

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PRODUÇÃO DE VALEPOTRIATOS EM CULTURAS LÍQUIDAS DE
PLANTAS DE *Valeriana glechomifolia* Meyer (VALERIANACEAE)**

DENISE RUSSOWSKI

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como quesito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: **Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto**

Co-Orientadora: **Prof^ª Dr^ª Sandra Beatriz Rech**

Porto Alegre, Março de 2007.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O desenvolvimento deste projeto ocorreu nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica e Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul– UFRGS
- Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Produção de Matéria-Prima – Faculdade de Farmácia – UFRGS
- Central Analítica da Faculdade de Farmácia – UFRGS

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) foi responsável pela concessão de bolsa, sendo o apoio financeiro fornecido pelo Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Grant pesquisador ao orientador.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Arthur G. Fett-Neto que me transformou, não geneticamente, mas em um profissional seguramente melhor. Sua orientação irretocável dispensa quaisquer outros comentários.

À co-orientadora Prof^a. Sandra B. Rech pela valiosa ajuda na confecção das amostras para o HPLC, cedência de suas bolsistas e, principalmente, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos membros da banca examinadora, os Profs. Grace Gosmann, Jenifer Saffi e Fernando T. Nicoloso, pelo aceite, disponibilidade e paciência no processo de avaliação da Tese. Será sempre um prazer trocar sugestões e informações.

Ao Órgão Financiador CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), que acreditaram em mim.

Aos membros da minha Comissão de Acompanhamento, Célia Carlini e Fabiana Horn, pela cooperação sublime.

Aos Profs. Paulo Mayorga e Pedro Petrovick, pelo empréstimo do HPLC, receptividade e amizade inigualáveis e aos Profs. Janette P. Fett, Marilene Vainstein, Augusto Schrank e Irene Schrank, pelos ensinamentos e camaradagem.

À Prof^a. Gilsane von Poser, que tudo sabe sobre valerianas; ao Prof. Geraldo, que tudo sabe sobre flavonóides, pelas sugestões e disponibilidade.

Aos secretários do PPGBCM Sílvia, Luciano e Grasiela, pela imensa disponibilidade, simpatia e amizade.

Aos colegas do Lab. de Fisiologia Vegetal: Kéke, Joséli, Cláudia, Vívian, Tatiana, Juçara, Caroles, Márcia, Naíla, Palomita, Vari, Cris, Martinha, Dioooogoooo, Ricardo (o Richard), Rafael (*in memorian*), Raul, Filipa, Dani, Denilson, Júlio, Guilherme (o Cabelo), Luciano (Luluzes) e Camilo (o pupilo), que, por serem muitos e de igual importância, fica impossível discriminá-los. Eles são responsáveis pelo convívio sadio durante esse longo período e isso não tem preço.

Às colegas do lab. da Prof^a. Sandra (Fac. de Farmácia): Daniela, Kristiane, Giovana, Mariana, Jéssica e Luizinha, que me deram todo o auxílio necessário em muitos experimentos

e em especial, à Natasha que me ajudou arduamente em meus experimentos e análises no HPLC durante todos esses anos. À Carina, Luíza e Andréia, pelas informações e dicas que muito me ajudaram.

Às colegas dos labs. das Prof^{as}. Grace Gosmann e Gilsane von Poser (Fac. de Farmácia): Juli e Si, pela amizade à qualquer prova e Paulinha, Carol e Ju, pelos empréstimos de material, equipamentos e preciosas trocas de conhecimento.

Aos colegas do LDG (Fac. de Farmácia): Francilene, Greice e Gizele, e, em especial, ao Cabral e Ana Paula, pela paciência e camaradagem com que me trataram durante os anos de uso do liofilizador, espectrofotômetro e HPLC e valiosas trocas de informações.

Aos colegas e técnicos do Lab. de Farmacognosia (Fac. de Farmácia): Marina, Júlio, Ana Aboy e Miriam pelo empréstimo de materiais e equipamentos; aos do Lab. da Central Analítica, Maribete, Fabiana e Mariana, pelo auxílio dado no HPLC e liofilizador e ao técnico Marquinhos do Lab. de Controle de Qualidade e às colegas Lali e Sheila, pelo empréstimo dos vials e equipamentos. À Prof^a. Vera Lima, pela simpatia, camaradagem e empréstimo de equipamentos.

Ao Dr. Gilberto Schwartzmann e sua técnica Kátia, da SOAD, pelo suporte técnico no projeto de Exame de Qualificação e em especial, aos Profs. Grace Gosmann, Jenifer Saffi e Giancarlo Pasquali, pelas valiosas sugestões dadas para o mesmo.

Aos funcionários D. Judite, quase "sempre" a postos e D. Zelma, que me salvavam nas horas do "apêrto" e Jackson e Seu Otello, pelos momentos de descontração.

Aos guardas Carla, Maria, Paulo e Renato da Faculdade de Farmácia e Jaque e Marcelo, do BIOTEC, pela segurança competente durante os dias ou noites intermináveis.

E, por fim, mas não menos importantes, agradeço ao meu marido Marcelo que, apesar da distância, soube se fazer sempre presente em meu pensamento durante esse período difícil; à minha mãe Irene, que literalmente me segurou no colo quando mais precisava que eu a segurasse; ao meu pai David (*in memoriam*), que me despertou o gosto pelas ciências da vida; ao meu irmão Dennis e sua esposa Adriana (a Adri), pela ajuda e sugestões em alguns experimentos e pelo ambiente familiar e de descontração que sempre me proporcionaram para que eu pudesse seguir em frente.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	7
Resumo.....	9
Abstract.....	10
Capítulo I – Introdução Geral – Revisão Bibliográfica.....	11
I.1. <i>Valeriana glechomifolia</i> Meyer – Aspectos Botânicos e Sistemáticos:.....	11
I.2. Perfil Fitoquímico da Família Valerianaceae.....	12
I.2.1. Valepotriatos: Estruturas e Propriedades Químicas, Isolamento e Quantifi- cação.....	14
I.2.2. Valepotriatos: Biossíntese.....	17
I.2.2.1. A Enzima HMGR e a Rota Citosólica.....	24
I.2.2.2. A Enzima DxPS e a Rota Plastídica.....	28
I.2.2.3. Biossíntese e Armazenamento de Iridóides e Outros Monoterpenos.....	35
I.2.3. Valepotriatos: Efeitos Farmacológicos	41
I.2.3.1. Efeito Sedativo Moderado Sobre o SNC.....	41
I.2.3.2. Efeito Citotóxico.....	45
I.2.3.3. Outros Efeitos Farmacológicos.....	46
I.2.4. Compostos Fenólicos: Biossíntese e Efeitos Farmacológicos.....	46
I.3. Produção de Metabólitos de Interesse <i>In vitro</i>	54
Objetivo e Hipóteses.....	65
Capítulo II – Role of Light and Medium Composition on Growth and Valepotriate Contents in <i>Valeriana glechomifolia</i> Whole Plant Liquid Cultures – Trabalho Publicado no Periódico Plant Cell, Tissue and Organ Culture.....	67
Capítulo III – Ultrasound and defense signalling molecules elicit valepotriates production in whole-plant liquid cultures of <i>Valeriana glechomifolia</i> – Trabalho a ser submetido para publicação.....	75
Capítulo IV – Considerações Finais e Perspectivas.....	104

Apêndices.....	106
Apêndice I – Sinopse dos Gêneros Produtores de Valepotriatos Descritos para Família Valerianaceae.....	106
Apêndice II – Lista de Valepotriatos Identificados e Publicados em Espécies da Família Valerianaceae.....	107
Apêndice III – Composição Química Adicional aos Valepotriatos do Gênero Valeriana (Valerianaceae).....	108
Apêndice IV – Representação Esquemática da Biossíntese de Isoprenóides Produzidos na Rota Plastídica e Citossólica.....	110
Apêndice V – Relação de Espécies Caracterizadas Geneticamente que Apresentam a Rota da DXP, suas Enzimas e Inibidores.....	112
Apêndice VI – Comparação de Genes Expressos em Ambas Rotas de Biossíntese de Isoprenóides.....	113
Apêndice VII – Relação de Espécies em que a Enzima DXP Tem Sido Encontrada.....	114
Apêndice VIII – Relação de Proteínas que Participam da Rota MVA-independente em <i>A. thaliana</i>	115
Apêndice IX – Rotas de Biossíntese de Iridóides.....	116
Apêndice X – Composição dos Meios MS e B5.....	117
Apêndice XI – Espécies da Família Valerianaceae Micropropagadas e Cultivadas em Meio MS e Produção de Valepotriatos.....	118
Referências Bibliográficas.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico - Fitormônio
ACE	Acevaltrato/Acevaltrate
AIB	Ácido Indolbutírico – Auxina – Fitormônio
AJ	Ácido Jasmônico
ANA	Ácido Naftaleno Acético – Auxina – Fitormônio
AS	Ácido Salicílico
B5	Meio de Cultivo Gamborg B5
BAP	Benzilamino Purina – Citocinina – Fitormônio
C	Carbono
¹³C	Átomo de Carbono Isótopo do ¹² C
CLAE	Cromatografia de Alta Eficiência
CNS	Central Nervous System
Cu	Cobre
DAHPS	Desóxi-arabino-heptulosonato-fosfato Sintase/Deoxy-arabino-heptulosonate-phosphate Synthase
DID	Didrovaltrato/Didrovaltrate
DMAPP	Di-metil-alil di-fosfato/Dimethylallyl diphosphate
DW	Dry Weight
DxP	1-Desóxi-D-xilulose 5-fosfato / 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate
DxPR	1-Desóxi-D-xilulose 5-fosfato Redutase (Redutoisomerase)/ 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase
DxPS	1-Desoxi-D-xilulose-5-fosfato Sintase/1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
FOSM	Fosmidomicina/Fosmidomycin
FW	Fresh Weight
GABA	Ácido γ -aminobutírico

GAP	Gliceraldeído Trifosfato/Glyceraldeide Tri-Phosphate
GI	Growth Index
HMGR	3-Hidróxi-3-metil-glutaril Co-Enzima A Redutase/3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl Co-Enzyme A Reductase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMF	Índice de Massa Fresca = Índice de Crescimento
IPP	Isopentenil Pirofosfato/Isopentenyl Pyrophosphate or isopentenyl diphosphate
JA	Jasmonic Acid
KIN	Cinetina – Citocinina - Fitormônio
MAO	Monoaminaoxidase/Monoamineoxidase
MEP	2-c-metil-D-eritriol-4-fosfato
MEV	Mevinolina/Mevinolin
MVA	Mevalonato/Mevalonate
MF	Massa Fresca
MS	Meio de Cultivo Murashige e Skoog
ms	Massa Seca
N	Nitrogênio
PIRUV	Piruvato/Pyruvate
PAL	Fenilalanina Amônia Liase/ Phenylalanine Ammonia Lyase
·OH	Radicais Hidroxilas
ROS	Reactive Oxygen Species
SA	Salicylic Acid
SAR	Systemic Acquired Resistance
SEMA	Secretaria do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul
SNC	Sistema Nervoso Central
US	Ultrassom/Ultrasound
UV	Ultravioleta
VAL	Valtrato/Valtrate

RESUMO

Valeriana glechomifolia, espécie endêmica do Sul do Brasil, produz valepotriatos nas partes aéreas e raízes, os quais também ocorrem em rizomas da espécie européia *Valeriana officinalis*, usada na fabricação de fitoterápicos. Esses metabólitos monoterpênicos estão presumivelmente envolvidos em ação sedativa suave sobre o sistema nervoso central (SNC), bem como apresentam propriedades citotóxicas e antimicóticas. Para melhor compreender o perfil do acúmulo destes metabólitos e a regulação de sua biossíntese, um sistema de cultivo de plantas inteiras de *V. glechomifolia* em meio líquido foi desenvolvido, e o conteúdo de valepotriatos nestas plantas submetidas a diferentes fatores, tais como presença ou ausência de luz, estresse mecânico (ultrassom – US) e exposição a moléculas sinalizadoras de respostas de defesa como ácido salicílico (AS) e jasmônico (AJ) foi analisado por CLAE. Também foi avaliado o conteúdo de fenóis totais por espectrofotometria, pois recentemente foi descoberta uma possível atividade destes compostos extraídos de raízes de *Valeriana officinalis* sobre o SNC. Foi observado que o conteúdo de valepotriatos não foi alterado na ausência de luz, enquanto o número de raízes aumentou significativamente. Os demais fatores testados (AS, US e AJ) induziram apenas o acúmulo de valepotriatos, de modo que as vias de biossíntese de valepotriatos e compostos fenólicos parecem ser reguladas de modo independente neste sistema. Ensaio com inibidores específicos das vias de biossíntese plastídica e citossólica da unidade do esqueleto terpênico (isopentenil-pirofosfato - IPP), conduzidos sob condições de elicitación, mostraram reduções similares no conteúdo de valepotriatos, revelando que ambas rotas parecem participar de forma cooperativa e aproximadamente equânime na biossíntese de valepotriatos.

ABSTRACT

Valeriana glechomifolia, an endemic species of southern Brazil, accumulates valepotriates in both shoots and roots. These metabolites are also present in the European species *Valeriana officinalis*, used in the production of phytomedicines. These monoterpene metabolites have a putative mild sedative effect on the central nervous system (CNS), and display cytotoxic and antifungal activities. In order to better understand the accumulation profile and the regulation of biosynthesis of these metabolites, a liquid culture system for whole-plants of *V. glechomifolia* was established, and the content of valepotriates in plants submitted to different factors, such as presence or absence of light, mechanical stress (ultrasound – US), and exposure to signaling molecules of defense responses, such as salicylic (SA) and jasmonic acid (JA), was analyzed by HPLC. The content of total phenolics was also evaluated spectrophotometrically since the involvement of flavonoids from roots of *V. officinalis* in the CNS effects was recently described. The results showed that the content of valepotriates was not altered in the absence of light, whereas the number of roots increased significantly. The various other factors investigated caused increases only in valepotriate contents, indicating that valepotriate and phenolic biosynthesis seem to be independently regulated in this system. Assays with specific inhibitors of the plastidic and cytosolic biosynthetic pathways leading to the terpene carbon skeleton unit (isopentenyl pyrophosphate - IPP), carried out under eliciting conditions, yielded similar reductions in the valepotriate content, suggesting that both routes participate in cooperative and approximately equivalent fashion on valepotriate biosynthesis.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1. *Valeriana glechomifolia* Meyer – Aspectos Botânicos e Sistemáticos:

Valeriana glechomifolia Meyer conhecida como valeriana (Fig.1), pertence à família Valerianaceae, a qual compreende 9 a 13 gêneros, totalizando 300 a 400 espécies (Cronquist, 1981; Bos et al., 2002). Tais incertezas numéricas se devem aos tratamentos taxonômicos dados às espécies sul americanas (Backlund & Moritz, 1998). O gênero *Valeriana* encerra cerca de 230 espécies (Bos et al., 2002). Uma sinopse dos gêneros descritos para esta família que contêm valepotriatos pode ser encontrada no Apêndice I.



Figura 1 – Aspecto geral de *V.glechomifolia* Meyer. Diâmetro das folhas 0,5-1,0 cm.

Esta família está disseminada pela Europa, Ásia e América (Eriksen, 1989; Bos et al., 2002). Das espécies americanas, a maioria encontra-se na América do Sul (Larsen, 1986). Atualmente, 17 espécies do gênero *Valeriana* são conhecidas no Brasil, sendo 12 delas nativas

do Rio Grande do Sul, incluindo *V. glechomifolia* Meyer, que é endêmica nesta região (SEMA, 2002; Sobral, 1999a; Sobral, 1999b; Sobral, 1999c). Este gênero é o único desta família presente no Brasil (Müller, 1885) e, desde 2002, *V. glechomifolia* Meyer vem pontuando a lista de espécies vegetais ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul, em decorrência da exploração predatória, de acordo com a Secretaria do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul (SEMA, 2002).

Preferencialmente, o gênero *Valeriana* se desenvolve em regiões de clima temperado, com condições edafológicas pobres, típicas de campos rochosos (Sobral, 1999a; Sobral, 1999b; Sobral, 1999c). Morfologicamente, a família é pouco homogênea, constituindo-se de ervas perenes, cujas raízes têm sido relatadas como sendo fortemente “aromáticas”. O odor é característico e usado para identificação da família (Cronquist, 1981; Backlund & Moritz, 1998).

Segundo Sobral (1999a), a descrição botânica do gênero *Valeriana* no Brasil obedece as mesmas descrições de Linnaeus: caule de porte herbáceo ou arbustivo; folhas opostas de simples e inteiras à pinatífidas ou pinatissectas, sem estípulas; inflorescências paniculadas e reduzidas em *V. glechomifolia* Meyer, com ramificações secundárias paniculiformes. As flores são monoclinicas ou unissexuadas, epigíneas; cálice pentâmero; corola simpétala, regular campanulada, pentalobada, tri-estaminada com estames soldados à corola e com anteras ditecas; estaminódios eventualmente presentes nas flores pistiladas; ovário ínfero, unilocular com estilete, com três estigmas e tricarpelados, mas apenas com um carpelo fértil e um óvulo anátropo. O fruto é seco do tipo arquênio, geralmente tríquetra e, às vezes, biconvexo. Sistema radicular do tipo fasciculado, com raízes pequenas em *V. glechomifolia* Meyer (Cronquist, 1981; Larsen, 1986; Eriksen, 1989).

I.2. Perfil Fitoquímico da Família Valerianaceae

A Química e Farmacêutica Nikkho do Brasil Ltda. é responsável pela produção de Valeriane®, principal fitoterápico comercializado no Brasil para esses fins, à base de extratos secos de raízes de *V. officinalis* L., que contém ácidos valerênicos e seus ésteres (sesquiterpenos) e valepotriatos (iridóides monoterpênicos) padronizados e estabilizados. Tal

matéria-prima utilizada na produção de fármacos à base de valepotriatos é 100% importada da Europa (Informações Técnicas Química e Farmacêutica Nikkho do Brasil Ltda, 2002; Genaro, 1999). *Valeriana wallichii* DC. também era utilizada para os mesmos fins fito-farmacológicos (Becker, et al., 1983; Houghton, 1988; Hobbs, 1989; Korolkovas, 1999).

A família Valerianaceae, se caracteriza pela presença desses ácidos valerênicos e correlatos além da presença de óleos voláteis e vários outros ácidos carboxílicos (Backlund e Moritz, 1998). Óleos voláteis e sesquiterpenos, considerados como produtos de degradação do ácido isovalérico, são os responsáveis pelo forte odor que caracteriza os membros desta família (Cronquist, 1981; Bos et al., 1998b; Backlund e Moritz, 1998). Triterpenos e saponinas triterpenóides (Sampaio et al., 1993), alcalóides (Torsell e Wahlberg, 1967; Johnson e Walter, 1971; Houghton, 1988; Pande & Shukla, 1995) e esteróis (Backlund & Moritz, 1998), também são encontrados em concentrações significativas. Através da via do chiquimato, espécies de *Valeriana* acumulam ácidos cinâmicos simples, flavonóides, lignanas, cumarinas e polifenóis. Todos esses compostos se apresentam em proporções e concentrações muito variáveis intra e interespecificamente, tornando esta família altamente heterogênea em termos de constituintes químicos, acarretando uma infinidade de usos medicinais e cosméticos. Tal variabilidade é decorrente do estabelecimento geográfico. Uma mesma espécie que ocorra na Europa Central e na região mediterrânea apresenta composição química dos metabólitos em concentrações e proporções diferentes, podendo ser usada para ornamentação e alimentação por uma população e medicinal e cosmética para outra (Backlund & Moritz, 1998). Dentre os flavonóides, foram encontrados quercetina, diosmetina, luteolina, apigenina, acacetina e canferol nas partes aéreas em inúmeras espécies de *Valeriana* (Silva, 2001) e 6-metil-apigenina, hesperidina (Wasowski et al., 2002; Marder et al., 2003) e linarina (Fernández et al., 2004) em *V. officinalis* L. e *V. wallichii* DC. (Bos et al., 2002).

