenas – MG, Brasil.

² Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Alfenas – MG, Brasil.

³ Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG, Instituto de Ciências Exatas, Alfenas – MG, Brasil.

*Corresponding author: brenors@yahoo.com.br

1 Efeito da nutrição nitrogenada sobre a produção de metabólitos em calos de Bacupari

2

3 **RESUMO**

4 O Bacupari é uma árvore de médio porte nativa da Amazônia, porém presente em todo
5 território brasileiro. Recentemente, o Bacupari tem recebido considerável atenção devido
6 à produção de compostos bioativos. Entretanto, a produção desses metabólitos *in vivo* é
7 pequena, objetivando-se assim, nesse trabalho avaliar a influência da nutrição nitrogenada
8 no conteúdo endógeno de aminoácidos e proteínas e na produção de fenólicos,
9 flavonóides e proantocianidinas em calos de Bacupari. Obtidos do procâmbio de sementes
10 de bacupari, os explantes foram inoculados em meio MS contendo a totalidade dos sais
11 de nitrogênio, MS com a metade da concentração dos sais de nitrogênio e MS ausente de
12 fontes nitrogenadas suplementados com glutamina (5, 10, 30 e 60 mM). As análises
13 bioquímicas foram realizadas em intervalos de 20 dias e as análises fitoquímicas ao final
14 do período de cultivo. No 20 ° e 100 ° dias não houve diferença no conteúdo de
15 aminoácidos entre os tratamentos. Nos demais períodos houve diferenças apenas no 140
16 ° dia de cultivo e o tratamento com 60 mM de glutamina apresentou as menores
17 concentrações de aminoácidos. Com relação às proteínas, houve diferença apenas no 140
18 ° dia de cultivo e o uso glutamina a 60 mM resultou nas maiores concentrações, enquanto
19 o MS apresentou as menores concentrações desses metabólitos. Da mesma forma, o
20 tratamento com 60 mM de glutamina resultou nos maiores níveis de compostos fenólicos,
21 flavonóides e proantocianidinas, e os menores níveis foram observados no MS. Assim,
22 conclui-se que o emprego de glutamina a 60 mM em substituição às fontes nitrogenadas
23 do meio MS aos 140 dias, favoreceu o acúmulo de proteínas e síntese de metabólitos
24 secundários nos calos de Bacupari.

25

26 **PALAVRAS-CHAVE:** Glutamina, fenóis, flavonóides, proantocianidinas,
27 aminoácidos.

28

29 Effect of nitrogen nutrition on the metabolites production in calli of Bacupari

30

31 **ABSTRACT**

32 The Bacupari is a tree medium size native to the Amazon, but found throughout the
33 Brazilian territory. Recently, Bacupari have received considerable attention due to its
34 bioactive compounds. However, the production of these metabolites *in vivo* is small.
35 Thus, the aim of this work was to evaluate the influence of nitrogen nutrition on the
36 endogenous content of amino acids and proteins, and in the production of phenolic,
37 flavonoids and proanthocyanidins in callus of Bacupari. The explants were inoculated in
38 MS medium, MS with half concentration of the nitrogen salts, and MS absent of nitrogen
39 sources supplemented with glutamine (5, 10, 30 and 60 mM). Biochemical analyzes were
40 performed at intervals of 20 days and phytochemical analysis at the end of the culture
41 period. At the 20 th and 100 th days, there was no difference in the amino acid content,
42 between the treatments. In the remaining periods, the treatment with 60 mM of glutamine
43 showed the lowest concentrations of amino acids. With respect to proteins, there were
44 differences only at the 140 th day of cultivation, and the use of 60 mM of glutamine
45 resulted in higher concentrations, while MS had the lowest concentrations. Similarly, the
46 treatment with 60 mM glutamine resulted in higher levels of phenolic compounds,
47 flavonoids and proanthocyanidins, and the lower levels were observed in MS. Thus, it is
48 concluded that the use of 60 mM glutamine to replace the nitrogen sources in MS medium
49 in the 140 th day promoted the accumulation of proteins and synthesis of secondary
50 metabolites in callus of Bacupari.

51

52 **KEYWORDS:** glutamine, phenols, flavonoids, proanthocyanidins, amino acids.

53

54 INTRODUÇÃO

55 Metabólitos secundários compõem um grupo diverso de compostos orgânicos
56 produzidos pelos vegetais sendo comercialmente utilizados como produtos
57 farmacêuticos, agroquímicos, saborizantes, aditivos alimentares, fragrâncias e
58 biopesticidas (Verpoorte *et al.* 2002). Entretanto, a obtenção desses compostos via cultivo
59 convencional em quantidades suficientes para atender às demandas comerciais apresenta
60 desvantagens, tais como baixo rendimento e flutuações nas concentrações em razão de
61 variações geográficas, sazonais e ambientais (Lee *et al.* 2011). Tendo em vista este
62 cenário, a cultura de tecidos vegetais surge como uma alternativa na obtenção de
63 compostos bioativos (Karuppusamy, 2009). Assim, estudos têm sido desenvolvidos a fim
64 de aprimorar a síntese e/ou acúmulo de metabólitos em células e órgãos vegetais
65 cultivados *in vitro*, tais como a otimização de meios e ambiente de cultura e o uso de
66 estratégias de elicitação (Murthy *et al.* 2014). Uma alternativa é a utilização de formas
67 orgânicas de nitrogênio, como extrato de levedura, caseína hidrolisada e aminoácidos no
68 intuito de elevar o metabolismo celular em tecidos vegetais (Parast *et al.* 2011). A
69 utilização da glutamina como complementação de fontes de nitrogênio inorgânico ou
70 como única fonte deste elemento, aumentando a diferenciação e crescimento celular e
71 otimizando a produção de metabólitos *in vitro* (Parast *et al.*, 2011; Marquez-Martin *et al.*,
72 2012; Encina *et al.*, 2014). Porém, para cada espécie vegetal é necessário o
73 desenvolvimento de protocolos para a obtenção de metabólitos secundários *in vitro*.

74 Nesse contexto, a espécie arbórea *Garcinia brasiliensis* Mart. (Clusiaceae), uma
75 frutífera nativa da região amazônica, tem sido objeto de estudo devido às suas
76 propriedades farmacológicas (Martins *et al.* 2011).

77 Investigações fitoquímicas em extratos de frutos, sementes, folhas e raízes de Bacupari
78 têm resultado no isolamento de diferentes substâncias biologicamente ativas,
79 especialmente derivados fenólicos como os biflavonóides e benzofenonas polipreniladas
80 (Santa-Cecília *et al.* 2011; Derogis *et al.* 2008; Pereira *et al.* 2010). Visto que já houve o
81 estabelecimento *in vitro* de calos de *G. brasiliensis* a partir de explantes obtidos de
82 seguimentos da semente contendo a região do procâmbio (Santos Filho *et al.* 2014a),
83 objetivou-se neste trabalho, avaliar a influência da variação das fontes de suplementação
84 de nitrogênio na produção de metabólitos em calos de *G. brasiliensis*.

85

86 MATERIAL E MÉTODOS

87 Material vegetal e indução de calogênese

88 Frutos de Bacupari foram coletados no campus da Universidade Federal de Viçosa
89 (UFV), Viçosa-MG, Brasil. A identificação botânica foi realizada no Jardim Botânico da
90 UFV e uma exicata da espécie foi depositada sob código de registro VIC2604. Sementes
91 intactas foram desinfestadas com etanol (70 ° GL) por 4 min e hipoclorito de sódio (12500
92 ppm) por 15 min. Em seguida, foi feita uma tríplex lavagem em água destilada e
93 autoclavada. Os explantes (2 mm de espessura e 4 mm de diâmetro) foram obtidos de
94 seguimentos da semente como descrito por Santos Filho *et al.* (2014a) e inoculados em
95 frascos de cultura contendo 30 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) solidificado
96 com 0,7% de ágar e suplementado com sacarose (3%), BAP (6-Benzilaminopurina, 0,5
97 mg L⁻¹) e diferentes concentrações de sais que seguem: Meio MS com as concentrações
98 originais dos sais de nitrogênio (20 mM NH₄NO₃ e 18,8 mM KNO₃), meio MS com 10
99 mM NH₄NO₃ e 9,4 mM KNO₃ chamado ½ força (MS ½) e meio MS sem NH₄NO₃ e

100 KNO₃ contendo glutamina em concentrações finais de 5, 10, 30 e 60 mM. O pH de todos
101 os tratamentos foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e os níveis do íon K⁺ foram
102 corrigidos utilizando KCl. Os frascos com explantes foram mantidos a 25 ± 2 ° C no
103 escuro.

104 **Conteúdo total de aminoácidos e proteínas**

105 Amostras contendo 300 mg de calos (peso fresco) foram coletadas. Estas foram
106 maceradas em 3,0 mL de tampão de extração (0,1 M fosfato de potássio, pH 7,2) contendo
107 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP) e centrifugados a 20,800 g a 4 ° C por 30 min. O
108 sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 ° C (Lemos *et al.* 1999). As análises
109 bioquímicas foram feitas em intervalos de 20 dias seguindo a curva de crescimento
110 (Santos Filho *et al.* 2014a). O conteúdo total de aminoácidos e proteínas foi determinado
111 segundo Yemm e Cocking (1955) e Bradford (1976). Glutamina e Albumina de Soro
112 Bovino (BSA) foram utilizadas como respectivos padrões.