Os principais componentes voláteis de *V. glechomifolia* Meyer são o monoterpreno acetato de bornila e sesquiterpenos (Bos et al., 1998b; Houghton, 1999). Além destes, monoterprenos como os valepotriatos valtrato, acevaltrato, didrovaltrato, diavaltrato e 1- β -acevaltrato estão presentes (Fig.2), constituindo um perfil fitoquímico muito similar à *V. officinalis* L. (Gao & Bjork, 2000; Salles et al., 2000; Salles et al., 2002; Silva, et al., 2002), embora suas concentrações sejam extremamente variáveis, conforme a espécie, época do ano,

constituição genética e fatores ambientais (Bos, et al., 1998b; Houghton, 1999). Variações nas concentrações e proporções de valepotriatos também foram observadas dentro da espécie, de acordo com o tipo de propagação e cultivo, sendo que sistemas de micropropagação podem apresentar uma menor variabilidade (Gao & Bjork, 2000).

Ao contrário da maioria das espécies do gênero *Valeriana*, *V. glechomifolia* Meyer e *Phyllactis pulvinata* (espécie peruana), apresentam valepotriatos tanto em partes aéreas como nas raízes (Kittipongpatana et al., 2002; Salles, et al., 2002). As maiores concentrações de valepotriatos foram encontradas em *V. thalictroides* Graebn. (14.51%), outra espécie peruana, e *V. prionophylla* Standl. (10.04%), espécie costa-riquenha (Chavadej & Weberling, 1983; Kittipongpatana et al., 2002), ambas nos órgãos subterrâneos, nos quais os valepotriatos são preferencialmente acumulados (Keochanthabounthanh et al., 1993; Fuzzati et al., 1996; Bos, et al., 1998a; Bos et al., 1998b; Banerjee et al., 1998; Herrera-Arellano et al., 2001, Bos, et al., 2002; Castillo et al., 2002). A espécie *P. pulvinata* constitui uma exceção, apresentando valepotriatos (8.48%) também em suas folhas (Kittipongpatana et al., 2002).

Outros gêneros desta família como *Valerianella*, *Fedia*, *Centranthus* e *Nardostachys* também se caracterizam por acumular valepotriatos (Kittipongpatana et al., 2002). Listas de outros valepotriatos e de composição química adicional desta família podem ser encontradas nos Apêndices II e III, respectivamente (Backlund & Moritz, 1998).

I.2.1. Valepotriatos: Estruturas e Propriedades Químicas, Isolamento e Quantificação

Valepotriatos são assim chamados por uma conveniente abreviatura de valeriana-epoxi-triésteres criada por Thies & Funke em 1966, os primeiros pesquisadores a realizarem uma caracterização química mais apurada dos valepotriatos (Bos et al, 2002). Os grupos ésteres aparecem ligados aos carbonos C1, C7 e C11 do núcleo iridóide (Backlund & Moritz, 1998) (Fig.2A). Estes valepotriatos se constroem ao redor de um esqueleto iridóide (monoterpeno) e são lipofílicos (Mahmoud and Croteau, 2002), sendo bastante solúveis em solventes pouco polares (Backlung & Moritz, 1998). Valepotriatos são, portanto, iridóides monoterpénóides que apresentam anéis bi-cíclicos ciclopentano-c-pirano (Mikell et al., 2001; Bos et al., 2002) não-glicosilados, produzidos na Rota dos Isoprenóides (Backlund & Moritz,

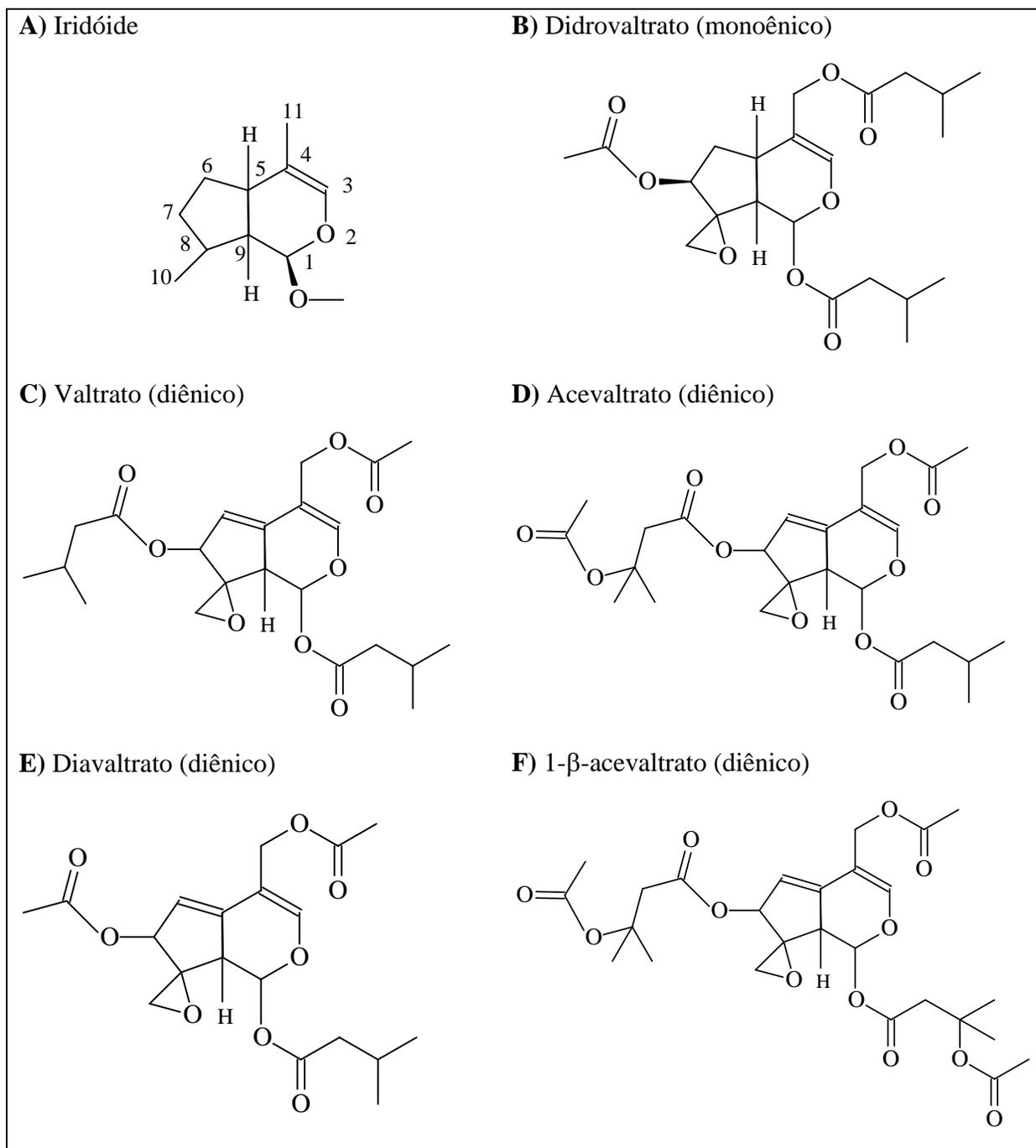


Figura 2 – Estrutura química dos valepotriatos isolados e quantificados de *V. glechomifolia* Meyer cultivadas *in vitro*.

1998; Mahmoud & Croteau, 2002) e podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em monoênicos (uma dupla ligação no anel iridóide pentacíclico entre os carbonos C3

e C4); diênicos (duas ligações duplas no anel iridóide, sendo a segunda entre os carbonos C5 e C6 do anel pirano), podendo apresentar adicionalmente um anel epóxido nas posições C8-C10 (Fig. 2A) em valtrato-hidrinas e desóxi-monoênicos. Além disso, existem outros valepotriatos que não se enquadram nestes quatro grupos. Tais critérios de classificação estão baseados nas modificações das cadeias laterais associadas ao anel iridóide (Bos et al., 2002). Valepotriatos são altamente instáveis e sob influência da luz, umidade e calor, decompõem-se rapidamente em meio aquoso ou hidroalcoólico ácido e básico, mas em condições anidras e/ou em metanol sob baixas temperaturas são bastante estáveis (Bos et al., 2002). Valepotriatos como valtrato apresentam-se sob forma oleosa, mas acevaltrato e didrovaltrato são de aspecto sólido (pó) (Fig. 2).

Os compostos de degradação baldrinais se caracterizam pela perda dos substituintes dos carbonos C1 e C7 e formação de um grupo aldeídico em C10 (Houghton, 1988; Hobbs, 1989; Bos et al., 2002). Homobaldrinais se originam pela perda de grupos acetila e isovalerila em C1 e C7 do isovaltrato. Baldrinais e homobaldrinais são substâncias sólidas, constituindo-se de um pó amarelo-intenso característico, sendo bastante reativos e, com frequência, formam polímeros (Bos et al., 2002).

Até o presente momento, didrovaltrato, valtrato, acevaltrato, diavaltrato e 1- β -acevaltrato (Fig.2) foram os valepotriatos isolados e quantificados de cultivos *in vitro* de *V. glechomifolia* Meyer, sendo o primeiro monoênico e os demais diênicos (Salles et al., 2002; Silva et al., 2002), muito embora ADH-valtrato (monoênico) e o iridóide glicosilado diidrocomina tenham sido encontrados na planta *in natura*, além dos já citados (Salles et al., 2000).

Estudos sobre isolamento e purificação de valepotriatos implicam em cuidados alusivos às degradações. Bicchi et al. (2000) testaram diversos métodos para um isolamento fidedigno de valepotriatos de espécies de *Valeriana* e concluíram que cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método exato e prático no isolamento e quantificação de valepotriatos. De acordo com Bos et al. (2002), a eleição de CLAE associado ao sistema de detecção por ultravioleta (UV) representa a melhor escolha para análises qualitativas e quantitativas de valepotriatos em decorrência da alta precisão deste método (Bos et al., 2002; Gao & Bjork, 2000), como pôde ser verificado em estudos sobre a determinação de

valepotriatos em dez diferentes espécies de *Valeriana* do Rio Grande do Sul (Silva et al., 2002) usando um sistema isocrático (Granicher et al., 1994; Granicher et al., 1995a; Granicher et al., 1995b; Salles, 1999). O método de extração, isolamento e quantificação de valepotriatos provenientes dessas diferentes espécies de *Valeriana* foi validado por Silva (2001), o qual foi utilizado no presente trabalho.

I.2.2. Valepotriatos: Biossíntese

Como todos os demais terpenos, valepotriatos são biossintetizados através da Rota dos Isoprenóides (Figs. 3A, 3B e 4) (Mahmoud and Croteau, 2002). Isoprenóides compõem uma vasta família de cerca de 30.000 compostos estruturalmente muito diversos que desempenham funções essenciais nos vegetais (Hemmerlin et al., 2003; Walker & Poulte, 2005) como hormonal (giberelinas, citocininas, ácido abscísico – ABA), fotossintética e respiratória, através da biossíntese de pigmentos fotossintéticos (carotenóides e cadeia de fitol da clorofila, bem como a própria biogênese de cloroplastos) e transportadores de elétrons (quinonas); estrutural, através da biossíntese de componentes estruturais de membrana, como fitosteróis; substâncias atrativas para polinizadores e dispersores de sementes (terpenos voláteis e coloridos, como monoterpenos e carotenóides) e de defesa vegetal (terpenos de resina, fitoalexinas e fitoanticipinas) (Lange et al., 1998; Korth et al., 2000; Mahmoud and Croteau, 2001; Mahmoud e Croteau, 2002; Hemmerlin et al., 2003). A importância desta rota é destacada, haja visto que compostos nela produzidos participam tanto do metabolismo primário como do secundário (Rodríguez-Concepción et al., 2004a).

Conceitualmente, a biossíntese de isoprenóides pode ser dividida em quatro fases (Figs. 3A e 3B). A fase I (Fig. 3A) compreende a formação de Isopentenil pirofosfato (IPP) e di-metil-alil-pirofosfato (DMAPP). Nas plantas, essa fase é bioquimicamente especializada e compartimentalizada (Figs. 3A e 4). A biossíntese de IPP e DMAPP obedece a duas diferentes maneiras de serem produzidos. Estes, são precursores universais de todos os isoprenóides (Lange et al., 2000).

Terpenóides são uma classe de metabólitos que apresenta grande variabilidade em termos de estrutura química e este termo deriva da denominação dada aos primeiros

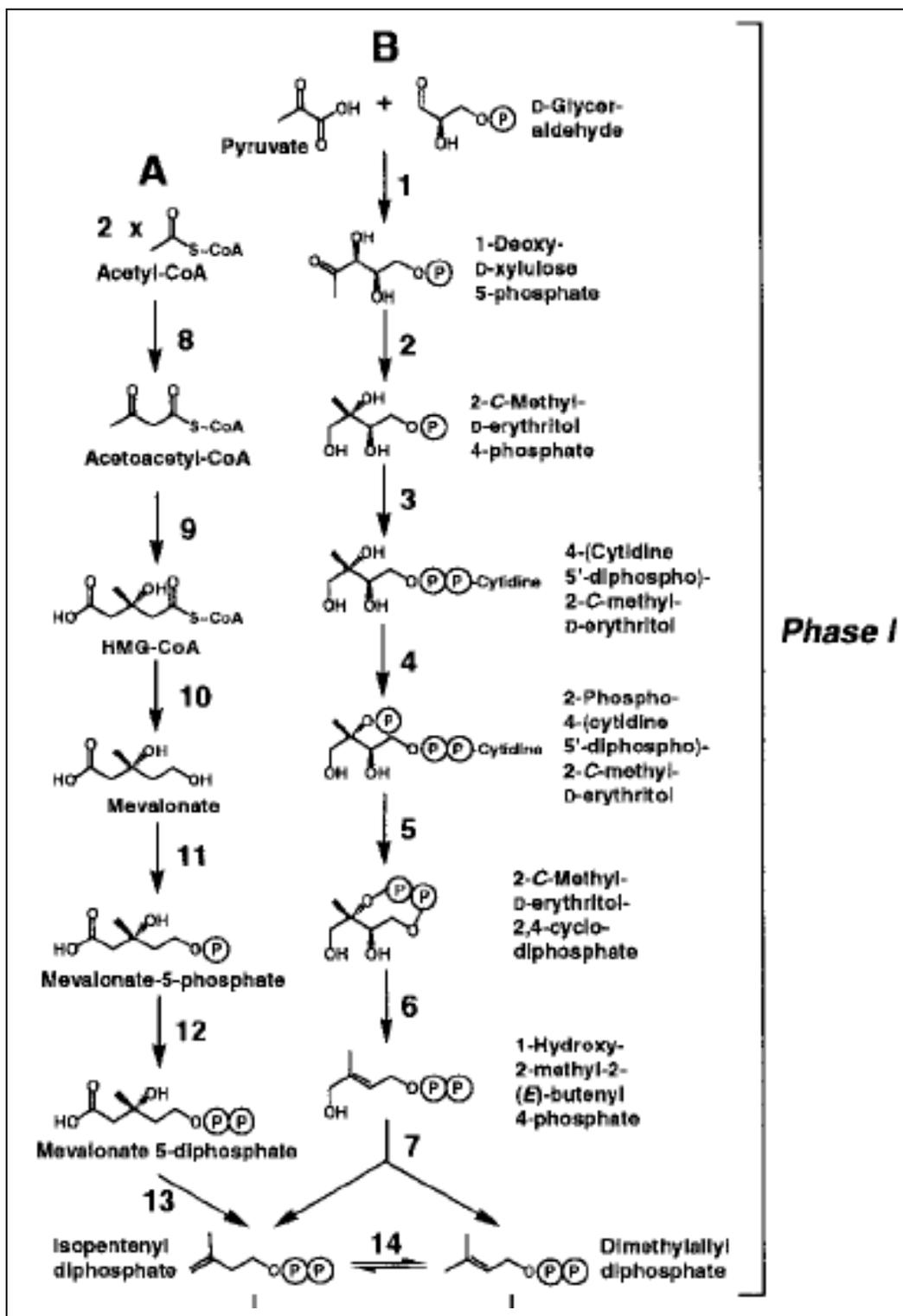


Figura 3A - Esquema simplificado da biossíntese de isoprenóides: (A) Rota Citosólica do Mevalonato e (B) Rota Plástica da DXP (MEP); Fase I compreende a biossíntese compartimentalizada e especializada de IPP (Lange & Ghassemian, 2003).