113 **Determinação do conteúdo total de fenólicos, flavonóides e proantocianidinas**

114 Amostras para a análise fitoquímica foram coletadas no 140 ° dia após a inoculação
115 durante o período de desaceleração da cultura de acordo com a curva de crescimento
116 anteriormente descrita por Santos Filho *et al.* (2014a). Para a preparação do extrato, 100
117 mg de calos, foram macerados em 3 mL de etanol PA. Em seguida, o material foi mantido
118 sob agitação a 120 rpm por 60 min a temperatura ambiente. As amostras foram então
119 centrifugadas a 14.000 rpm a 4 ° C por 30 min e o sobrenadante foi coletado. Esse
120 processo foi repetido por duas vezes e os sobrenadantes foram misturados. O solvente foi
121 evaporado e o precipitado foi ressuscitado em 5 mL de etanol PA. Os componentes
122 fenólicos totais foram determinados usando o método de Folin-Ciocalteau (Ainsworth e
123 Gillespie, 2007), os flavonóides totais foram determinados usando o método quelante de

124 alumínio (Ebrahimzadeh *et al.* 2008) e o conteúdo de proantocianidinas foi obtido após
125 despolimerização ácida para as antocianidinas correspondentes (Rösch *et al.* 2003).

126

127 ANÁLISE ESTATÍSTICA

128 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado constando de 6
129 tratamentos e 4 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de
130 variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de
131 significância.

132

133 RESULTADOS

134 Os calos oriundos dos explantes de Bacupari desenvolvidos em meios variando a
135 concentração e a fonte de nitrogênio apresentaram diferenças com relação ao
136 conteúdo/concentração de aminoácidos entre os tratamentos ao longo do período de
137 cultivo, sendo exceção as quantificações feitas no 20 ° e 100 ° dias de cultivo, quando
138 todos os tratamentos foram estatisticamente iguais (Tabela 1). Nos períodos de análise em
139 que houve diferença, o tratamento Gln60 sempre esteve entre os menores valores
140 observados. Cabe ressaltar que essas diferenças foram mais pronunciadas ao final do
141 cultivo no 140 ° dia. Por outro lado, com relação à concentração de proteínas houve
142 diferença estatística entre os tratamentos apenas no 140 ° dia de cultivo, sendo a maior
143 concentração observada no tratamento Gln60. Dessa forma, a menor concentração de
144 aminoácidos nesse tratamento ao final do cultivo pode estar relacionada, pelo menos em
145 parte a uma maior assimilação em proteínas.

146

147

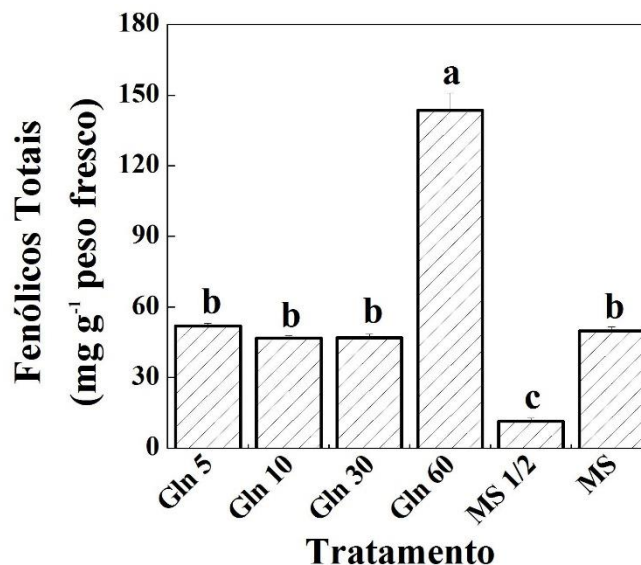
148 **Tabela 1.** Concentração de aminoácidos e proteínas em calos de *Garcinia brasiliensis*
 149 submetidos a tratamento com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio no meio de
 150 cultura. Gln5: Glutamina a 5mM; Gln10: Glutamina a 10mM; Gln30: Glutamina a
 151 30mM; Gln60: Glutamina a 60mM; MS: Meio MS com contendo a totalidade dos sais de
 152 nitrogênio; MS ½: Meio MS contendo metade da concentração dos sais de nitrogênio.

		Tratamentos						
		Tempo (Dias)	Gln5	Gln10	Gln30	Gln60	MS	MS ½
Aminoácidos ($\mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco)	20	27,27a	29,18 ^a	39,60a	13,56a	26,37 ^a	30,20a	
	40	126,62cd	214,69b	312,73a	66,27d	153,39bc	184,93b	
	60	192,40a	188,02a	242,45a	96,44b	120,89b	219,85a	
	80	132,41ab	126,25ab	150,61a	58,99c	138,43a	78,39bc	
	100	39,75 a	33,13a	36,42a	17,73a	28,98a	31,40a	
	120	115,38ab	143,29a	152,97a	61,80b	112,59ab	130,64a	
	140	148,43bcd	252,17a	189,69ab	83,55d	164,57bc	122,12cd	
Proteínas (mg g^{-1} peso fresco)	20	23,48a	25,65a	31,00a	25,07a	23,55a	26,03a	
	40	74,08a	64,51a	79,26a	76,74a	82,02a	56,38a	
	60	36,94a	33,16a	36,08a	29,57a	27,99a	27,58a	
	80	4,70a	3,82a	3,70a	3,36a	3,37a	3,11a	
	100	55,28a	46,42a	42,77a	52,82a	45,69a	36,69a	
	120	32,05a	36,73a	28,93a	23,56a	22,84a	21,61a	
	140	56,32cd	69,21bc	90,57b	122,60a	39,01d	67,13c	

153 Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos

154

155 Além de alterações no nível de aminoácidos e proteínas a variação da fonte de
 156 nitrogênio no meio de cultura resultou em algumas alterações no nível dos metabólitos
 157 secundários. A concentração de compostos fenólicos foi maior no tratamento Gln60 em
 158 contraposição ao tratamento MS que apresentou a menor concentração desses compostos.
 159 Os tratamentos Gln5, Gln10, Gln30 e MS^{1/2} foram estatisticamente iguais (Figura 1).



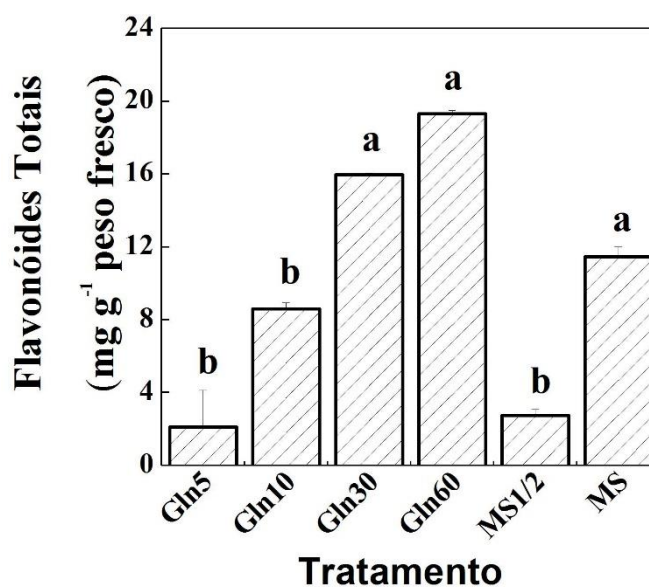
160

161 **Figura 1.** Concentração total de compostos fenólicos em calos de *Garcinia brasiliensis*.
 162 submetidos a tratamento com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio no meio de
 163 cultura. Gln5: Glutamina a 5mM; Gln10: Glutamina a 10mM; Gln30: Glutamina a
 164 30mM; Gln60: Glutamina a 60mM; MS: Meio MS com contendo a totalidade dos sais de
 165 nitrogênio; MS 1/2: Meio MS contendo metade da concentração dos sais de nitrogênio.
 166 Letras diferentes indicam diferença estatística.

167

168 Para o conteúdo de flavonóides, os maiores valores foram observados nos tratamentos

169 Gln30, Gln60 e MS^{1/2} e os menores no Gln5, Gln10 e MS (Figura 2).

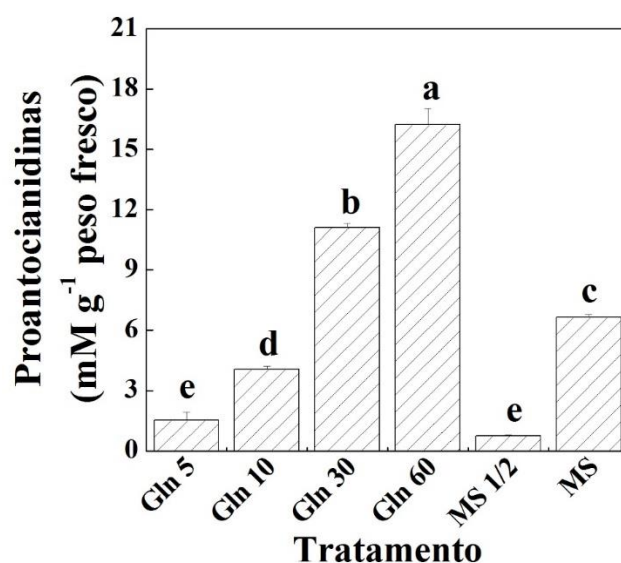


170

171 **Figura 2.** Concentração total de flavonóides em calos de *Garcinia brasiliensis*
 172 submetidos a tratamento com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio no meio de