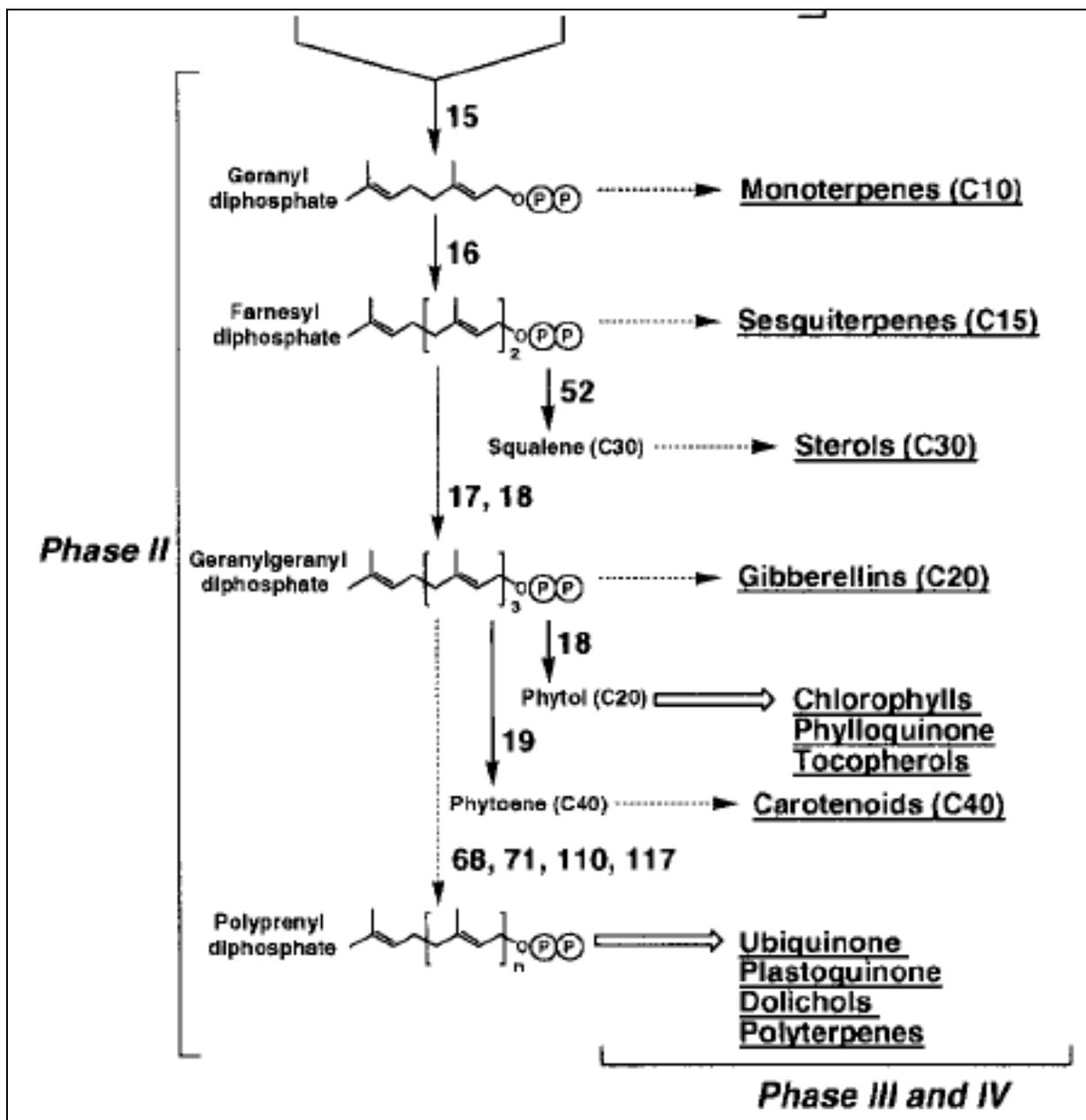


Figura 3B - Fases II, III e IV compreendem etapas compartilhadas entre ambas rotas (Lange & Ghassemian, 2003).

compostos isolados da turpentina, *i.e.* “terpentin” em alemão. Todos os terpenos são derivados da condensação repetida de unidades de isopreno (5 carbonos) e daí advém o nome da Rota dos Isoprenóides, embora não seja o isopreno, mas sim o isopentenil pirofosfato (IPP), que atua como precursor biológico desta família de metabólitos (Croteau et al., 2000).

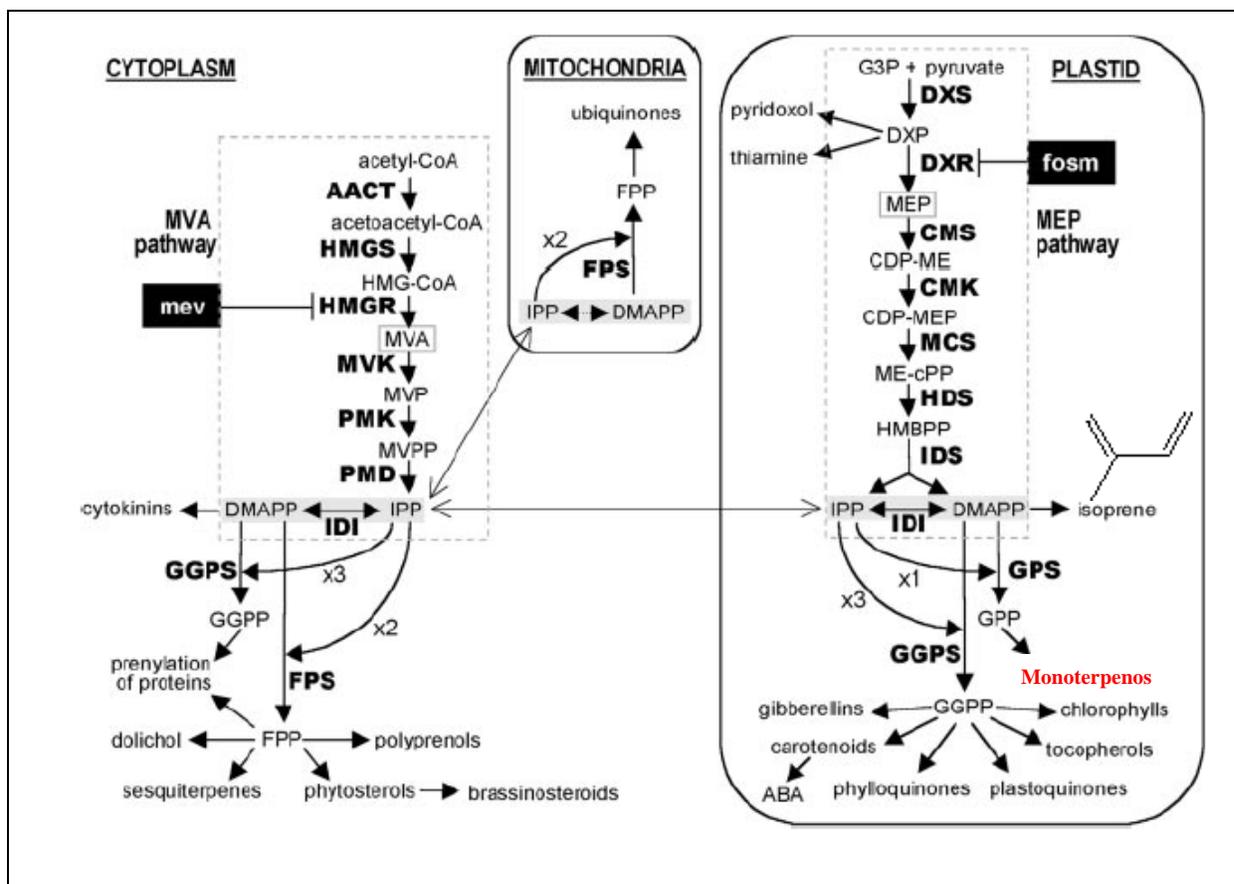


Figura 4 – Compartimentalização da Rota dos Isoprenóides. FPP – Farnesil Pirofosfato; GPP – Geranyl Pirofosfato; GGPP – Geranyl-geranyl Pirofosfato; mev - Mevinolina.; fosm – fosmidomicina. Caracteres em negrito são abreviaturas das enzimas catalisadoras. Setas em negrito simples representam a direção da formação do produto enzimático e as duplas se referem às reações de isomerização; setas simples indicam translocação de compostos entre os compartimentos celulares. Setas truncadas indicam inibição enzimática, juntamente com o respectivo inibidor (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002).

A rota citosólica do MVA fornece IPP para produção de sesquiterpenos (C15), triterpenos (C30), cadeia lateral da ubiquinona e esteróis (Korth et al., 2000; Croteau et al., Mahmoud and Croteau, 2001; Eisenreich et al., 2001; Estéves et al., 2001; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002), a partir de acetil-CoA passando pelo intermediário ácido mevalônico, do qual deriva o nome desta rota citosólica (Fig. 4) (Croteau et al., 2000; Mahmoud e Croteau, 2001; Eisenreich et al., 2001; Estéves et al., 2001; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). A rota plastídica MVA-independente é responsável pela biossíntese dos isoprenos (C5), monoterpénos (C10), certos sesquiterpenos, diterpenos (C20),

tertraterpenos (C₄₀) e politerpenos (C_{40+x} ou (C₅)_n onde n=9 à 30.000), como carotenóides e cadeias laterais dos tocoferóis, filoquinonas e clorofilas (Fig. 4) (Eisenreich et al., 2001; Croteau et al., 2000; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Dubey et al., 2003). Esta via plastídica é iniciada pela a condensação de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (G3P-GAP), gerando um primeiro intermediário 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato (DxP), seguido de isomerização e redução deste intermediário a 2-*c*-metileritritol-4-fosfato (MEP). Em decorrência, esta rota tem sido denominada de Rota Mevalonato-Independente, Rota da DxP ou ainda Rota MEP (Croteau et al., 2000; Mahmoud e Croteau, 2001; Eisenreich et al., 2001; Estéves et al., 2001; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Proteau, 2004).

A fase II (Figs. 3A e 3B) começa com a isomerização de IPP em DMAPP, onde IPP é inúmeras vezes condensado ao seu isômero DMAPP, para originar uma infinidade de isoprenóides/terpenóides como geranyl difosfato – ou pirofosfato- (GPP, C₁₀), farnesil difosfato (FPP, C₁₅), geranylgeranyl difosfato (GGPP, C₂₀), esqualeno (C₃₀), fitil difosfato (C₄₀), fitoeno (C₄₀) e prenil difosfato de cadeias maiores (Mahmoud and Croteau, 2001; Lange & Ghassemian, 2003).

Na fase III (Fig. 3B), os compostos produzidos na fase II sofrem reações de condensação e ciclização para originar monoterpenos de GPP, sesquiterpenos de FPP, diterpenos de GGPP, triterpenos e esteróis de 2,3-epóxi-esqualeno (proveniente do esqualeno) e tetraterpenos de licopeno. Os compostos cíclicos são transformados na fase IV (Fig. 3B) por oxirreduções, isomerizações e reações de substituições e conjugações, para formarem produtos isoprenóides finais (Lange & Ghassemian, 2003 – Apêndice IV).

Estudos regulatórios de ambas rotas revelaram que a enzima limitante da Rota do MVA é a β -3-Hidróxi-3metil-glutaril Redutase (HMGR) (Dubey et al., 2003), enquanto a 1-Desóxi-D-xilulose-5-fosfato Sintase (DxPS) desempenha este papel para Rota da DxP (Rodríguez-Concepción et al., 2001; Estévez et al., 2001). Os genes codificantes de HMGR têm sido clonados de inúmeras espécies vegetais e animais (Lange *et al.*, 1998; Rohdich et al., 2001; Eisenreich et al., 2001; Wanke et al., 2001), constituindo famílias gênicas em muitas plantas. Já os genes que codificam DxPS definem uma família única de transcetolases altamente conservadas entre bactérias e vegetais, mas ausente em animais (Fig.5) (Lange *et al.*, 1998; Rohdich et al., 2001; Eisenreich et al., 2001; Wanke et al., 2001;) e ocorrendo como

	Mevalonate		Deoxyxylulose
Bacteria	✓	or	✓
Archaea	✓		
Fungi	✓		
Algae	✓	and/or	✓
Higher plants			
plastidic compartment	✓		✓
cytosolic compartment			✓
Protozoa	✓		✓
Animals	✓		

TRENDS in Plant Science

Figura 5. Distribuição das Rotas do MVA e DxP para biossíntese de Isoprenóides (Eisenreich et al., 2001).

pequenas famílias gênicas. Estes genes foram clonados de diversas espécies de plantas, como *Mentha piperita* (Lange et al., 1998), *Capsicum annuum* (Bouvier et al., 1998), *Lycopersicon esculentum* (Lois et al., 2000) *Catharanthus roseus* (Chahed et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Araki et al., 2000; Estévez et al., 2000), *Medicago trunculata* (Walter et al., 2002) e *Elaeis guineensis* (Khemvong & Suvachittanont, 2005), de bactérias, como *E.coli* (Sprenger et al., 1997; Lois et al., 1998) e *Streptomyces* (Kuzuyama et al., 2000a), além da alga verde *Chlamydomonas* (Lichtenthaler, 1999).

Produtos naturais provenientes de rotas biossintéticas mistas são conhecidos como meroterpenos, como citocininas, vários fenilpropanóides e numerosos alcalóides como vincristina e vimblastina. Muitas proteínas de ancoramento em membranas através da farnesilação ou prenilação (Figs. 3B e 4) (farnesil também é derivado de IPP), também pertencem à este grupo (Croteau et al., 2000).

Apesar da compartimentalização de ambas as rotas, precursores derivados da Rota do MVA podem ser exportados para síntese de isoprenóides nos plastídeos e precursores derivados da Rota da DxP podem ser exportados para o citosol, pelo menos em algumas plantas, tecidos e/ou estágios de desenvolvimento (Lichtenthaler, 1999; Eisenreich et al., 2001; Burlat et al., 2004), entretanto, o transporte de IPP do plastídeo para o citosol mostrou ser mediado por um sistema simporte com prótons (H^+) (Bick and Lange, 2003). Cooperação

entre as rotas do MVA e DxP tem sido relatada para biossíntese de sesquiterpenos (Lange & Ghassemian, 2003). Outros prenil-difosfatos como GPP, FPP e GGPP, também podem ser trocados entre estes compartimentos (Bick and Lange, 2003; Hemmerlin et al., 2003; Burlat et al., 2004). Entretanto, pouco se conhece a respeito da regulação dessas trocas e cooperação mútua ente as rotas MVA e DxP.

Rodríguez-Concepción et al. (2004a) observaram, através de experimentos com inibidores de HMGR e DxPR¹ (1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato-reductoisomerase) (Fig.4), que sob condições normais de crescimento vegetal, o bloqueio de uma das rotas não pode ser recuperado pelo aumento da atividade de outra, contrariando o fato de que MVA restabelece o desenvolvimento de cloroplastos e etioplastos em mutantes nulos de *Arabidopsis*, os quais não exibiam a rota plastídica. Produtos derivados de MVA contribuem para formação de isoprenóides de plastídeos funcionais, como clorofilas e carotenóides necessários para o desenvolvimento dos cloroplastos (Nagata et al., 2002). Ademais, à tal bloqueio irrecuperável também se opõem as evidências de trocas ativas de prenil-difosfatos entre citosol e plastídeos (Burlat et al., 2004; Rodríguez-Concepción et al., 2004a). Estes autores também propuseram um modelo para a regulação da biossíntese e trocas de precursores de isoprenóides, em *A. thaliana*: quando sementes germinam no escuro, inicialmente genes que codificam para HMGR levariam à ativação da rota do MVA nas plantas estioladas recém germinadas. O estiolamento envolve altas taxas de alongação celular, o que se pode esperar de isoprenóides provenientes da rota do MVA, como esteróis e brassinoesteróides, os quais são requeridos em altos níveis. Estes últimos têm mostrado um papel-chave no programa morfo genético de desenvolvimento no escuro. A atividade da rota da DxP aparece reduzida durante o estiolamento das plântulas emergentes, em decorrência da baixa taxa de expressão dos genes que codificam para DxPS e DXPR (Estévez et al., 2001; Carretero-Paulet et al., 2002). No desestiolamento, é como se os prenil-difosfatos derivados da rota do MVA fossem transportados para dentro dos etioplastos para síntese de giberelinas e carotenóides, os quais são requeridos para o desenvolvimento dos plastídeos. Sob iluminação, os fotorreceptores criptocromo e fitocromo convergem a rota de transdução de sinal, para regular a abundância

¹ . Até o presente momento, não foi encontrada bibliografia que descreva experimentos usando inibidores de DxPS, embora dois possíveis candidatos já tenham sido relatados.

de HY5 (componente-chave na rota de sinalização mediada por estes dois fotorreceptores) e outros fatores, os quais reprimiriam a expressão gênica de HMGR. Tem sido proposto que a convergência das rotas de sinalização mediadas pelo criptocromo e fitocromo, é uma condição necessária para que o fator de transcrição HY5 (com um domínio básico de zipper leucina), possa regular a desestibulação induzida pela luz. Um fitocromo específico, associado a uma rota HY5-independente, transduziria o sinal luminoso para reprimir a captação dos prenil-difosfatos pelos cloroplastos (Rodríguez-Concepción et al., 2004a). Em adição, luz ativa a expressão de genes que codificam para as enzimas da rota da DXP (Carretero-Paulet et al., 2002; Souret et al., 2002), resultando em uma vigorosa síntese de isoprenóides plastidiais, muitos dos quais são elementos-chave para fotossíntese. Em resumo, as condições ambientais de luminosidade são percebidas e transduzidas por diferentes rotas de sinalização que integram esta informação para ajustar o programa genético previamente estabelecido de desenvolvimento e coordenar o metabolismo dos isoprenóides (Rodríguez-Concepción et al., 2004a; Kliebenstein, 2004). Dados contraditórios frequentemente abordados pelos experimentos com inibidores de ambas as rotas em diferentes organismos podem decorrer do fato de que a Rota do MVA seja preferencialmente usada para o metabolismo primário, enquanto que a da DXP o seja para o secundário (Hamano et al., 2002).

I.2.2.1. A Enzima HMGR e a Rota Citosólica

Os principais isoprenóides produzidos nesta rota (Fig. 4) são os esteróis MVA-derivados, os quais modulam a arquitetura das membranas e regulam os processos de crescimento e desenvolvimento; brassinoesteróides, que são hormônios esteróides; dolicol, uma molécula envolvida na glicosilação de proteínas; grupos de prenilação de proteínas; porção terpênica da citocinina, um fitormônio, cadeia lateral das ubiquinonas e fitoalexinas sesquiterpenóides, que são substâncias de defesa vegetal (Yang et al., 1991; Ravid et al., 1999; Rodríguez-Concepción et al., 2004a). Um esquema mais minucioso de biossíntese de terpenóides produzidos por esta rota pode ser encontrado no Apêndice IV.

Em 1960, durante a caracterização da rota de biossíntese do colesterol, foi descoberto que, três moléculas de acetil-CoA são condensadas sucessivamente para formar 3-hidróxi-3-

metil-glutaril-CoA, por ação da HMGS, o qual é reduzido à MVA pela HMGR, identificando os precursores-chave da rota do MVA para biossíntese de IPP. Mevalonato é então fosforilado duas vezes para produzir IPP e seu isômero DMAPP, os precursores universais dos isoprenóides esteróides (Ravid et al., 1999; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Kuzuyama, 2002; Hamano et al., 2002; Dubey et al., 2003).

HMGR é uma enzima altamente conservada e presente em todos organismos eucarióticos e a Rota do MVA tem sido extensivamente estudada (Dubey et al., 2003) em leveduras e animais desde a década de 50. Diferentemente de outras enzimas da rota do MVA, HMGR é uma glicoproteína residente na membrana do retículo endoplasmático, cujo sítio ativo está na porção C-terminal em contato com o citosol. A porção N-terminal contém um domínio hidrofóbico altamente conservado, o qual se expande oito vezes através da membrana ancorando a enzima no retículo endoplasmático (Ravid et al., 1999).

Em plantas superiores, é codificada no genoma nuclear por uma família multigênica (Dubey et al., 2003): *Arabidopsis thaliana* e *Glycine max* (soja) contém dois genes distintos que codificam para HMGR (Yang et al., 1991; Korth et al., 2000). Em *Solanum tuberosum* (batata), existem, pelo menos, três sub-famílias de genes que codificam para HMGR, resultando em diferentes isoformas de HMGR, sendo que em *Lycopersicon esculentum* (tomate), quatro isoformas foram encontradas (Korth et al., 2000).

HMGR é uma das enzimas mais altamente reguladas tanto em animais como nos vegetais. Em muitos casos, pequenas famílias de genes, cada uma contendo múltiplos membros, são responsáveis pela codificação desta enzima. Estes genes exibem um padrão complexo de expressão, sendo que genes individuais apresentam um padrão constitutivo, tecido ou desenvolvimento-específico ou ainda, expressão induzida por hormônios. Em adição, genes específicos podem ser induzidos pelo dano ou infecção por patógenos. A atividade desta enzima pode estar sujeita a uma regulação pós-traducional por fosforilação por cinases (Ravid et al., 1999; Korth et al., 2000) ou por modulação alostérica. Sua taxa de turnover (síntese de transcritos – mRNAs) e de degradação proteolítica, também influenciam a atividade. Um esquema unificado que explique os vários mecanismos que regulam HMGR para produção dos diferentes isoprenóides é difícil de estabelecer (Croteau et al., 2000).