173 cultura. Gln5: Glutamina a 5mM; Gln10: Glutamina a 10mM; Gln30: Glutamina a
 174 30mM; Gln60: Glutamina a 60mM; MS: Meio MS com contendo a totalidade dos sais de
 175 nitrogênio; MS ½: Meio MS contendo metade da concentração dos sais de nitrogênio.
 176 Letras diferentes indicam diferença estatística.
 177

178 Da mesma forma, para o conteúdo de proantocianidinas (Figura 3) foram observadas as
 179 maiores concentrações no tratamento Gln60 e as menores no Gln5 e MS, indicando assim
 180 que o tratamento com 60 mM de glutamina favorece a produção de metabólitos
 181 secundários nos calos de Bacupari.



182

183 **Figura 3.** Concentração de proantocianidinas em calos de *Garcinia Brasiliensis* em
 184 submetidos a tratamento com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio no meio de
 185 cultura. Gln5: Glutamina a 5mM; Gln10: Glutamina a 10mM; Gln30: Glutamina a
 186 30mM; Gln60: Glutamina a 60mM; MS: Meio MS com contendo a totalidade dos sais de
 187 nitrogênio; MS ½: Meio MS contendo metade da concentração dos sais de nitrogênio.
 188 Letras diferentes indicam diferença estatística.
 189

190 DISCUSSÃO

191 De maneira geral, o nitrogênio disponível para as plantas encontra-se na forma de
 192 íons amônio (NH₄⁺) e nitrato (NO₃⁻). Em menor nível, encontram-se as formas reduzidas
 193 de nitrogênio como os aminoácidos. No entanto, estas formas reduzidas de nitrogênio
 194 podem influenciar diretamente o desenvolvimento vegetal e mesmo resultar em aumento

195 de metabólitos em alguns tecidos (ou em explantes de algumas espécies cultivadas *in*
196 *vitro*) (Thornton, 2004; Fan *et al.* 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Santos Filho *et al.*, 2012)
197 por possuírem transportadores específicos e dentro da célula estarem mais biodisponíveis
198 ao metabolismo (Miller *et al.*, 2007). Nesse trabalho, nos períodos de análise onde houve
199 diferença estatística com relação ao conteúdo endógeno de aminoácidos, o tratamento
200 com 60 mM de glutamina apresentou as menores concentrações desses compostos em
201 comparação aos demais tratamentos. Porém, o conteúdo de proteínas foi semelhante entre
202 todos os tratamentos ao longo do cultivo havendo diferença estatística apenas no 140 °
203 dia. Além disso, a maior a concentração de proteínas nesse período foi verificada no
204 tratamento com 60 mM de glutamina, demonstrando que os níveis de aminoácidos nesse
205 tratamento foram menores, pelo menos em parte, devido à maior assimilação em
206 proteínas. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos por Zouine e El-Hadrami
207 (2007) que verificaram que a aplicação exógena de glutamina promoveu aumento na
208 síntese de proteínas em células embriogênicas de *Phoenix dactylifera* L. Ainda, Hamasaki
209 *et al.* (2005) verificaram que houve assimilação da glutamina em cultivos de calos de
210 abacaxi (*Ananas comosus* L.) melhorando o processo de organogênese de folhas e
211 aumentando as concentrações hormonais. A glutamina também foi eficiente na
212 regeneração de raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Asad *et al.* 2009).

213 Além de promover o acúmulo de proteínas ao final do cultivo, o tratamento com
214 60 mM de glutamina causou aumento na concentração de compostos fenólicos e de
215 flavonóides nos calos. Compostos fenólicos, incluindo os flavonóides são antioxidantes
216 naturais e estão amplamente distribuídos nas diferentes partes dos vegetais, como flores,
217 frutos, casca, folhas e sementes (Balasundram *et al.*, 2006, Santos Filho *et al.* 2014b).
218 Nesse contexto, a espécie *G. brasiliensis* têm sido amplamente estudada como fonte de