A partir de experimentos usando inibidores desta rota com o intuito de inibir a síntese de colesterol em animais (Ravid et al., 1999), foi revelado que HMGR é a enzima-chave da rota do MVA. Estatinas como compactina, mevinolina, lovastatina e mevastatina se revelaram inibidores enzimáticos específicos de HMGR (Ravid et al., 1999; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Kuzuyama, 2002; Hamano et al., 2002; Dubey et al., 2003). Foi demonstrado, então, que a atividade da HMGR (desde a síntese de MVA) é controlada através de uma regulação feed-back multivalente por metabólitos esteroidais e não-esteroidais derivados de MVA: drástico aumento de HMGR era acompanhado de uma depleção aguda de compostos esteroidais e não-esteroidais sintetizados endogenamente (Yang et al., 1991). O bloqueio de HMGR por mevinolina em plantas resulta em inibição do crescimento radicular e estagnação do desenvolvimento de partes aéreas (Re et al., 1995). Anormalidades decorrentes da inibição de HMGR por estatinas têm sido dose-dependentes: sob pequenas ($0,1\mu\text{M}$ MEV) concentrações, as partes aéreas se desenvolvem normalmente, mas as raízes são fortemente afetadas em seu desenvolvimento, além de surgirem raízes adventícias nos caules. Concentrações em torno de $0,5\mu\text{M}$ de MEV reduziram o número de raízes adventícias mas o desenvolvimento das folhas tende a ser afetado mais intensamente. Sob administração de $1,0\mu\text{M}$, partes aéreas são tão drasticamente afetadas que comprometem seriamente a vida do vegetal. Em algumas plantas, é observado o aparecimento de um tecido altamente desorganizado no meristema apical. Brotos crescidos em $5,0\mu\text{M}$ apresentaram bloqueio quase completo do aparecimento de plântulas e somente primórdios foliares não desenvolvidos puderam ser observados (Rodríguez-Concepción et al., 2004a)

Além disso, também foi verificado que, sob determinados estímulos e/ou adição de inibidores de síntese protéica, a presença de HMGR é devida à síntese de novo e, portanto, esta enzima estaria sob um controle transcricional e pós-transcricional (Yang et al., 1991). O controle metabólico de HMGR é assegurado através das taxas de transcrição de genes que codificam para HMGR, caracterizando um controle transcricional, e também por meio da eficiência da tradução e estabilidade dos transcritos, caracterizando um controle pós-transcricional. A mesma abordagem foi usada por Josekutty (1998) em cultura de células de *Solanum xanthocarpum*, usando mevinolina como inibidor específico de HMGR adicionado ao meio de cultura. Adição exógena de MVA, esqualeno e colesterol, reverteram a inibição da

atividade HMGR, levando a concluir que mevinolina é capaz de inibir o crescimento vegetal através da inibição da síntese de isoprenóides, principalmente pela redução da síntese de esteróis através da inibição de HMGR. Outras enzimas desta rota também foram estudadas e não provocaram tais efeitos nos metabólitos, confirmando que HMGR é a enzima limitante na biossíntese de isoprenóides em animais (Josekuty, 1998) e possivelmente de isoprenóides citosólicos em plantas (Dubey et al., 2003).

Parece, então, que a regulação de HMGR em plantas superiores, pelo menos, envolve atividade enzimática, acumulação e estabilidade de transcritos e taxa transcricional. Transcrição e atividade enzimática são afetadas por uma variedade de sinais ambientais e fisiológicos, como luz, reguladores de crescimento e fitormônios, inibidores, elicitores, fosforilação, feed-back metabólico, estágio de desenvolvimento, tipo de tecido e estresses como danos mecânicos e ataques de fitopatógenos (Yang et al., 1991; Korth et al., 2000; Dubey et al., 2003). Experimentos a campo com espécies tropicais produtoras de látex revelaram que a regulação de HMGR varia com o fotoperíodo de modo que de janeiro à março, a produção de látex e os níveis protéicos de HMGR são elevados, os quais decaem até um nível mínimo em junho/julho (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/plantsci/teaching/univonly/cornah0102/Isoprenoids - 2.ppt>).

A expressão dos genes que codificam para diferentes isoformas estão atreladas a esses fatores exógenos e endógenos e, portanto, a regulação da rota do MVA é bastante complexa (Korth et al., 2000; Dubey et al., 2003). Tal complexidade é decorrente da expressão diferencial destes genes, temporal e espacialmente, de modo que um dos genes ou seu produto (isoforma) pode responder a vários estímulos diferentes, os quais não estimulariam os demais e vice-versa. Pode-se estender esses resultados no sentido de que um gene e/ou isoforma responda a condições de estresse biótico e a outra a estresse abiótico (Yang et al., 1991). Além disso, genes constitutivos tendem a apresentar sua expressão suprimida pela luz, tanto em tecidos jovens como em adultos. Muito embora os níveis de seus transcritos aumentem no escuro, os teores são geralmente menores do que aqueles apresentados por genes não-constitutivos. Estes últimos parecem ser controlados pela luz e não por sua ausência: forte redução na atividade enzimática e conteúdo protéico foi observada em tecidos verdes maduros, bem como no nível de transcritos foram observados durante períodos de ausência de

luz. Redução na taxa transcricional e estabilidade dos transcritos de genes não constitutivos também ocorrem nos tecidos meristemáticos nos períodos de escuridão (Korth et al., 2000). Em tomateiros, níveis elevados de HMGR são requeridos no estágios iniciais de desenvolvimento dos frutos mas não durante o amadurecimento. Estes eventos concordam com as fases de desenvolvimento de novas membranas e com a biossíntese de esteróis. Em plantas de batata, a isoforma 1 é induzida por danos mecânicos e ataque de patógenos, respondendo com aumento da produção de esteróis, sendo que outras isoformas análogas em outras espécies vegetais são induzidas por elicitores, aumentando a produção de fitoalexinas sesquiterpênicas (<http://www.plantsci.cam.ac.uk/plantsci/teaching/univonly/cornah0102/Isoprenoids-2.ppt>). O controle bioquímico preciso que influencia a atividade de HMGR tem sido de difícil investigação *in vitro*, em decorrência de que esta enzima encontra-se associada à membrana do retículo endoplasmático (Croteau et al., 2000).

Foi observado que a biossíntese de alguns metabólitos caracteristicamente biossintetizados pela via do MVA têm a sua taxa sintética mantida constante ou relativamente maior do que aquela apresentada pelos esteróis, sob adição de mevinolina como inibidor enzimático. Isto causa dúvidas se estes metabólitos estariam sob controle de HMGR, de modo que a correlação entre atividade de HMGR citosólica e biossíntese não está completamente entendida, sugerindo que esses metabólitos poderiam ser biossintetizados no plastídeo. Isoformas de HMGR que apresentam peptídeo líder de endereçamento plastídico não têm sido citadas pela literatura até o presente momento. Há, apenas, indicações bioquímicas da existência de HMGR plastídica, embora a possibilidade de HMGR desempenhar algum papel na biossíntese de isoprenóides plastídicos é um ponto ainda em discussão (Dubey et al., 2003).

1.2.2.2. A Enzima DxPS e Rota Plastídica

A Rota DxP foi primeiramente descoberta em *Escherichia coli* por Rohmer et al. (1993) a partir de várias evidências da existências de uma rota paralela para biossíntese de uma variedade de isoprenóides, que, até então, eram classicamente tidos como oriundos da Rota do MVA. Inconsistências na taxa de incorporação de ^{13}C em produtos metabólicos da Rota do MVA forneceram tais evidências (Rohmer et al., 1993 Rohmer et al., 1996;

Eisenreich et al., 1997; Lichtenthaler et al., 1997; Contin et al., 1998; Dubey et al., 2003; Walker & Poulter, 2005). Atualmente, a Rota da DXP encontra-se totalmente caracterizada (Rodríguez-Concepción et al., 2001; Page et al., 2004). Genes e seus produtos que participam desta rota têm sido identificados (Rohmer et al., 1993; Rohmer et al., 1996; Lichtenthaler et al., 1997; Contin et al., 1998; Lange e Croteau, 1999; Lichtenthaler, 2000a; Rodríguez-Concepción et al., 2000; Cunningham et al., 2000; Rohdich et al., 2000; Kuzuyama et al., 2000b; Kuzuyama et al., 2000c; Altincicek et al., 2001; Rohdich et al., 2001a; Rohdich et al., 2001b; Rodríguez-Concepción et al., 2001; Rohdich et al., 2003; Fellermeier et al., 2003; Eisenreich et al., 2004; Page et al., 2004; Walker & Poulter, 2005). A presença de uma rota MVA-independente para síntese de vários isoprenóides tem sido mostrada em inúmeras espécies vegetais, bem como as enzimas participantes e os genes que as codificam (Apêndices IV, V, VI, VII e VIII).

Desde a descoberta, no início da década de 90, de que 2-c-metil-D-eritriol-4-fosfato (MEP- Fig. 3A) seria um precursor potencialmente forte para biossíntese de IPP, diversos estudos para caracterização de intermediários, enzimas e seus genes codificadores têm ocorrido, sendo esta rota encontrada em eubactérias, entre as quais encontram-se aquelas causadoras da tuberculose, bronquite, meningite e úlcera gástrica, algas verdes, plastídeos de plantas superiores e plastídeos vestigiais de vários parasitas patogênicos (Fig.5), incluindo *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária (Lange & Croteau, 1999; Jomaa et al., 1999; Argyrou & Blanchard, 2004; Proteau, 2004). Estes patógenos dependem da rota DXP para síntese de seus isoprenóides, de modo que sua interrupção provoca efeito altamente letal, consistindo-se em um eficaz alvo para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas para tratamento de doenças infecciosas (Lichtenthaler et al., 2000b; Zeidler et al., 2000; Wanke et al., 2001; Wiesner et al., 2002; Lell et al., 2003; Borrmann et al., 2004; Eisenreich et al., 2004; Rodríguez-Concepción, 2004b; Rohmer et al., 2004; Kuntz et al., 2005; Walker & Poulter, 2005). Os dois últimos produtos desta rota são os responsáveis pela ativação das células T, envolvidas no sistema imunológico humano (Hintz et al., 2001; Rodríguez-Concepción, 2004b).

Se, por um lado, a interrupção desta rota em alguns organismos traz benefícios à saúde humana, sua estimulação é de igual efeito. Esteviosídeos são diterpenos produzidos

exclusivamente via rota MVA-independente em folhas de espécies vegetais do gênero *Stevia*, os quais têm sido, atualmente, utilizados como substitutivos dos açúcares na dieta de diabéticos (Brandle et al., 2002). A ativação de genes e de sua rota metabólica derivada representa uma abordagem elegante e promissora para produção de metabólitos de interesse. Da mesma forma, pode-se esperar que a elicitação desta rota, responsável pela síntese de terpenos, possa suplementar a produção de inúmeros princípios ativos largamente aproveitados tanto na indústria farmacêuticas como na alimentícia. A produção de isoprenóides especificamente produzidos pela via MVA-independente, como carotenóides e o fitol é a força motriz no desenvolvimento de estudos que envolvam análise da regulação das enzimas desta rota, de modo que sua total compreensão possibilitará a manipulação de tais terpenóides nas plantas (Estévez et al., 2000).

Tanto plantas como bactérias e protozoários apresentam dois genes independentes que codificam para DxPS em um único genoma (Walter et al., 2000; Brandle et al., 2002; Khemvong & Suvachittanont, 2005), sendo um de expressão constitutiva (classe 1 – *DXS1*), indispensável na biogênese dos cloroplastos (Estévez et al., 2000) e outro modulável (classe 2 – *DXS2*), à exceção de *A. thaliana* que apresenta apenas alelos da classe 1: uma cópia adicional de *CLA1 (DXS1)* tem sido observada (Araki et al., 2000; Estévez et al., 2000; Walter et al., 2000). De modo geral, o gene de expressão constitutiva tende a aparecer no cluster de genes fotossintéticos e está relacionado ao metabolismo primário, enquanto que o outro pode aparecer em qualquer lugar do genoma e está relacionado com o metabolismo secundário (Walter et al., 2000). Excluindo-se a seqüência de endereçamento plastídico na porção N-terminal, ambos genes apresentam identidade entre si tanto em nível de nucleotídeos como na seqüência de aminoácidos decodificada de seus transcritos e a similaridade é alta quando se compara os genes *DXS1* de diferentes espécies. O mesmo foi observado para *DXS2* (Bouvier et al., 1998; Lange et al., 1998; Araki et al., 2000; Lois et al., 2000; Chahed et al., 2000; Walter et al., 2000; Khemvong & Suvachittanont, 2005). Ademais, genes de ambas as classes codificam especificamente proteínas transcetolases funcionais catalisadoras das reações de condensação e descarboxilação entre GAP e piruvato (Estévez et al., 2000; Walter et al., 2000; Khemvong & Suvachittanont, 2005). O gene *CLA1 (DXS1)* de *A. thaliana* mostrou alta similaridade com o de outras plantas estudadas (Bouvier et al., 1998; Lange et al., 1998; Araki

et al., 2000; Chahed et al., 2000; Estévez et al., 2000, Lois et al., 2000; Walter et al., 2000; Estévez et al., 2001; Khemvong & Suvachittanont, 2005). Ambos genes *DXS* são muito similares entre *P. falciparum*, bactérias e plantas (Jomaa et al., 1999).

Análises de transcritos de *DXS1* de *M. truncatula*, *Arabidopsis*, milho, tabaco e tomate, revelaram que eles são preferencialmente expressos em tecidos vegetais jovens e em desenvolvimento (Estévez et al., 2000; Walter et al., 2000; Rodríguez-Concepción et al., 2004a; Khemvong & Suvachittanont, 2005), tanto de partes aéreas, como de flores (pétalas e sépalas), folhas (Walter et al., 2000; Khemvong & Suvachittanont, 2005) e caules, tanto em plântulas fotomorfogênicas, como nas estioladas (Walter et al., 2000). Raízes tendem a apresentar os menores níveis de transcritos de *DXS1*. O gene *DXS1* não é estimulado pela infecção de micorrizas; porém, níveis de transcritos *DXS2* são fortemente aumentados em raízes colonizadas por micorrizas, apesar desses níveis serem ligeiramente maiores do que os níveis de transcritos dos genes constitutivos (*DXS1*), correlacionando-se com acumulação de carotenóides e apocarotenóides. A correlação entre *DXS2* e acúmulo de carotenóides tem se verificado em inúmeras espécies vegetais (Walter et al., 2000; Khemvong & Suvachittanont, 2005). Tricomas de células glandulares produtoras de óleos e outros monoterpenos parecem ser sítios de atividade gênica de *DXS2* (Walter et al., 2000). Ao contrário do que foi observado em *M. truncatula* e milho, folhas de tabaco e da palmeira *Elaeis guineensis* apresentaram baixos níveis de transcritos de *DXS2* (Walter et al., 2000; Khemvong & Suvachittanont, 2005), embora frutos desta palmeira tenham apresentado as maiores taxas de expressão (Khemvong & Suvachittanony, 2005). Parece, então, que o caráter constitutivo do gene (*DXS1*) pode ser creditado ao tipo de plastídeo onde ele é expresso: *DXS1* é mais expresso em cloroplastos de tecidos verdes e em cromoplastos de frutos em desenvolvimento, enquanto que frutos em maturação apresentam maior taxa de expressão de *DXS2* (Walter et al., 2000; Khemvong & Suvachittanony, 2005). Em *Arabidopsis*, os genes *DXS1* (*CLA1*) apresentam expressão diferencial em diversos tecidos, ambos relacionados com síntese de clorofilas e carotenóides, de modo a interferir simultaneamente no desenvolvimento normal de cloroplastos e etioplastos, estágios finais da morfogênese do mesófilo foliar, mas, sem afetar a estrutura dos amiloplastos. Isso porque anomalias no desenvolvimento do cloroplasto são remetidas aos processos de produção de sinais enviados pelo cloroplasto ao citoplasma e

núcleo, influenciando diretamente nos últimos estágios de diferenciação do mesófilo (Estévez et al., 2000). Existem algumas evidências que alelos de genes *DXS* são capazes de ocasionar diferentes graus de clorose, provocando variegações em folhas, o que seria uma confirmação de suas expressões diferenciais (Crowel et al., 2003). Por outro lado, a acumulação de carotenóides em frutos de tomateiro e pimenteira está relacionada com a expressão de *DXS1* (Lois et al., 2000), contrariando o que foi observado por Khemvong & Suvachittanont (2005). Em *Arabidopsis*, como não existem duas classes, o gene *DXS1* mostrou-se largamente expresso em tecidos fotossintetizantes e não-fotossintetizantes e sua expressão foi fortemente modulada durante o desenvolvimento vegetal. Níveis máximos de seus transcritos foram observados nos estágios de maturação das folhas, quando um considerável requerimento de clorofilas e carotenóides se fez necessário (Estévez et al., 2000). Recentemente, foi relatado que ocorre expressão de genes que codificam D_xPS e D_xPR em plastídeos existentes no mesófilo e tecidos floemáticos de folhas jovens, tanto quanto nos cotilédones, nos estágios iniciais de desenvolvimento vegetal (Carretero-Paulet et al., 2002; Burlat et al., 2004).

Assim como o tipo de plastídeo a ser desenvolvido na célula influencia a taxa de expressão de *DXS*, temperatura afeta a atividade da enzima. Temperaturas acima de 22°C tendem a tornar defectiva sua atividade apenas em folhas jovens, mas nem todas suas funções são afetadas. Temperatura altera preponderantemente apenas a biossíntese de clorofilas e carotenóides (Araki et al., 2000).

A expressão diferencial temporal e espacial dos genes *DXS* pode ser a explicação porque os níveis de transcritos de *DXS1* são baixos ou ausentes nas raízes mesmo sob infecção com micorrizas (Walter et al., 2000). Genes modulados (*DXS2*) são preferencialmente expressos nas raízes durante a infecção por fungos. É conhecido o fato de que ataque de patógenos, ou mesmo simbioses, é capaz de induzir expressão dos genes *DXS*, de modo que níveis de seus transcritos e produtos metabólicos encontram-se elevados nas raízes (Walter et al., 2000). Plastídeos de células radiculares são reorganizados, formando uma rede de plastídeos em torno do fungo, onde carotenóides são acumulados, tornando-se cromoplastos (Walter et al., 2000). Leucoplastos de células glandulares também apresentam maior atividade de *DXS2*, bem como de seus metabólitos decorrentes (Walter et al., 2000; Turner et al., 1999).

Portanto, a expressão dos dois tipos de genes deve ser determinada mais pelo tipo de plastídeo presente na célula do que pela rota de biossíntese do produto final que esta célula produz. Então, o requerimento de um isoprenóide no desenvolvimento e crescimento vegetal (fotossíntese) *versus* requerimento de isoprenóides com função ecológica (fitoalexinas, óleos, terpenos, etc...) deve ser importante na regulação do metabolismo. A necessidade temporal e espacial que determina o tipo de metabolismo primário ou secundário a ser executado deve influir na taxa de expressão dos diferentes genes que codificam para D_xPS. Este fato tem sido demonstrado previamente para as terpenos sintases (Lange et al., 2000), de modo que, generalizando, DXS1 estaria envolvida no metabolismo primário e DXS2, no secundário (Walter et al., 2000). Experimentos realizados por Karl et al. (2002) revelaram que isoprenóides não só podem ter origens extraplastídicas (via rota MVA) mas, também, podem ser provenientes de diferentes plastídios, caracterizando uma freqüente intercomunicação entre compartimentos celulares e corroborando o fato de que a expressão dos genes *DXS* tende a ser compartimentalizada (Karl et al., 2002). A taxa de expressão dos genes do tipo *DXS1* afeta a expressão de genes fotossintéticos nucleares e daqueles presentes no genoma plastídico (Estévez et al., 2000).

Portanto, a atividade de D_xPS está atrelada aos seus níveis de expressão (níveis de mRNA) diferencial nos vários tecidos, determinados por seu conteúdo protéico presente, pelo tipo de plastídeo e pelo requerimento de determinada classe de isoprenóide. Porém, é necessário enfatizar que há um controle pós-transcricional, pois altos níveis de transcritos de *DXS1*, mas baixos de proteína correspondente presentes em raízes, não possibilitam a síntese de carotenóides e clorofilas nestes locais (Estévez et al., 2000).

D_xPS é uma transcetolase altamente conservada entre os organismos que a contém e que catalisa a primeira etapa da rota MVA-independente (Fig. 3A, 3B e 4) (Estévez et al., 2000; Rohdich et al., 2000; Altincicek et al., 2001; Wanke et al., 2001; Walter et al., 2002; Dubey et al. 2003; Fellermeier et al., 2003; Khemvong & Suvachittanont, 2005), quer seja em procariotos, como *E.coli* (Lois et al., 1998; Sprenger et al., 1997; Eisenreich et al., 2001; Rohdich et al., 2001) e *Streptomyces sp* (Kuzuyama et al., 2000a), quer seja em eucariotos, como *P. falciparum* (Jomaa et al., 1999) e várias espécies vegetais como *Mentha piperita* (Lange et al., 1998), *Capsicum annuum* (Bouvier et al., 1998); *Catharanthus roseus* (Chahed

et al., 2000), *Mendicaco trunculata* (Walter et al., 2002), *Elaeis guineensis* (Khemvong & Suvachittanont, 2005) e *Arabidopsis thaliana* (Araki et al., 2000; Estévez et al., 2000; Estévez et al., 2000). DxPS cataliza reações de condensação e descarboxilação tipo transcetolase entre gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e piruvato, os quais são os precursores diretos de IPP (Figs. 3A, 3B e 4) (Eisenreich et al., 1997; Dubey et al., 2003). Esta enzima tem sido encontrada em cloroplastos (Araki et al., 2000; Estévez et al., 2000; Suire et al., 2000) e, em *P. falciparum*, localiza-se nos apicoplastos (Jomaa et al., 1999).

Evidências sobre o papel regulatório limitante de DxPS em vegetais têm sido obtidas tanto em plantas como bactérias. Enzimas limitantes de uma rota têm como principal característica de provocar alterações significativas no conteúdo do produto final; grandes alterações no conteúdo enzimático de enzimas não-limitantes provocam pouca ou nenhuma alteração no produto final, o que não é caso de DxPS. Superexpressão de *CLAI* elevou significativamente o conteúdo de clorofilas, tocoferóis, carotenóides, ABA e giberelinas (Estévez et al., 2001), enquanto que com o uso de fosmidomicina, inibidor específico de DxPR (Fig. 4), foi observada inibição de apenas alguns isoprenóides, como clorofilas, embora as concentrações de ABA tenham se mantido em níveis consideráveis a ponto de produzirem sementes dormentes e frutos apresentando plastídeos vestigiais (Rodríguez-Concepcion et al., 2001). Fosmidomicina inibe apenas a atividade de DxPR, sem afetar os níveis de transcritos de DxPS, confirmando que esta última é a enzima-chave (Carretero Paulet et al., 2002). Portanto, DxPS é a enzima limitante na biossíntese de IPP nos plastídeos e, conseqüentemente de isoprenóides deles derivados (Estévez et al., 2001). Até o presente momento, apenas dois potenciais inibidores específicos para DxPS foram identificados, fluoropiruvato (Altincicek et al., 2000) e ácido (3R,4S)-3,4,5-triidróxi-4-metilpentil fosfônico (Yoshioka et al., 2004); no entanto, há farta bibliografia tratando de inibidores de DxPR (Bergan, 1990; Jomaa et al., 1999; Altincicek et al., 2000; Lichtenthaler et al., 2000a; Lichtenthaler et al., 2000b; Lange et al., 2001; Mueller et al., 2000; Zhen & Singh, 2001; Wiesner et al., 2002; Gottlin et al., 2003; Lell et al., 2003; Steinbacher et al., 2003; Wang et al., 2003; Borrmann et al., 2004; Courtois et al., 2004; Goulart et al., 2004; Phaosiri & Proteau, 2004; Proteau, 2004; Rodríguez-Concepción, 2004b; Rohmer et al., 2004; Kuntz et al., 2005). Além disso, todos os experimentos realizados para fins de conhecimento sobre a rota da DxP, a enzima DxPS, sua

expressão gênica e atividade, bem como sua regulação, apóiam-se em inibidores de DxPR e quantificação dos isoprenóides biossintetizados. Nenhum experimento foi encontrado usando fluoropiruvato ou ácido (3R,4S)-3,4,5-triidróxi-4-metilpentil fosfônico para inibição de DxPS e posterior quantificação dos metabólitos. Uma confirmação adicional, embora menos contundente de que DxPS é a enzima limitante da rota provém de experimentos com marcação radiativa de IPP e DMAPP e quantificação da emissão de isopreno (Loreto & Velikova, 2001; Sharkey & Yeh, 2001; Sharkey et al., 2001; Hoeffler et al., 2002; Loreto et al., 2004), ao invés de quantificar os isoprenóides dele derivados. Pools de IPP no cloroplasto também podem ser considerados como um fator limitante na biossíntese de isoprenóides (Estévez et al., 2001).

I.2.2.3. Biossíntese e Armazenamento de Iridóides e outros Monoterpenos

Valepotriatos (produzidos durante a fase IV) são constituídos de esqueletos carbônicos iridóides monoterpênicos (produzidos durante a fase III) (Fig. 2A e Fig. 3B), resultantes de reações de ciclização de GPP (Fase IV – Fig. 3B) em torno dos quais outros esqueletos carbônicos vão sendo adicionados (Fig.2B-F). Gross (1970 *apud* Backlund & Moritz, 1998) sugeriu que esta estrutura química básica dos valepotriatos era proveniente da Rota dos Isoprenóides, cujo precursor imediato era ácido mevalônico, usando loganina como intermediário. Posteriormente, aproveitando-se dos estudos de Gross, outros pesquisadores ramificaram a rota partindo do mesmo precursor, mas complementando com iridodial como um intermediário anterior à loganina. A combinação de vários estudos rendeu um terceiro intermediário, a secologanina, o qual geraria os “seco-iridóides” e um quarto intermediário, o 10-Desoxigeniposídeo, que originaria os “iridóides normais”, que são os genitores dos valepotriatos, iridóides estes presentes apenas em angiospermas, de modo a obterem duas rotas distintas (Fig.6) (Backlund & Moritz, 1998). Atualmente, é aceito que além destes intermediários, a biossíntese de iridóides passa através de 10-hidroxigeraniol, 10-oxogeraniol, iridodial, iridotrial, ácido logânico e loganina (Fig.7). Recentemente, Burlat et al. (2004) observaram a presença da 10-geraniol-hidroxilase e de transcritos de outros três genes que participam da via plastídica, em tecidos floemáticos. Também foi demonstrado, através de marcação radiativa (Contin et al., 1998), que todos estes intermediários e precursores de

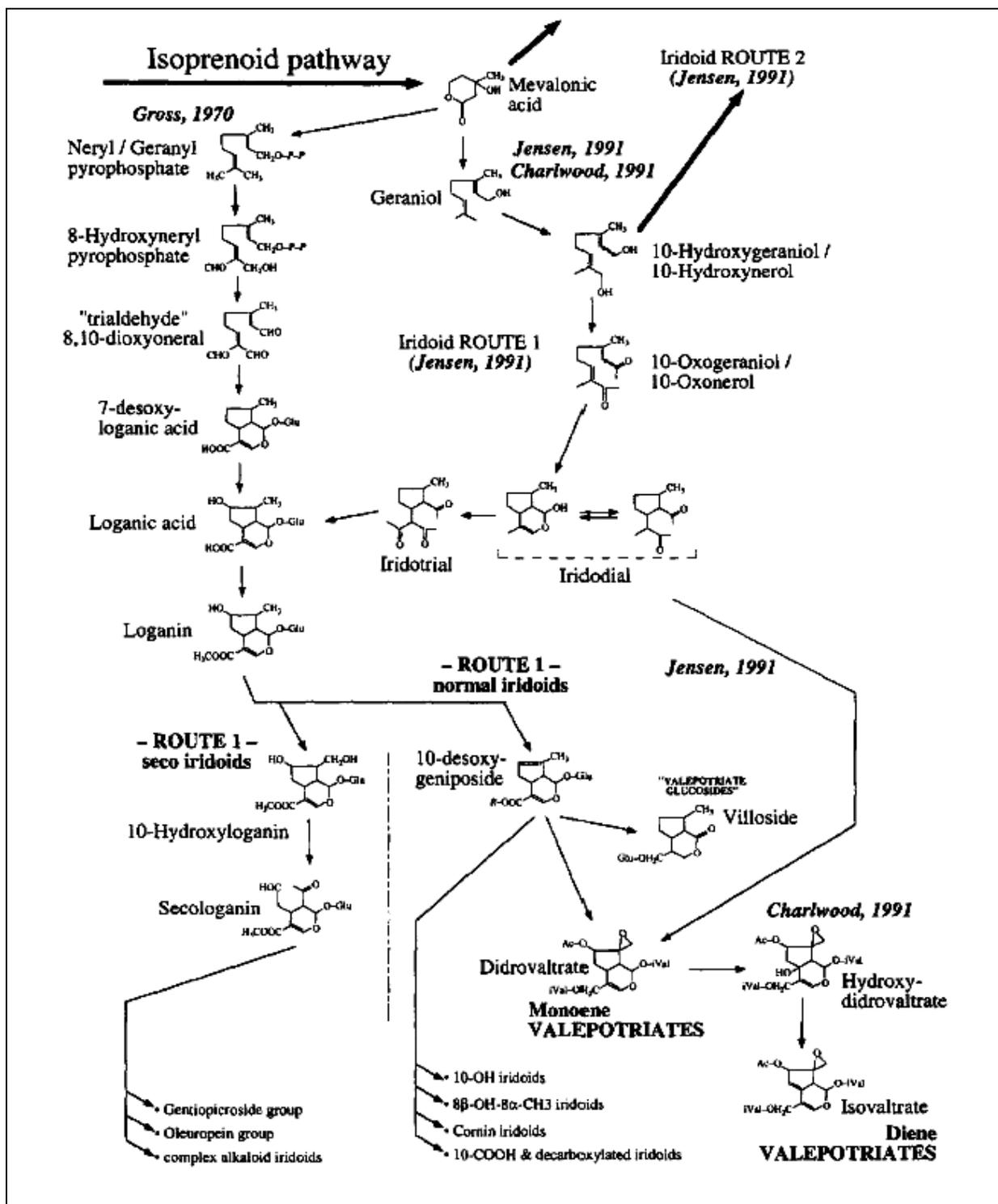


Figura 6 – Esquema da Rota biossintética de compostos iridóides, com especial referência aos valepotriatos. Diferentes hipóteses são sugeridas (Backlund & Moritz, 1998)

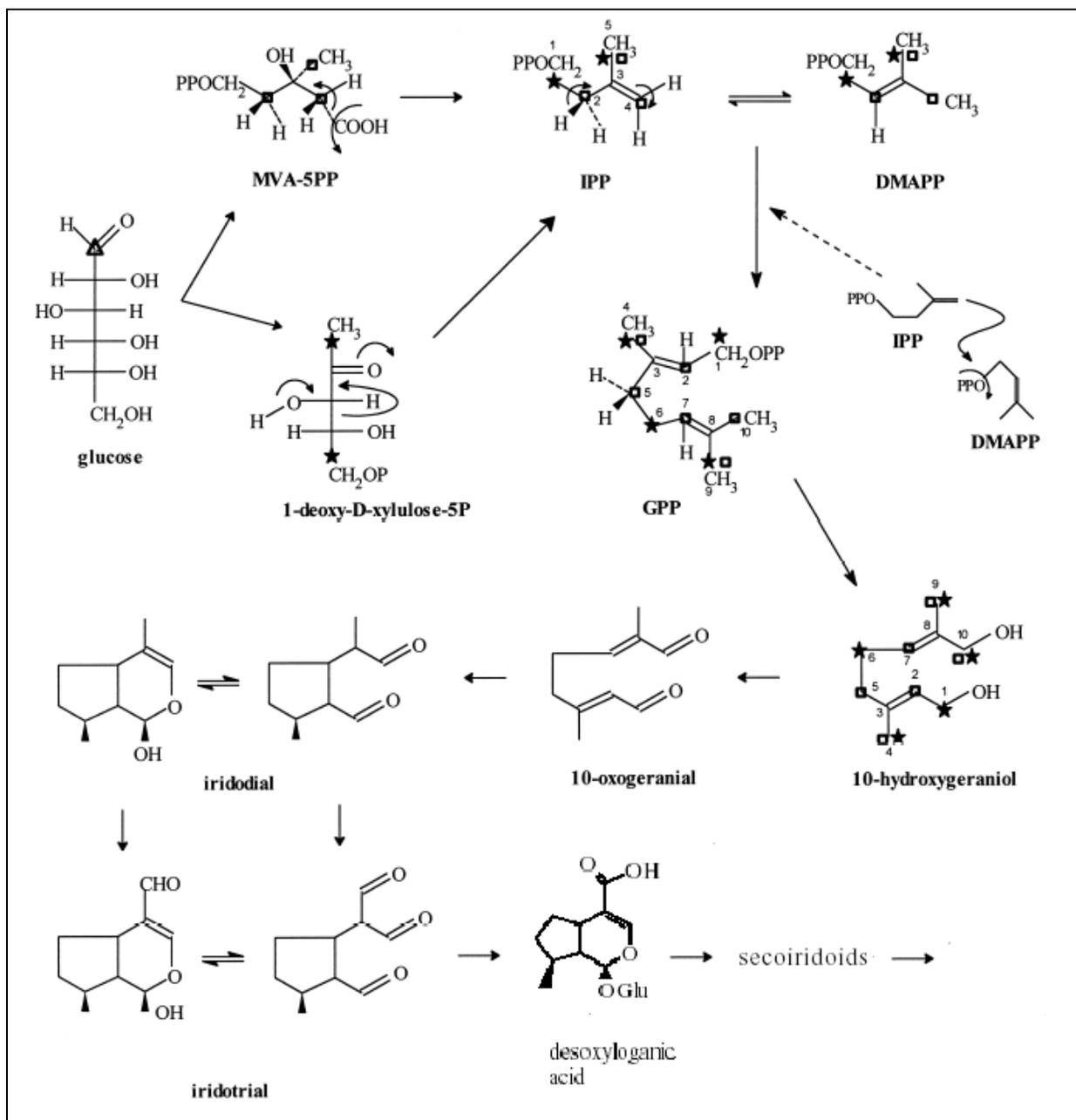


Figura 7 – Biossíntese de secologanina. Glicose com ^{13}C (Δ). Intermediários provenientes da Rota do MVA, com C marcados (\square) e intermediários provenientes da Rota da DxP, com C marcados (\star). (Contin et al., 1998)

iridóides monoterpênicos, bem como de alguns óleos essenciais e geraniol, eram provenientes da Rota da DxPS, apenas apresentando elementos-traços oriundos da Rota do MVA, embora

sitosterol foi preferencialmente oriundo desta última (Eisenrich et al., 1997; Contin et al., 1998). No Apêndice IX consta um esquema mais detalhado sobre biossíntese de iridóides. Na busca por uma confirmação da rota preferencial de biossíntese de monoterpênos, foi encontrado que eles são provenientes de ambas as rotas. Experimentos usando marcação com deutério (^2H ou D - isótopo pesado de ^1H) e ^{13}C revelaram que IPP e DMAPP podem ser formados por ambas rotas, sendo que na Rota da DXP eles são formados por um precursor comum, mas não por isomerização direta. Entre os monoterpênos obtidos, apenas (R)-carvona pareceu ser caracteristicamente produzido via Rota da DXP. Os demais apresentavam carbonos provenientes de ambas rotas, sendo que C2 provém de IPP e C6 de DMAPP (Fig. 8) (Gerdov et al., 2005).