219 compostos bioativos tais como fenólicos e flavonóides. Ressalta-se que Santa-Cecília *et*
220 *al.* (2011) e Gontijo *et al.* (2012) identificaram os derivados fenólicos Gutiferona-A, 7-
221 epiclusianona e os bi-flavonóides morelofalavona (fukugetina), moreloflavona-7''O-β-D-
222 glicosil (fukugesida) e moreloflavona-4''O-β-D-glicosil em extratos de frutos e folhas de
223 *G. brasiliensis*. Esses autores avaliaram ainda as atividades antioxidante, antinociceptiva
224 e anti-inflamatória dos extratos e compostos isolados demonstrando o potencial
225 farmacológico destas substâncias. Assim como para fenólicos e flavonóides, a maior
226 concentração de proantocianidinas ocorreu ao final do cultivo (140 dias) no tratamento
227 que utilizou 60 mM de glutamina. Proantocianidinas são taninos condensados
228 sintetizados na via biossintética dos flavonóides compostos por subunidades de flavan-3-
229 óis (Dixon, 2005). Do mesmo modo que os demais fenólicos, as proantocianidinas são
230 consideradas importantes antioxidantes por serem bons agentes redutores e mais
231 recentemente têm sido investigadas por possuírem atividade antityrosinase.
232 Recentemente, Santos Filho *et al.* (2014a) relataram a presença de fenólicos, flavonóides
233 e identificaram a fukugetina, gutiferona-A e 7-epiclusianona em calos obtidos de
234 sementes de *G. brasiliensis*, contudo a ocorrência desses compostos nos calos foi menor
235 que no explante inicial. Porém, esses autores comentam que é comum a maior presença
236 de metabólitos secundários no explante que ainda tem seus tecidos diferenciados, o que
237 favorece o metabolismo secundário (Santos Filho *et al.* 2014a; Nicioli *et al.* 2010). Nesse
238 contexto, a glutamina pode agir tanto como precursor quanto como elicitador do
239 metabolismo secundário (Matkowski, 2008). Como precursor, pode promover a síntese
240 de aminoácidos aromáticos, liberando um grupo amina (NH₃) para formar a fenilalanina
241 e o triptofano. A fenilalanina age como um intermediário na biossíntese da maioria dos
242 compostos fenólicos, como as flavonas, isoflavonas e os flavonóis (Pina *et al.*, 2008, Tzin

243 e Galili, 2010;). Nesse trabalho, é possível que parte da glutamina absorvida tenha sido
244 desviada para rota de biossíntese de metabólitos secundários contribuindo, em parte, para
245 os níveis diminuídos de aminoácidos no tratamento com 60 mM de glutamina.
246 Luczkiewicz e Cisowski (2001) e Edahiro *et al.* (2005), observaram aumento na síntese
247 de antocianinas em cultura de células de rúcula e morango em resposta a adição de
248 naringenina (flavona) e fenilalanina. Em calos de *Psolareacoryfolia*, houve aumento na
249 produção do composto psolarem (Parast *et al.* 2011) em resposta à elicitação com
250 glutamina.

251 As menores concentrações de metabólitos secundários foram observadas no
252 tratamento que usou a concentração original de nitrogênio do meio MS e esses níveis
253 foram maiores quando a concentração de nitrato e amônia no meio MS foi reduzida pela
254 metade. De fato Praveen e Murthy (2011; 2013) já mostraram que mudanças na relação
255 nitrato/amônia ou a diminuição do nitrogênio total influencia a produção de metabólitos.
256 Nesse sentido, Jones e Hartley (1999) propuseram o Modelo de Competição Protéica
257 (*Protein competition model*, PCM) que aborda uma competição entre as vias
258 biossintéticas de proteínas e compostos fenólicos em resposta a concentração de
259 nitrogênio de tal maneira que altas concentrações de nitrogênio regulam positivamente a
260 síntese protéica e negativamente a biossíntese de compostos fenólicos. Uma possível
261 explicação para esse fenômeno está relacionada à sinalização do nitrato. A privação de
262 nitrogênio causa ativação de genes relacionados ao metabolismo secundário enquanto a
263 adição de nitrato ativa genes relacionados à síntese protéica e de aminoácidos exceto da
264 fenilalanina (Scheible *et al.* 2004). Sabe-se que a maioria dos compostos fenólicos são
265 derivados desse aminoácido em uma reação catalisada pela fenilalanina amônia liase

266 (PAL, EC 4.3.1.5) e a diminuição dos níveis desses aminoácidos seria coerente com a
267 inibição da via do chiquimato.

268 Portanto, é possível que o aumento na síntese de compostos fenólicos observado
269 nesse trabalho em resposta à glutamina esteja relacionado à substituição do nitrato por
270 uma forma de nitrogênio já reduzida e mais biodisponível. Isso se reflete nos níveis de
271 metabólitos e também de proteínas. Além disso, o aumento da produção de metabólitos
272 no tratamento MS^{1/2} corrobora a hipótese do efeito repressor do nitrato sobre o
273 metabolismo secundário.

274

275 **CONCLUSÕES**

276

277 Conclui-se que o emprego de glutamina a 60 mM em substituição às fontes
278 nitrogenadas do meio MS favoreceu o acúmulo de proteínas e síntese de metabólitos
279 secundários nos calos de Bacupari.

280

281 **AGRADECIMENTOS**

282 À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG (APQ- 01671-
283 09) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, (AUX
284 PE–PNPD-2297.2011).

285

286 **BIBLIOGRAFIA**

287

288 Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other
289 oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2:
290 875-877.

291

- 292 Asad, S.; Arshad, M.; Mansoor, S.; Zafar, Y. 2009. Effect of various amino acids on shoot
293 regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *African Journal of Biotechnology*,
294 8: 1214-1218.
295
- 296 Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and
297 agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food*
298 *Chemistry*, 99: 191-203.
299
- 300 Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram
301 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*
302 *Biochemistry*, 72: 248-254.
303
- 304 Derogis, P.B.C.; Martins, F.T.; Souza, T.C.; Moreira, M.E.C.; Souza Filho, J.D.;
305 Doriguetto, A.C.; De Souza, K.R.; Veloso, M.P.; Dos Santos, M.H. 2008. Complete
306 assignment of the ¹H and ¹³CNMR spectra of Garciniaphenone and keto-enol
307 equilibrium statements for prenylated benzophenones. *Magnetic Resonance in*
308 *Chemistry*. 46: 278-282.
309
- 310 Dixon, R.A.; Xie, D.Y.; Sharma, S.B. 2005. Proanthocyanidins-A final frontier in
311 flavonoid research? *New Phytologist*, 165: 9-28.
312
- 313 Ebrahimzadeh, M. A.; Pourmorad, F.; Bekhradnia, A. R. 2008. Iron chelating activity,
314 phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of*
315 *Biotechnology*, 7: 3188-3192.
316
- 317 Edahiro, J. I.; Nakamura, M.; Seki, M.; Furusaki, S. Enhanced accumulation of
318 anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the
319 medium. *Journal Bioscience Bioengineering*, 99: 43-472005.
320
- 321 Encina, C.L.; Parisi, A.; O'Brien, C.; Mitter, N. 2014. Enhancing somatic embryogenesis
322 in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including
323 glutamine in the culture medium. *Scientia Horticulturae*, 165: 44-50.

324

325 Fan, X.; Gordon-Weeks, R.; Shen, Q.; Miller, A.J. 2006. Glutamine transport and
326 feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in
327 cytosolic nitrate pools. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1333-1340.

328

329 Gontijo, V.S.; Rosa, I.A.; Soares, M.G.; Silva, M.A.; Júnior, C.V.; Dos Santos, M. H.
330 2012. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the
331 *Garcinia brasiliensis* epicarp. *Food Chemistry*, 132: 1230-1235.

332

333 Hamasaki, R.M.; Purgatto, E.; Mercier, H. 2005. Glutamine enhances competence for
334 organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. *Brazilian Journal of Plant*
335 *Physiology*, 4: 383-389.

336

337 Jones, C.G., Hartley, S.E. 1999. A protein competition model of phenolic allocation.
338 *Oikos*, 86: 27-44.

339

340 Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from
341 higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants*
342 *Research*, 3: 1222-1239.

343

344 Lemos, G.B.; Delú Filho, N.; Oliveira, L.E.M.; Purcino, A.A.C. 1999. Atividade das
345 enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com
346 diferentes relações de nitrato e amônio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11: 113-
347 118.

348

349 Luczkiewicz, M, Cisowski, W. 2001. Optimisation of the second phase of a two phase
350 growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*. *Plant*
351 *cell, Tissue and Organ Culture* 65(1):57-68.

352

353 Lee Y, Lee De.; Lee, H.S.; Kim, S.K.; Lee, V.S.; Kim, S.H.; Kim, M.W. 2011. Influence
354 of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious

- 355 roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*,
356 105: 9–19.
- 357
- 358 Marquez-Martin, B.; Barcelo-Munõz, A.; Pliego-Alfaro, F.; Sanchez-Romero, C. 2012.
359 Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea Americana* Mill.):
360 influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*,
361 21: 180-188.
- 362
- 363 Martins, F.T.; Santos, M.H.; Coelho, C.P.; Barbosa, L.C.A.; Dias, G.C.; Fracca, M.P.;
364 Neves, P.P.; Stringheta, P.C.; Doriguetto, A.C. 2011. A powder X-ray diffraction method
365 for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC
366 for quantitative analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54: 451-
367 457.
- 368
- 369 Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review.
370 *Biotechnology Advances*, 26: 548–560.
- 371
- 372 Miller, A.J. Fan, X.; Shen, Q.; Smith, S.J. 2007. Amino acids and nitrate as signals for
373 the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*, 59: 111-119.
- 374
- 375 Murashige, T, Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with
376 tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15: 473-479.
- 377
- 378 Murthy, H.N.; Lee, E.-J.; Paek, K.-Y. 2014. Production of secondary metabolites from
379 cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and
380 metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118: 1-16.
- 381
- 382 Nicioli, P.M.; Paiva, R.; Castro, A.H.F.; Herrera, R.C.; Nogueira, G.F., Emrich, E.B.
383 2010. Induction and Phytochemical Analyses in *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)
384 Coville Calli. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5: 159-162.
- 385