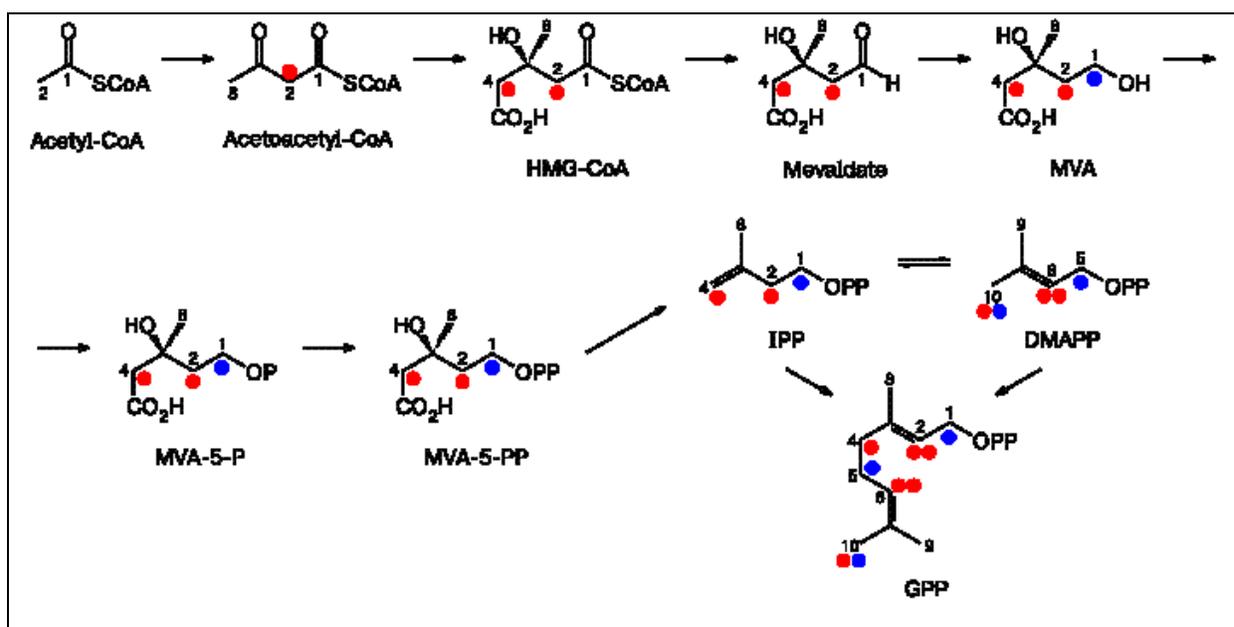


Figura 8 – Proveniência dos Carbonos C2 (●) e C6 (●) na constituição de esqueletos carbônicos de isoprenóides (Gerdov et al., 2005)

Estudos recentes têm relatado que a biossíntese de iridóides monoterpênicos envolve DXP, DXP e Geraniol-10-hidroxilase (G10H), esta última uma citocromo P450 monoxigenase (Burlat et al., 2004). A biossíntese de monoterpênos é mais facilmente compreendida quando se estuda espécies produtoras de óleos essenciais, como a menta. Nesses casos, muitas vezes os monoterpênos são biossintetizados especificamente em

leucoplastos de tricomas de células glandulares epidérmicas (Turner et al., 1999; Croteau et al., 2000; Mahmoud & Croteau, 2001). Durante a breve mas intensa fase secretória, a biossíntese de monoterpenos é sustentada por IPP e DMAPP provenientes da rota da DXP, sendo que a Rota do MVA citosólica neste período está inativa. Esta informação é de grande importância, uma vez que o conhecimento do fluxo metabólico permite manipulação das rotas biossintéticas destes compostos para fins de produção de óleos essenciais e outros monoterpenóides de valor comercial. Está confirmado, portanto, que tais produtos são biossintetizados pela Rota da DXP, pelo menos nas etapas iniciais (Mahmoud & Croteau, 2001). Mesmo nas hepáticas, DXP, sintases de GPP, FPP, GGPP (Fase II – Fig. 3B), Monoterpeno Sintase e Fitoeno Sintase, entre outras enzimas que participam da biossíntese de isoprenóides (Fases III e IV – Fig. 3B), encontram-se presentes em “corpos oleosos”, estruturas circundadas por uma única camada fosfolipídica com ativa biossíntese de terpenóides, cujas enzimas biossintéticas são de grande similaridade com aquelas presentes em plastídeos e citosol. A ocorrência de tais enzimas nestas estruturas diferenciadas é devida a uma multiplicidade gênica, cujos produtos contêm seqüência de endereçamento para tais organelas (Suire et al., 2000).

Como todos os demais terpenos, valepatriatos são monoterpenos lipofílicos biossintetizados via Rota dos Isoprenóides (Figs. 3B e 4) (Mahmoud and Croteau, 2002), e tendem a ser fixados em matrizes de mesma natureza, tais como membranas celulares, muitas vezes danificando-as quando em altas concentrações. Em decorrência, plantas empregam inúmeras estratégias para lidar com esses compostos armazenando-os em ductos (Pinaceae), laticíferos (Euphorbiaceae) ou células epidérmicas especializadas como células glandulares e tricomas (Turner et al., 1999; Croteau et al., 2000), ou simplesmente adsorvendo-os em matrizes como ligninas e cutículas (Wink, 1990). Drástico aumento de resinas terpenóides e outros isoprenóides e desenvolvimento de dutos resiníferos foram observados através da indução por moléculas elicitoras durante o desenvolvimento do xilema em *Picea abies* (Martin et al., 2002). Em muitos casos, células impregnadas por terpenos morrem, agindo no efeito citotóxico. Terpenos mais polares e por isso, menos lipofílicos, são armazenados preferencialmente em vacúolos (Wink, 1990, Turner et al., 1999; Mahmoud & Croteau, 2001;).

Em plantas herbáceas, óleos voláteis e outros mono e sesquiterpenos são armazenados em pêlos glandulares localizados na superfície epidérmica das folhas. Existem evidências de que esses compostos são biossintetizados em plastídeos da camada epidérmica e transportados ao sítio de acúmulo tanto por associação com o retículo endoplasmático ou por conversão em derivados de glicosídeos solúveis em água. Valepotriatos produzidos em cultura de raízes de diferentes gêneros da família Valerianaceae são armazenados em vesículas oleaginosas intracelulares (Charlwood et al., 1990). Terpenos e outros óleos voláteis são encontrados em células idioblásticas do córtex de rizomas e raízes (Sampaio et al., 1993). Estudos de microscopia relatam que em *V. officinalis* L. var. *sambucifolia in natura* e em cultura de raízes os óleos voláteis (sesquiterpenos) e monoterpênos produzidos pela via do MVA e/ou DXP são biossintetizados e armazenados em células localizadas na epiderme e no parênquima contíguo ao córtex (Gränicher et al., 1995c). Um estudo cito-bioquímico de raízes transformadas de *Valerianella discoidea* (Valerianaceae) revelou a presença de valepotriatos solúveis, além daqueles armazenados em vesículas oleaginosas e que as raízes deveriam ter, pelo menos, 3,5 cm de comprimento para que a biossíntese/armazenamento de valepotriatos se iniciasse. Foi também mostrado que ocorreu perda de valepotriatos das células do periciclo na formação de raízes laterais e que houve um rendimento sete vezes maior de valepotriatos monoênicos e diênicos, comparando com as raízes não transformadas tomadas como controles (Caetano et al., 1999).

Em cítricos foi observado que óleos voláteis são produzidos na casca ou flavedo dos frutos. Esta camada consiste de uma epiderme que cobre o exocarpo, composta de células parenquimatosas irregulares, as quais estão completamente circundadas por inúmeras glândulas oleaginosas ou sacos de óleo (Lücker et al., 2002). Plantas que não apresentam essas estruturas especializadas, tipicamente apresentam apenas quantidades-traços de monoterpênos (Mahmoud & Croteau, 2002). *Quercus ilex* representa um caso único, pois suas folhas emitem monoterpênos voláteis, mas não apresentam qualquer estrutura especializada para armazená-los (Loreto et al., 1996). Este fato único permitiu o estudo da biossíntese de isoprenos através da taxa de emissão dos monoterpênos voláteis. Normalmente este tipo de estudo se torna difícil em função de que a maioria dos terpenos são armazenados em estruturas especializadas, tornando as emissões um fato fragmentário de sua biossíntese em decorrência deste grau de

compartimentalização. Mas como em *Quercus ilex* este problema foi naturalmente solucionado, Loreto et al. (1996), observaram que as emissões eram dependentes da luz e CO₂, o que levou a concluir que isoprenos são sintetizados por intermediários do metabolismo fotossintético. Isso se mostrou verdadeiro quando isopreno e ácido fosfoglicérico mostraram a mesma velocidade de incorporação de ¹³C, usado como fonte de carbono. Formação de isopreno a partir de dimetilalil pirofosfato (DMAPP) é catalisada pela Isopreno Sintase, a qual normalmente se localiza no estroma do cloroplasto. Conseqüentemente, todas as etapas da formação das unidades de isoprenos provenientes de carbonos fotossintéticos devem ocorrer dentro do cloroplasto (Loreto et al., 1996). Estudos alusivos a emissões de hidrocarbonetos biogênicos desempenham importante papel na determinação do potencial de oxidação da atmosfera e isto tem estimulado a pesquisa relativa às rotas metabólicas de biossíntese de terpenos nas plantas (Loreto et al., 1996).

I.2.3. Valepotriatos: Efeitos Farmacológicos

I.2.3.1. Efeito Sedativo Moderado Sobre o SNC

Algumas doenças neurológicas, psico-somáticas e distúrbios psiquiátricos ainda não apresentam claramente elucidadas as suas causas e, como tal, existem apenas algumas hipóteses emergentes sobre seus mecanismos, bem como de seus tratamentos (Graef et al., 2000). Ansiedade, depressão e gastralgias associadas, bem como epilepsia, distúrbios do sono e da menopausa, têm sido tratados à base de benzodiazepínicos, serotoninérgicos, antidepressivos tricíclicos, medicamentos à base de compostos inibidores da Monoaminaoxidase (MAO) e ativadores do ácido γ -aminobutírico (GABA) - um mediador neuroquímico do sistema nervoso central – e hormônios esteróides. Estes fármacos apresentam efeitos colaterais negativos, como dependência, crises de abstinência, sonolência, efeito rebote e, até mesmo, aparecimento de tumores (Andreatini & Leite, 1994; Kapczinski & Ribeiro, 2000).

Nas últimas décadas, vários pesquisadores têm sugerido a importância farmacológica de extratos secos de raízes e rizomas de várias espécies do gênero *Valeriana*, principalmente

de *V. officinalis* L. (espécie européia) e *V. wallichii* DC. (espécie asiática), contendo valepotriatos (Houghton, 1988; Bos et al., 2002). Tais extratos vêm sendo utilizados como sedativos, desde os tempos da Grécia antiga e dos Romanos, tornando estas espécies das mais consumidas no mundo para esses fins medicinais e consideradas como as principais espécies utilizadas para produção de fitoterápicos à base de ácidos valerênicos e valepotriatos padronizados que circulam comercialmente em todo mundo (Houghton, 1988; Bos et al., 2002; Gutierrez et al., 2004; www.anvisa.gov.br, 2007).

Pesquisas sobre os efeitos de valepotriatos no SNC têm sido realizadas desde seus isolamentos em 1966 (Bos et al., 2002). Desde então, várias propriedades medicinais têm sido observadas e tentativamente atribuídas aos compostos não-voláteis dos extratos secos das raízes de *V. officinalis* L., presentes em concentrações consideráveis, dentre eles, os valepotriatos, como valtrato, acevaltrato e didrovaltrato (Andreatini & Leite, 1994; Santos et al., 1994a; Santos et al., 1994b; Wagner et al., 1998; Houghton, 1999). Extratos contendo estes compostos têm sido utilizados na medicina alternativa para o controle/tratamento da ansiedade, estresses e distúrbios do sono em decorrência da suave ação sedativa sobre o SNC, além da sua capacidade de não causar dependência (Houghton, 1988; Andreatini & Leite, 1994; Wagner et al., 1998; Houghton, 1999; Andreatini et al., 2002; Bent et al., 2006).

Extratos de órgãos subterrâneos de várias espécies do gênero *Valeriana* têm sido usados na etnofarmacologia como sedativos suaves e tranqüilizantes na indução do sono (Donath et al., 2000; Plushner, 2000; Poyares et al., 2002; Ziegler et al., 2002; Gutierrez et al., 2004; Yuan et al., 2004, Bent et al., 2006) e para atenuação da ansiedade (Herrera-Arellano et al., 2001; Andreatini et al., 2002; Oliva et al., 2004; Yuan et al., 2004) por várias populações do mundo desde 800 a.c. (Hobbs, 1989). O efeito indutor do sono tem se revelado através do uso de diferentes metodologias, doses, preparações, tempos de tratamento em diferentes modelos animais e, atualmente, administração de extratos de raízes de *V. officinalis* tem se constituído em tratamento alternativo para da insônia nos Estados Unidos, além de ocasionar efeitos colaterais inexpressivos ou ausentes (Bent et al., 2006). Por apresentar tais propriedades, *V. officinalis* L. é a espécie mais comumente utilizada na Europa, bem como na América, sendo alvo de constantes pesquisas químicas e farmacológicas em decorrência de

seu *status* medicinal (Bos et al., 1996; Koetter, et al., 2002; Glass, et al., 2002; Bent et al., 2006).

Extratos de diferentes espécies de *Valeriana* contendo valepotriatos e ácidos valerênicos têm se mostrado, através de vários modelos experimentais, como possíveis ativadores do sistema GABAérgico, com ação sedativa sobre o SNC, decorrente da interação entre valepotriatos e os receptores de GABA. (Santos et al., 1994a; Santos et al., 1994b, Beaubrun & Gray, 2000; Yuan et al., 2004). Valepotriatos mimetizariam a ligação diazepínicos-GABA-receptor, assumindo-se que os receptores para ambas drogas seriam os mesmos (Mennini et al., 1993; Simmen, et al., 2005). A atividade sedativa moderada exibida pelos extratos enriquecidos de valepotriatos sobre o SNC (Mannenstätter et al., 1966; Torsell & Waahlberg, 1967; Santos et al., 1994a; Santos et al., 1994b; Plushner, 2000) estaria hipoteticamente relacionada à tênue ligação entre valepotriatos e receptores de GABA (Mennini et al., 1993).

Um efeito sedativo-hipnótico e potencializador de anestésicos e barbitúricos tem sido tentativamente atribuído aos valepotriatos presentes em extratos de diversas espécies de valerianas. Tal efeito tem sido observado com diferentes abordagens e modelos experimentais (Houghton 1988; Hiller & Ketler, 1996, Houghton, 1999; Beaubrun & Gray, 2000; Plushner, 2000; Herrera-Arellano et al., 2001; Oliva et al., 2004; Yuan et al., 2004), incluindo interação com receptores de GABA, tal como o efeito depressor induzido no SNC por barbitúricos (Houghton 1988; Plushner, 2000; Herrera-Arellano et al., 2001)

Por outro lado, ausência de efeito sedativo também tem sido observada em diversos modelos experimentais, inclusive em humanos (Glass et al., 2003; Hallam et al., 2003; Gutierrez et al., 2004), usando extratos comerciais de diferentes espécies de valerianas (Coxeter et al., 2003). Várias hipóteses têm sido levantadas a fim de elucidar esses resultados contraditórios: (a) extratos de valerianas enriquecidos com valepotritos não são capazes de induzir uma resposta rápida como as emitidas pelos diazepínicos (Poyares et al., 2002); (b) diferenças nas concentrações relativas e absolutas entre os valepotriatos presentes nos extratos de diferentes espécies de valerianas: valtrato é o valepotriato majoritário em *V. officinalis* L. e *V. glechomifolia* Meyer (Herrera-Arellano et al., 2001; Salles et al., 2002; Silva et al., 2002; Russowski et al., 2006) enquanto didro-isovaltrato é predominate em *V. edulis* (Oliva et al.,

2004); (c) presença (Beaubrun & Gray, 2000, Yuan et al., 2004) ou ausência (Herrera-Arellano et al., 2001) de ácidos valerênicos.

Estudos recentes com diferentes modelos e abordagens experimentais relativos às propriedades sedativas de extratos de valerianas sobre o SNC têm revelado que os flavonóides, e não os valepotriatos, presentes nos mesmos, eram capazes de formar pontes com sítios de ligação do GABA-receptor, os quais são os mesmos que se associam aos diazepínicos (Marder et al., 2003; Fernández et al., 2006), ativando o sistema GABAérgico (Simmen, et al., 2005). Estes resultados diferem daqueles propostos por Goutman et al., (2003), em que observaram que flavonóides agiam como antagonistas do sistema GABAérgico (Goutman et al., 2003). A recente descoberta de um flavonóide natural, denominado wogonina, o qual apresenta evidente atividade ansiolítica, sugere um novo mecanismo de ação envolvendo interações entre os sítios de ligação do receptor de GABA com diazepínicos e a modulação da atividade deste receptor (Tai et al., 2005).

Uma análise de 31 preparações comerciais à base de extratos de valerianas disponíveis no mercado farmacêutico australiano, revelou que valepotriatos foram encontrados em baixas concentrações (<1.0 mg/g) em chás ou ausentes em produtos finais de tabletes e cápsulas (Shohet et al., 2001). Relevantes variações na composição e conteúdo dos valepotriatos, bem como a instabilidade de alguns de seus constituintes constituindo sérios problemas de padronização, tornam necessária uma investigação mais aprimorada sobre todos esses aspectos (Houghton, 1999). Estas informações tomadas conjuntamente revelam dúvidas a respeito de quais são os verdadeiros princípios ativos presentes em extratos secos de raízes de valerianas.

Embora ainda permaneça desconhecido o verdadeiro componente ativo sobre o SNC, alguns autores têm atribuído ao conjunto de valepotriatos e alguns óleos voláteis presentes nas espécies de *Valeriana* a capacidade de prolongar, mimetizar e/ou potencializar os efeitos dos barbitúricos, diazepínicos, opiáceos e álcoois na indução do sono (Houghton, 1988; Hiller & Ketler, 1996, Plushner, 2000).

Em decorrência desses efeitos sobre o SNC, extratos de *V. edulis* contendo valepotriatos também vêm sendo estudados para fins medicinais ou como precursores de drogas (degradações a baldrinais e homobaldrinais) para tratamento de distúrbios psicomotores e anticoncussivantes. Vários modelos experimentais utilizando extratos de *V. edulis*

(100, 300 and 1000 mg/kg) demonstraram redução da força de tração e efeito anticonvulsivante, em ratos e uma administração (intraperitoneal) concomitante com barbitúricos mostrou um efeito sinérgico na coordenação motora e força de tração (Oliva et al., 2004; Beaubrun & Gray, 2000). Mais recentemente, estudos preliminares envolvendo uso de extratos secos enriquecidos de valepotriatos de plantas inteiras de *V. glechomifolia* Meyer (*in natura* e *in vitro*) revelaram efeito sedativo e ansiolítico sem afetar a memória, em ratos (Maurmann, 2006).

Recentemente, foi descoberta propriedade neuroprotetora de extratos alcoólicos secos de *V. officinalis* L.. Os efeitos sedativo e ansiolítico contribuiriam para redução da excitabilidade neuronal: a excitabilidade provoca efeito tóxico neuronal decorrente do excesso de fluxo de íons Ca^{+2} e esses eventos seriam desencadeados pela ação de um peptídeo conhecido como Beta-amilóide (BA). De maneira indireta, extratos de valerianas seriam capazes de conter o efeito tóxico degenerativo neuronal ocasionado por BA, trazendo conseqüências muito importantes no futuro, como o potencial uso desses extratos no tratamento de doenças neuro-degenerativas (Malva et al., 2004).

I.2.3.2. Efeito Citotóxico

Efeitos citotóxicos têm sido observados em estudos com várias linhagens celulares (Bos, et al., 1998a; Hui-Lian et al.; 2003) e creditados à presença do anel epóxi de vários valepotriatos (valtrato, isovaltrato, acevaltrato e didrovaltrato e isovaleroxiidrodidrovaltrato) presentes nos extratos de diferentes espécies de Valerianas (Bos, et al., 1998a; Keochanthabounthan, et al., 1993; Hui-Lian et al.; 2003). O anel epóxi (Fig.2) assume função similar àquela de agentes alquilantes (metilantes) comercialmente disponíveis no mercado farmacêutico (Houghton, 1988; Hobbs, 1989; Bos, et al., 1998a; Boros & Stermitz, 1990; Bach et al., 1993) e interações entre valepotriatos e síntese de DNA têm sido mostradas através da severa dificuldade na amplificação de DNA por PCR (Backlund, Moritz, 1998). Iridóides monoterpênicos de espécies de outras famílias também parecem apresentar atividade citotóxica *in vitro* (Boje et al., 2003) e o estudo sobre o efeito citotóxico em linhagens celulares cancerígenas realizado por Hui-Lian et al. (2003) é considerado como guia científico

para preparação de medicamentos à base de valepotriatos de valerianas para testes pré-clínicos.

O uso potencial destes compostos na medicina moderna pode incluir tratamento de doenças auto-imunes e oncológicas, com o inconveniente da absorção ineficiente e de problemas de administração da droga, uma vez que valepotriatos são lipofílicos e solúveis em solventes de baixa polaridade (Backlund, Moritz, 1998).