- 386 Oliveira, H.C.; Justino, G.C.; Sodek, L.; Salgado, I. 2009 Amino acid recovery does not
387 prevent susceptibility to *Pseudomonas syringae* in nitrate reductase double-deficient
388 *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Science*, 176: 105-111.
- 389
- 390 Parast, B.M.; Chetri, S.K.; Sharma, K.; Agrawal, V. 2011. *In vitro* isolation, elicitation of
391 psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene.
392 *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1138-1146.
- 393
- 394 Pereira, I.O.; Marques, M.J.; Pavan, A.L.R.; Codonho, B.S.; Barbiéri, C.L.; Beijo, L.A.;
395 Doriguetto, A.C.; D’Martin, E.C.; Dos Santos, M.H. 2010. Leishmanicidal activity of
396 benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. *Phytomedicine*, 17:
397 339-345.
- 398
- 399 Pina A., Errea, P. 2008. Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene
400 expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus spp.* *Journal of Plant*
401 *Physiology*, 165: 705-714.
- 402
- 403 Praveen, N. Murthy, H.N., A. 2013. Withanolide A production from *Withania somnifera*
404 hairy root cultures with improved growth by altering the concentrations of macro elements
405 and nitrogen source in the medium. *Acta Physiology Plantarum*, 35: 811-816.
- 406
- 407 Praveen, N.; Murthy, H.M.; Chung, I.M. 2011. Improvement of growth and gymnemic
408 acid production by altering the macro elements concentration and nitrogen source supply
409 in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre*. *Industrial Crops and Products*, 33:282-
410 286.
- 411
- 412 Rosch, D.; Bergmann, M.; Knorr, D.; Kroh, L.W. 2003. Structure antioxidant efficiency
413 relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of
414 sea buckthorn juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:4233-4239.
- 415
- 416 Santa-Cecília, F.V.; Freitas, L.A.S; Vilela, F.C.; Veloso, CC.; Rocha, C.Q.; Moreira,
417 M.E.C; Dias, D.F.; Giusti-Paiva, A.; Dos Santos, M.H. 2011. Antinociceptive and anti-

- 418 inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia*
419 *brasiliensis*. *European Journal of Pharmacology*, 670: 280-285.
- 420
- 421 Santos-Filho, P.R.; Vitor, S.C.; Frungillo, L.; Saviani, E.E.; Oliveira, H.C.; Salgado, I.
422 2012. Nitrate reductase-and nitric oxide-dependent activation of sinapoylglucose:malate
423 sinapoyltransferase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 53:
424 1607-1616.
- 425
- 426 Santos-Filho, P.R.; Santos, B.R.; Barbosa, S.; Vieira, L.R.; Freitas, N.C.; Dias, D.F.;
427 Santos, M.H. 2014. Growth curve, biochemical profile and phytochemical analyses in
428 calli obtained from the procambium segments of Bacupari. *Brazilian Archives of Biology*
429 *and Technology*, 57: 326-333.
- 430
- 431 Santos-Filho, P.R.; Saviani, E.E.; Salgado, I.; Oliveira, H.C. 2014. The effect of nitrate
432 assimilation deficiency on the carbon and nitrogen status of *Arabidopsis thaliana* plants.
433 *Amino Acids*, 46:1121-129.
- 434
- 435 Sheible, W.R.; Morcuende, R.; Czechowski, T.; Fritz, C.; Osuna, D.; Palacios-Rojas, N.;
436 Chindelash, D.; Thimm, O.; Udvardi, M.K.; Stitt, M. 2004. Genome-wide reprogramming
437 of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and
438 the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 136:
439 2483-2499.
- 440
- 441 Thornton, B. 2004. Inhibition of nitrate influx by glutamine in *Lolium perenne* depends
442 upon the contribution of the HATs to the total influx. *Journal of Experimental Botany*,
443 55: 761-769.
- 444
- 445 Tzin, V.; Galili, G. 2010. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids
446 Biosynthesis Pathways in Plants. *Molecular Plant*, 3: 956-972.
- 447
- 448 Verpoorte, R.; Contin, A.; Memelink, J. Biotechnology for the production of plant
449 secondary metabolites. 2002. *Phytochemistry Reviews*, 1: 13-25.

450

451 Yemm, E.W.; Cocking, E.C. 1955. The determination of aminoacids with ninhydrin.

452 *Analyst*, 80: 209-213.

453

454 Zouine, J.; El-Hadrami, I. 2007. Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic

455 suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientific Horticulture*, 112:

456 221-226.

457