I.2.3.3. Outros Efeitos Farmacológicos

Sob determinadas doses, vias e periodicidade de administração, extratos enriquecidos de valepotriatos de diferentes espécies de valerianas também se revelaram como atenuantes dos distúrbios do labirinto (Andreatini & Leite, 1994) e dos sintomas da hanseníase (*V. jatamansi* – Kaur, et al., 1999). Extratos contendo valepotriatos de *V. capense* apresentaram atividade antifúngica (Fuzzati et al., 1996). Extratos de raízes de outras espécies de valerianas exibiram um efeito vasodilatador (hipotensor), mediado por um mecanismo GABA não seletivo (Houghton, 1988; Fields et al., 2003). Estes efeitos, apesar de não menos importantes, somados à atividade mutagênica, antiespasmódica e anticonvulsivante são estudados com menor frequência, carecendo de maior atenção e detalhamento (Beaubrun & Gray, 2000).

De acordo com esta literatura acessada e disponível até o presente momento, foi possível verificar imensa variabilidade na natureza e intensidade dos efeitos farmacológicos atribuídos aos valepotriatos, a qual se deve às freqüentes alterações nas concentrações absolutas e relativas dos diferentes valepotriatos presentes nos extratos das diversas espécies de valerianas, uma vez que o conhecimento do(s) real(ais) princípio(s) ativo(s) ainda permanece(m) obscuro(s). Ainda, tais efeitos são dependentes da espécie de valeriana, das doses e periodicidade de suas administrações, bem como das formas de administração (oral, intra-peritoneal, etc).

De modo geral, extratos de valeriana se compõem de misturas de valepotriatos, sem guardar proporções definidas entre si, juntamente com outras substâncias de polaridade semelhante, de modo que, a ação dos extratos de valeriana possivelmente se deva a efeitos sinérgicos de diferentes princípios ativos (Müller et al., 2003).

I.2.4. Compostos Fenólicos: Biossíntese e Efeitos Farmacológicos

Compostos fenólicos são biossintetizados através da bem caracterizada Rota do Chiquimato, a qual une o metabolismo de carboidratos à biossíntese de compostos aromáticos. Em uma seqüência de sete etapas metabólicas, fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato são convertidos a corismato, o precursor de vários compostos aromáticos do metabolismo primário, como aminoácidos e do secundário, dentre os quais se encontram compostos fenólicos como flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, proantocianidinas (taninos condensados), cumarinas, lignanas e ligninas (Herrmann and Weaver, 1999; Croteau et al., 2000; Pastírová et al., 2004; Schijlen et al., 2004; Beta, et al., 2005; Mehrtens et al., 2005). Todos intermediários desta rota são considerados compostos de pontos de ramificação, que podem servir de substratos para outras rotas metabólicas (Fig 9). Esta rota é somente encontrada em microrganismos e plantas, mas nunca em animais. As enzimas que dela participam já foram todas isoladas em forma pura de fontes pro e eucariotas e seus respectivos DNAs tem sido caracterizados em diversos organismos (Herrmann & Weaver, 1999). Transcritos de genes que codificam para enzimas que participam desta rota apresentam seqüência de endereçamento plastídico, sugerindo que o corismato é exclusivamente biossintetizado nos plastídeos de plantas superiores (Herrmann & Weaver, 1999). Fenilpropanóides sintetizados a partir de fenilalanina envolvem, principalmente Desóxi-arabino-heptulose-5-fosfato Sintase (DAHPS), Fenilalanina Amônia Liase (PAL – Phenylalanine Ammonia Lyase), Chalcona Sintase e Estilbeno Sintase no citosol (Mehrtens et al., 2005).

Nos microorganismos, esta rota é regulada através de repressão da primeira enzima (DAHPS) por um mecanismo “feedback” inibitório, sendo que em plantas superiores este mesmo mecanismo nunca foi observado, de modo que seu controle ocorre exclusivamente em nível gênico. Esta diferença entre microorganismos e plantas é refletida na grande variação da estrutura primária das respectivas primeiras enzimas. Várias enzimas desta rota apresentam isoformas, cuja expressão é dependente das condições ambientais e do órgão onde são expressas. A regulação transcricional parece ser coordenada pela luz visível e ultravioleta, as quais induzem um aumento dos transcritos (mRNA). Genes que codificam para DAHPS apresentam elementos cis do tipo "light boxes" em seus promotores. Além disso, existem

evidências de regulação transcricional coordenada entre DAHPS e PAL (Phenylalanine Ammonia Lyase), sendo esta última regulada de maneira muito semelhante à DAHPS (Herrmann & Weaver, 1999).

A penúltima enzima da rota (EPSP sintase – 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase) tem recebido atenção especial em decorrência de que sua inibição pelo glifosato gera uma ação herbicida. Plantas transgênicas tolerantes ao glifosato têm sido foco para o desenvolvimento de novos sistemas cultivo de plantas agrícolas (Herrmann & Weaver, 1999).

Compostos fenólicos são depositados em uma variedade de localizações celulares: vacúolo, parede celular, citoplasma, núcleo ou vesículas secretórias, de acordo com diferentes tecidos. Estudos recentes (*in situ*) revelaram que flavonóides podem ser biossintetizados e acumulados no núcleo. Então, a deposição destes compostos fenólicos nas diversas organelas celulares pode resultar de uma localização diferencial da rota do Chiquimato, sugerindo que eles podem ser produzidos fora do citoplasma (Saslowsky et al., 2005).

Compostos fenólicos formam um grande grupo de fitometabólitos, aos quais é creditada uma bem conhecida ação antioxidante (Beta, et al., 2005; Skerget et al., 2005). De acordo com Bruneton (1999) *apud* Skerget et al. (2005), compostos fenólicos vegetais podem ser divididos nos seguintes grupos: (a) ácidos fenólicos hidroxilados derivados do ácido benzóico, na forma livre ou combinada com esteres ou glicosídeos (p. ex. ác. Gálico); (b) ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (ác.cafeico, cumárico, ferúlico), os quais são largamente distribuídos e raramente ocorrem na forma livre, mas freqüentemente na forma esterificada; (c) ésteres fenilpropanóides glicosídicos; (d) flavonóides (Fig. 9), que são derivados dos benzo-c-piranos e ubíquos em células fotossintetizantes, consistindo de dois anéis de seis átomos de carbono (anel A e B – Fig. 9), interconectado por um terceiro anel heterociclo (anel C). Ocorrem como agliconas, glicosídeos ou derivados metilados.

Dependendo do grau de oxidação do anel pirano central, eles podem ser classificados em flavanas, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonols, flavanols e antocianinas. Se o anel pirano for aberto, tem-se as chalconas, mas, se for ciclizado em anel furano, tem-se as auronas. Bioflavonóides polifenólicos são taninos condensados e denominados de pró-antocianidinas como as poli-epicatequinas, poli-epigallocatequinas poli-epiafzelequinas (Schijlen et al., 2004;

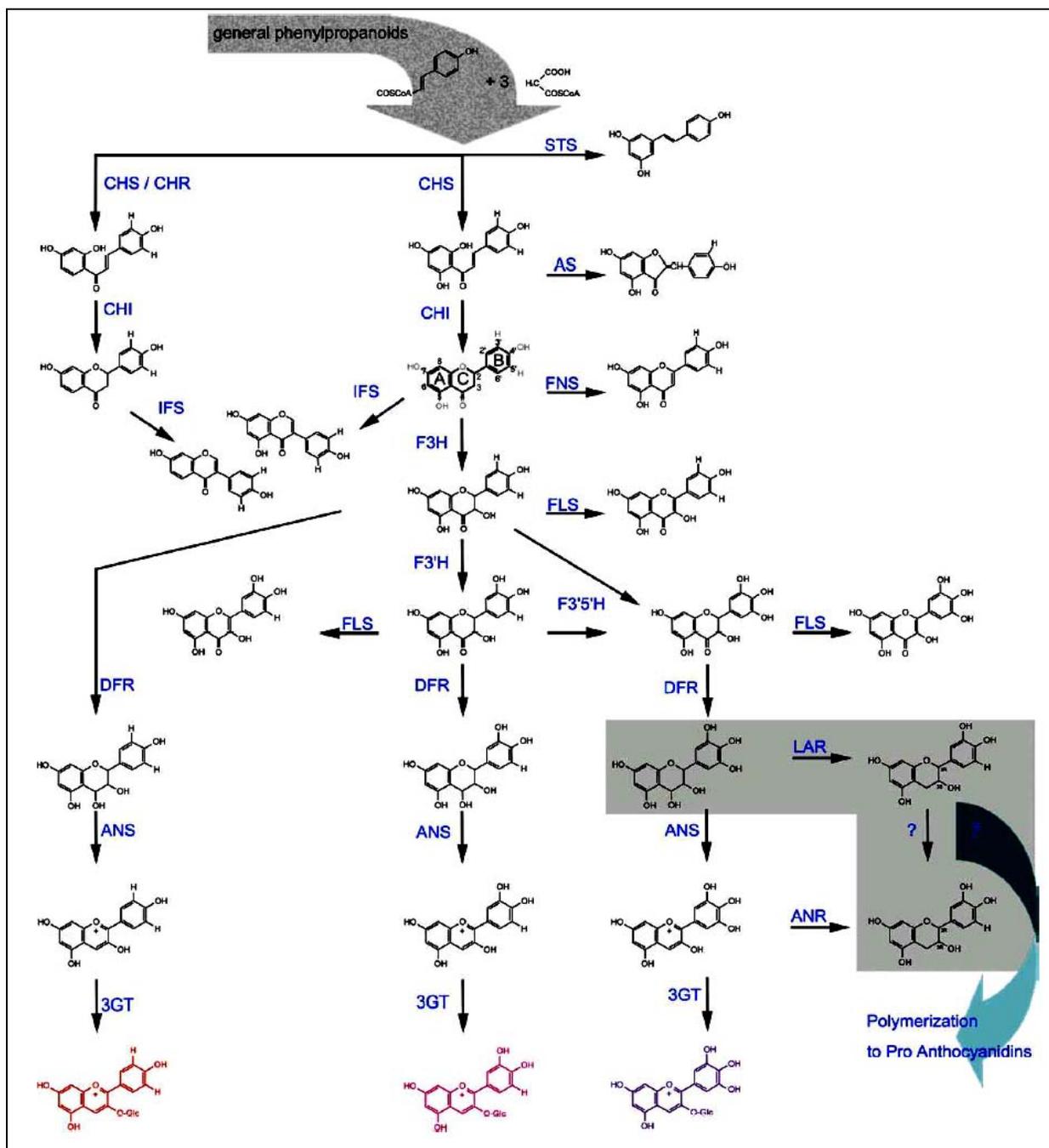


Figura 9 – Esquema geral da biossíntese dos principais flavonóides nas plantas. As enzimas estão indicadas em azul e abreviadas, como segue: CHS, chalcona sintase; CHR, chalcona redutase; STS, estilbeno sintase; AS, aureusidina sintase; CHI, chalcona isomerase; F3H, flavanona hidroxilase; FNS, flavona sintase; IFS, isoflavona sintase; FLS, flavonol sintase; F3H, flavonóide-3-hidroxilase; F3'5'H, flavonóide-3,5-hidroxilase; DFR, di-hidroflavonol-4-redutase; ANS, antocianidina sintase; LAR, leucoantocianidina redutase; ANR, antocianidina redutase; 3GT, flavonóide-3-glicosiltransferase. (Schijlen et al., 2004)

Skerget et al., 2005). Aproximadamente, seis mil diferentes flavonóides foram descritos, mas este número tende a aumentar (Schijlen et al., 2004).

Flavonóides ocorrem em inúmeras espécies vegetais, distribuídas em uma vastidão de famílias, sendo ubíquos em plantas terrestres (Miliauskas et al., 2004; Skerget et al., 2005; Tattini et al., 2005; Kornsteiner et al., 2006; Katalinic et al., 2006). Tais metabólitos apresentam um efeito protetor contra agentes oxidantes em plantas, animais (Actis-Goretta et al., 2003; Apáti et al., 2003; Owen et al., 2003; Erasto et al., 2004; Miliauskas et al., 2004; Milane et al., 2004; Skerget et al., 2005; Tattini et al., 2005; Teixeira et al., 2005; Kornsteiner et al., 2006), e em alimentos industrializados (Skerget et al., 2005).

A atividade antioxidante dos flavonóides, talvez, seja a mais estudada (Skerget et al., 2005). Basicamente, são três os mecanismos antioxidantes: (a) interrupção/inibição da cadeia de formação de radicais livres, (b) captura de radicais através da capacidade de doação de prótons ou elétrons, (c) quelação com metais de transição (Fe, Cu). Preferencialmente, flavonóides são doadores de prótons, cujas cargas negativas residuais geradas nos grupos hidroxilas anexados aos sistemas de anéis aromáticos, são facilmente estabilizadas por deslocalização (efeito de ressonância de elétrons). A habilidade antioxidativa dos flavonóides está correlacionada com a estrutura química: a presença do grupo catecol e o número e a posição dos grupos hidroxilas (OH) conferem esta habilidade. Portanto, flavonóides polifenólicos são capazes de capturar EROs, como OH^\cdot e radicais superóxidos. Metais de transição catalisam processos de formação de radicais livres. Suas formas reduzidas (Fe^{2+} e Cu^+) podem promover a formação de radicais hidroxilas, através da Reação de Fenton. Em condições normais, estes metais não existem livremente em corpos fluidos, embora sejam seqüestrados por proteínas. Sob circunstâncias adversas, principalmente estresses de naturezas diversas, este equilíbrio é desfeito. Cobre, em particular, está associado ao dano oxidativo endógeno (Peng et al., 2003; Teixeira et al., 2005; Silva et al., 2005).

Nas plantas, as quais são naturalmente expostas à radiação solar contínua, e portanto, aos raios UV-A e UVB, inúmeras respostas anatômico-morfológicas, fisiológicas e bioquímicas são desencadeadas, principalmente, biossíntese de flavonóides e outros fenilpropanóides, para ajuste da homeostasia celular (Schijlen et al., 2004; Tattini et al., 2005). A localização de flavonóides em tricomas, camada cuticular, células do mesófilo e

epidérmicas e circunvizinhança da parede celular de células epidérmicas, aumenta o efeito protetor contra as radiações de comprimento de onda curto nas folhas (Schijlen et al., 2004; Tattini et al., 2005). De acordo com o número de hidroxilas (OH) e suas posições no anel, o efeito protetor ora aparece na forma de dissipação do excesso de energia radiante, ora como capturador de radicais livres ou ainda como inibidor na formação desses mesmos radicais. O papel fundamental atribuído aos flavonóides nas estratégias bioquímicas adotadas pelas plantas para lidar com o estresse luminoso provavelmente depende da sua multiplicidade funcional: biossíntese de flavonóides tende a ser favorecida pela biossíntese de hidróxicinamatos, os quais são tão efetivos quanto os primeiros na proteção contra raios UV, danos mecânicos e ataque de patógenos (Schijlen et al., 2004; Tattini et al., 2005). Flavonóides também são capazes de inibir o “bleaching” de carotenóides, que se constituem em pigmentos foto-protetores das clorofilas presentes nos fotossistemas das plantas e, mais precisamente, de β -carotenos em animais (Corsino et al., 2003; Schijlen et al., 2004). Além da evidente ação antioxidante, compostos fenólicos sintetizados primariamente de produtos do ácido chiquímico, como taninos, lignanas, flavonóides e alguns compostos fenólicos simples, agem como defesas contra herbivoria e ataque de patógenos, ou então como moléculas sinalizadoras nas interações planta-patógenos. Ligninas aumentam a resistência mecânica das paredes celulares e muitos pigmentos de flores, frutos e sementes são atratores de agentes polinizadores e dispersores de sementes. Alguns destes compostos exibem atividade alelopática, exercendo influências negativas no crescimento de plantas vizinhas além de participar na dormência de sementes e germinação do pólen (Croteau et al., 2000; Schijlen et al., 2004).

As propriedades antioxidantes dos flavonóides e procianidinas (Actis-Goretta et al., 2003), se verificam principalmente através do efeito protetor da peroxidação de lipídeos (Milane et al., 2004). O efeito pró ou antioxidante dos flavonóides depende, portanto, da natureza do lipídeo (oleosa, pastosa ou emulsionada, como lipídeos de membranas) e do flavonóide (número e posição de OH no anel aromático), das interações entre eles, da temperatura, pH, concentração de ambos e do caráter hidrofílico ou lipofílico do flavonóide (Peng et al., 2003; Skerget et al., 2005).

Por ser a ação antioxidante dependente de muitos fatores (Skerget et al., 2005), muitas vezes flavonóides apresentam atividades contraditórias: testes de Ames, na década de 70, registraram que quercetina exibia atividade mutagênica, embora, atualmente Okamoto (2005) descobriu, através de experimentos *in vitro*, um efeito protetor em DNA (Actis-Goretta et al., 2003; Skerget et al., 2005) frente à agentes genotóxicos (Okamoto, 2005). Owen et al. (2003) estudando as propriedades benéficas do óleo de oliva encontrou flavonóides (luteolina e apigenina) e ácidos fenólicos (ác. di-hidrocaféico ou ác. propanóico, di-hidro-*p*-cumárico ou ác. florético), fundamentando várias pesquisas sobre a alta longevidade e o baixo índice de incidência de câncer de mama e de cólon na região mediterrânea. Populações desta região incluíam em sua dieta diária cerca de 250ml de óleo de azeitonas-pretas (Owen et al., 2003). Muitos flavonóides já apresentaram evidências de atividade anticarcinogênica em modelos animais, através de seu efeito protetor de DNA (Silva et al., 2005; Skerget et al., 2005). Ácidos fenólicos também apresentam propriedades antioxidantes (Saija et al., 2000; Owen et al., 2003; Silva et al., 2005; Skerget et al., 2005). Quercetina (flavonóide) e seus sais derivados, mais uma vez aparece com funções antagônicas: pró-oxidante (formação de peróxido de hidrogênio – H₂O₂) na presença de metais como Fe³⁺, mas em pHs próximos da neutralidade, é capaz de exibir eficiente captura de radicais livres (Milane et al., 2004).

Sob determinados modelos e abordagens experimentais, flavonóides e procianidinas têm mostrado reduzir o risco de acidentes cardíacos, através de um efeito vasodilatador (Actis-Goretta et al., 2003) e controle trombótico (Skerget et al., 2005), bem como um efeito antiinflamatório: o sequestro de EROs e inibição de oxidação de lipoproteínas (Actis-Goretta et al., 2003; Skerget et al., 2005) reduzem a tendência trombótica e podem inibir as ciclooxigenases (COX), modulando o metabolismo do ácido araquidônico, atenuando inflamações. Nozes, amêndoas, maçã, vinho tinto, chá preto e verde, côco e chocolate são exemplos de alimentos ricos em compostos fenólicos capazes de provocar efeito protetor cardíaco, quando ingeridos em concentrações específicas (Actis-Goretta et al., 2003; Kornsteiner et al., 2006; Katalinic et al., 2006). Flavonóides também revelaram atividade antimicrobiana e antiviral (Erasto et al., 2004; Silva et al., 2005).

Atividade sedativa e ansiolítica dos flavonóides há muito é conhecida: flavonóides presentes em espécies de *Passiflora* (Müller et al., 2005) têm sido exaustivamente estudados e

explorados como princípios ativos tanto de medicamentos sintéticos como de fitoterápicos para controle/tratamento dos distúrbios do sono e ansiedade (Müller et al., 2005; Simmen et al., 2005; Tai et al., 2005). Recentemente, alguns pesquisadores relataram que o efeito sedativo e indutor do sono seria atribuído a determinados flavonóides naturalmente presentes em raízes de diferentes espécies de valerianas ou a flavonóides semi-sintéticos e não aos valepotriatos (Paladini et al., 1999; Wasowski et al., 2002; Marder et al., 2003, Fernández et al., 2004; Simmen et al., 2005; Tai et al., 2005; Fernández et al., 2006). Existem evidências demonstrando que extratos à base de valepotriatos obtidos de raízes de diferentes espécies de valerianas, os quais são reconhecidamente usados para tratamento de distúrbios do sono e ansiedade, falharam em sua ação sobre o SNC. Pesquisadores, através de experimentos em modelos animais, encontraram que 6-metilapigenina, hesperidina e linarina, três novos flavonóides encontrados em raízes de *V. officinalis* L. e *V. wallichii* DC., eram capazes de formar ligações com os GABA-receptores e desencadear o efeito depressor no SNC (Wasowski et al., 2002; Marder et al., 2003; Fernández et al., 2004; Fernández et al., 2006), mimetizando o efeito provocado pelas ligações dos diazepínicos com os receptores de GABA e desvinculando os valepotriatos de tal atividade pois: (a) diferentes concentrações absolutas e relativas dos valepotriatos contidas nos extratos de diversas valerianas apresentavam efeitos fisiológicos extremamente similares (Hobbs, 1989; Houghton, 1999); (b) estes extratos falharam ao não modificar o metabolismo da glicose no cérebro, teste clássico na determinação de efeito supressor no SNC (Hözl, 1997); (c) freqüentemente formulações comerciais apresentam concentrações muito baixas de valepotriatos nos extratos capazes de desencadear os efeitos fisiológicos, ou eles estão ausentes nos fitomedicamentos, pois valepotriatos tendem a desaparecer rapidamente dos extratos e baldrinais freqüentemente formam polímeros (Bos et al., 1996; Houghton, 1999; Shohet et al., 2001); (d) valepotriatos se decompõem rapidamente em água e pHs ácidos, resultando em compostos baldrinais, os quais são quimicamente muito reativos e formam polímeros e, portanto, preparo de chás e o próprio metabolismo gástrico seriam suficientes para deletar possíveis efeitos (Bos et al., 1996).

I.3. Produção de Metabólitos de Interesse *In vitro*

Na velocidade em que ocorre o fenômeno de extinção das espécies vegetais, quer seja por fenômenos naturais, agressão aos ecossistemas, ou por ação extrativista pela ampla utilização de espécies vegetais na medicina popular e exploração industrial predatória, um enorme número de plantas com propriedades medicinais corre o risco de desaparecer antes de seu valor ser reconhecido ou utilizado. Isto torna ainda mais urgente intensificar os investimentos nesta área. Entretanto, com o pouco que se conhece sobre a biodiversidade das florestas e outros ecossistemas tropicais, torna-se óbvio que o estudo de plantas medicinais no Brasil ainda é fragmentário e escasso. Cerca de 2/3 das espécies de plantas encontram-se nos trópicos, podendo se esperar que descobertas de novos produtos naturais biologicamente ativos possam ser encontrados, por exemplo, em florestas dessas regiões, incluindo, principalmente, as florestas brasileiras. Além disso, apesar das espécies medicinais terem sido caracterizadas quanto aos aspectos botânicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e tecnológicos, sua disponibilidade como matéria-prima para fitoterapia é baixa, em razão da forma totalmente extrativista como vêm sendo exploradas, muitas vezes desconhecendo-se iniciativas de cultivo racional (Raven, 1992; Younes *et al.*, 2000; Barbosa, 2005). Nesse sentido, a micropropagação e cultivo *in vitro* constituem alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse econômico, apesar de as informações científicas sobre plantas medicinais crescerem num ritmo pouco intenso no que se refere aos métodos de propagação e técnicas de cultivo *in vitro* e produção de metabólitos de interesse (Pavarino, 1995; Barbosa, 2005).

Avanços científicos na área da biologia após a metade do século XX proporcionaram o desenvolvimento de dezenas de técnicas biotecnológicas, dentre elas, a clonagem *in vitro*, que estão facilitando a realização de estudos para o aumento de biomassa através da micropropagação e melhorias na produção de metabólitos de interesses oferecidos pelos vegetais. Sob esse aspecto, podem ser empregadas ferramentas biotecnológicas como a cultura de células e tecidos vegetais, não só para obtenção de compostos úteis, como para produção (reprodução) das plantas fornecedoras de produtos farmacêuticos para fins comerciais e ecológicos. A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico via plantas transgênicas ou micropropagadas, tem se mostrado uma forma não convencional de obtenção

de matérias-primas vegetais, que somente nesses últimos 40 anos, começa a ser melhor explorada (Mariot et al., 1999).

O estudo dos processos fisiológicos para obtenção de metabólitos secundários de interesse, seja pela extração direta de seus compostos, quer seja pela infusão de partes das plantas, têm envolvido recentes tecnologias de cultivo *in vitro* por apresentar algumas importantes vantagens: a) evita a instabilidade de certos metabólitos quando produzidos sinteticamente, bem como fornece o produto desejado quando se trata de um composto com estereoquímica específica, uma vez que muitos enantiômeros são de difícil obtenção através de síntese artificial, mesmo quando se usa precursores naturais; b) permite a domesticação da espécie; c) acesso facilitado ao tecido de origem da síntese do metabólito-alvo, pois cultivos *in vitro* permitem a organogênese de determinados órgãos de interesse e o cultivo celular seleciona linhagens de células especificamente relacionadas com a biossíntese dos metabólitos de interesse; d) o fluxo de produção dos vegetais é contínuo, uma vez que, em se tratando de cultura de tecidos, estes podem ser imediatamente clonados e cultivos celulares são prontamente recicláveis; e) redução de custos, pois muitas vezes a produção contínua supera a produção em síntese industrial em termos de economia de custos financeiros; f) adapta-se instantaneamente à demanda do mercado consumidor, já que o fluxo é contínuo; g) exclui a sazonalidade, distribuição geográfica e a interferência do clima nas plantas-alvo devido às condições de cultivo *in vitro* serem altamente controladas e finamente reguladas quando esses fatores interferem nas rotas biossintéticas dos metabólitos de interesse; h) espaço físico reduzido para produção em larga escala; i) exclui a ação de animais e patógenos e doenças nas plantas imprevistas, pois cultivos *in vitro* são realizados assepticamente; j) facilita o estudo da biossíntese de metabólitos secundários, da regulação e acúmulo destes, do isolamento e da elucidação de enzimas envolvidas na rota biossintética, além avaliar com maior fidelidade os efeitos dos nutrientes isoladamente. Durante o acompanhamento da produção (locais de síntese, quantidades, fases de desenvolvimento vegetal, influência da luz, temperatura, humidade) de tais metabólitos pode-se obter um panorama, mesmo que genérico, das rotas biossintéticas, genes envolvidos e mecanismos fisiológicos que interagem na produção dos metabólitos secundários e; k) reduz o extrativismo, que põe em risco de extinção as espécies medicinais de interesse, haja visto que a clonagem via micropropagação é uma alternativa

bastante viável para produção de mudas (Zenk et al., 1977). Apesar dessas vantagens, o cultivo *in vitro* apresenta um revés de grande relevância: nem sempre o metabólito a ser obtido, apresenta vantagens econômicas e tecnológicas, em função da sua baixa produção via cultivo *in vitro*, o que impede que sua produção seja efetuada em escala industrial (Mariot et al., 1999; Zenk et al., 1977).

Desse modo, considerando-se o valor das plantas medicinais, não apenas como recurso terapêutico, mas, também, como fonte de recursos econômicos, torna-se importante estabelecer linhas de ação voltadas para o desenvolvimento de técnicas de cultivo, tendo em vista a utilização das espécies medicinais pelo homem aliada à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (Stasi, 1996; Sheldon et al., 1997). Portanto, no cultivo *in vitro* de plantas medicinais reside uma possível alternativa para solução desses problemas.

Várias espécies de *Valeriana* têm sido cultivadas *in vitro*, seja em cultivo celular, cultura de calos ou micropropagação de estacas, todas com objetivo de extração e produção de valepotriatos em larga escala. Meios sólidos e semi-sólidos (ou líquidos) Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) e Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968) (Apêndice X) têm sido os mais utilizados para micropropagação e cultivo *in vitro* de diferentes espécies da família Valerianaceae. Nove espécies desta família já foram cultivadas com sucesso em meio MS (Apêndice XI) (Becher & Schrall, 1980; Gao & Bjork, 2000). Regeneração de plântulas de *V. wallichii* DC (Mathur, 1992) e *V. edulis* ssp. *procera* (Castillo et al., 2000) foi conseguida a partir de cultura de calos de suplementado com fitormônios auxinas, como ácido naftaleno acético (ANA) e 2,4-Di-cloro-fenóxi acético (2,4-D) e citocinina (cinetina – Kin), sendo que a primeira foi cultivada em meio MS e a última em meio B5. Como regra, tem-se encontrado que, para micropropagação de estacas, gemas apicais e axilares são usadas como explantes em meio sólido usando fitormônios isolados ou em combinações. Dentre eles, auxinas como ANA, ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA), 2,4-D e citocininas como Kin, benzoaminopurina (BAP) têm sido testados. Para cada espécie, o protocolo das concentrações de tais fitormônios é extremamente variável. *V. jatamansi* foi micropropagada com sucesso usando-se BAP isolado ou em combinação com AIA ou ANA (Kaur et al., 1999). Salles e colaboradores (2002) desenvolveram um método para a multiplicação *in vitro* de *V.*

glechomifolia Meyer utilizando gemas axilares e segmentos nodais em meio MS suplementado ou não com BAP, para a produção de biomassa e valepotriatos (Salles et al., 2002).

Em *V. glechomifolia* Meyer, além dos estudos de Salles et al. (1999; 2002) e Silva et al. (2001; 2002), estudos de micropropagação em diferentes meios de cultura mostraram efeito positivo de auxinas lábeis no desenvolvimento de plantas micropropagadas e aclimatadas, bem como na produção de valepotriatos (Carvalho et al., 2004). *V. officinalis* (Gao & Bjork, 2000) e *V. glechomifolia* (Maurmann et al., 2006) têm sido micropropagadas mesmo na ausência de fitormônios.

Outras vias de propagação *in vitro* de outras espécies de Valeriana (*V. edulis* ssp.*procera*) têm sido testadas com sucesso, dentre elas, regeneração indireta via organogênese somática e embriogênese, em meios líquidos e semi-sólidos suplementados com ANA e Kin, derivados de cultura de calos ou de suspensões celulares de folhas. Suspensões celulares apresentaram os melhores resultados para regeneração das plantas, visando posterior extração de valepotriatos (Castillo et al., 2000).

A biossíntese de metabólitos secundários pode ocorrer em todos tecidos e células. Entretanto, muitas vezes a biossíntese é restrita a um tecido particular ou mesmo a células especializadas, correlacionando-se com os processos de diferenciação e desenvolvimento. O grau de desenvolvimento é um fator importante, uma vez que, em muitas espécies, o metabolismo secundário só se inicia quando o metabolismo primário associado ao crescimento cessa (Abdullah et al., 1998). Em alguns casos a produção de metabólitos secundários é restrita a um estágio específico do desenvolvimento (Zhang et al., 2002), órgão (flores, frutos, plântulas, etc.) ou condição ambiental/ecológica, tais como a indução da síntese de metabólitos após um ferimento ou ataque de insetos. Neste caso, a produção de fitoalexinas pode estar vinculada ao surgimento de danos na planta. Portanto, como muitos outros processos biológicos, o metabolismo secundário é expresso de uma maneira específica nas plantas intactas (Pasquali et al., 2006). Para qualquer espécie vegetal em foco essa questão necessita ser investigada em detalhe. O metabolismo primário mostra um alto grau de similaridade entre organismos, especialmente dentro de uma unidade sistemática, e isto favorece generalizações, contrastando com a situação do metabolismo secundário, na qual a produção de compostos secundários é geralmente restrita a um número limitado de organismos

e a bioquímica correspondente é específica e única. Assim, é muito difícil fazer generalizações globais válidas. Como consequência, tem-se que investigar cada grupo de compostos em detalhe e, assim, garantir que os princípios encontrados em uma espécie possam ser aplicados a todas espécies que produzem uma molécula particular (Wink, 1990).

Muitas tentativas têm sido feitas para se conseguir, em nível comercial, compostos secundários a partir de cultura de células e tecidos vegetais (Lounasmaa et al., 1989) e simulações de estresses e de herbivoria, realizadas pela adição de ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e seus respectivos ésteres em cultivos vegetais *in vitro*, são métodos clássicos para se aumentar a produção de metabólitos de interesse. Reconhecidamente, estes compostos são agentes elicitores da rota de biossíntese de terpenos, flavonóides e outros compostos fenólicos (Pitta-Alvarez et al., 2000; Housti et al., 2002; Martin et al., 2002; Zhang et al., 2002; Avancini et al., 2003; Kang et al., 2004; Kessler et al., 2004; Lee et al., 2004; Pastírová et al., 2004; Wang et al., 2004; Zhao et al., 2005). Um elicitor é definido como um composto que induz acumulação de fitoalexinas nas plantas, estimulando algum tipo de resposta de defesa ao estresse (Pitta-Alvarez et al., 2000). Em geral, o elicitor é considerado uma molécula-sinal que age nas células, sendo reconhecida por receptores específicos na membrana plasmática vegetal. AS e AJ têm sido relatadas como moléculas-sinais endógenas, as quais não somente estimulam a resistência aos patógenos e herbívoros mas, se aplicadas exogenamente podem induzir o metabolismo secundário. Farmer and Ryan (1992), propuseram que danos causados por insetos ou ataques patogênicos levariam à uma cascata de respostas nas plantas, cujos compostos-sinais seriam gerados por um sistema de transdução de sinal.

Há muito é conhecido que defesas vegetais podem ser induzidas pelo estresse ou herbivoria, gerando respostas diretas e/ou indiretas. Em resposta ao dano, síntese “de novo” de isoprenóides e compostos fenólicos, como o próprio AS, é induzida (Dicke et al., 1990; Boland et al., 1995; Housti et al., 2002; Zhang et al., 2002). AS é um componente da rota de transdução de sinal na resistência à doenças e considerado como a principal molécula-sinal na resistência sistêmica adquirida (SAR - systemic acquired resistance (SAR) de plantas aos patógenos e por isso tem sido exaustivamente estudado quanto a seu papel na indução de metabólitos secundários (Hammerschmidt, 1999; Menke et al., 1999; Housti et al., 2002;

Zhang et al., 2002; Peng et al., 2004), muito embora, até o presente momento, pouca informação relativa ao mecanismo de indução de metabólitos secundários por AS esteja disponível, exceto para o mecanismo de ação do AS na produção de taxol (Yuan et al., 2002). Evidências têm demonstrado que AS desempenha papel crucial na rota de ativação da expressão de genes *PR* (genes relacionados com a síntese de proteínas de defesa contra patógenos) (Kachroo et al., 2003).

Enquanto que o ataque de patógenos é preferencialmente mediado por AS, ataque de herbívoros, o qual está associado ao dano mecânico/estresse físico, o é por AJ e o reconhecimento da herbivoria por parte do vegetal envolve resposta de defesa ao dano (Baldwin et al., 2001). Jasmonatos são derivados de ácidos graxos voláteis, constituídos de esqueletos de 12 carbonos, oriundos de intermediários de 18 carbonos da rota dos octadecanóides (Memelink et al., 2001). São considerados hormônios vegetais que agem como reguladores de respostas de defesa, sendo igualmente uma molécula-sinal na rota de transdução de sinal na emissão de resposta de defesa vegetal. Em diferentes espécies, diferentes elicitores mostraram induzir biossíntese e acumulação endógena de AJ e AS, culminando com incremento na produção de metabólitos secundários, principalmente de terpenos e alcalóides (Memelink et al., 2001). Mais de 140 espécies vegetais cultivadas *in vitro* responderam com aumento de produção de metabólitos secundários à adição de jasmonatos (Croteau et al., 2000).

Ultrassom (US) também pode ser considerado como dano mecânico porque ele se propaga através dos meios biológicos gerando ondas, as quais se equivalem à uma agitação mecânica, produzindo efeitos nos materiais biológicos de maneira não-intrusiva (Wu and Lin, 2002) e, por isso, AS e AJ podem mediar a cascata de respostas a US, envolvendo genes responsivos à patógenos e danos, respectivamente (Menke et al, 1999). Desta forma, US atua como um elicitor abiótico, induzindo respostas de defesa. A aplicação de US em culturas líquidas induz cavitação acústica e microagitação, que podem provocar danos nas células (Wu & Lin, 2003). Ultrassom de baixa intensidade pode estimular ou inibir atividades biológicas, como as enzimáticas, bio-conversões, biossínteses celulares e alterações nas membranas e outras estruturas celulares, tornando-se uma importante ferramenta em aplicações biotecnológicas (Lin et al., 2001; Liu et al., 2003). Além disso, este método é prático, simples,

rápido, eficiente e econômico e por ser um método físico de elicitação, é considerado "quimicamente limpo".

Sendo assim, AS e AJ podem induzir a expressão de genes relacionados à biossíntese e/ou acúmulo de algumas classes de metabólitos secundários nas plantas, como terpenóides (isoprenóides - Bulgakov et al., 2002; Martin et al., 2002; Sirvent & Gibson, 2002), alcalóides (Pitta-Alvarez et al., 2000; Lee et al., 2001; Martin et al., 2002; Avancini et al., 2003; Gregiani et al., 2004; Kang et al., 2004) e compostos fenólicos (Croteau et al., 2000; Housti et al., 2002) e, uma vez que US causa um dano mecânico, rotas de sinalização mediadas por AS e AJ podem estar envolvidas na resposta a este dano. Além disso, está bem estabelecido que existe uma rede de comunicação entre estas duas rotas de sinalização mediadas por AS e JA, de modo que uma inibição mútua entre ambas pode ocorrer, ativando diferentes conjuntos de genes, incluindo aqueles relacionados à biossíntese de compostos secundários (Kachroo et al., 2003; Gregianini et al., 2004; Zhao et al., 2005).

Vários fatores, além da adição moléculas elicitoras e inibidores, interferem na produção de metabólitos de interesse, como os terpenos: espécie vegetal, tipo e idade do explante (inóculo), tipo e composição do meio de cultura e tempo de cultivo são variáveis que interferem na produção e, muitas vezes, até mesmo nas propriedades farmacológicas, quando o metabólito secundário é de interesse medicinal (Violon et al., 1983; Umnova et al., 1991; Mizuno et al., 1994; Samukawa et al., 1995; Jeong et al., 1997; Castillo et al., 2000). O *background* genético, tipo de tecido, estado fisiológico e idade da planta, bem como fatores ambientais interferem na produção e na qualidade dos princípios ativos (Haralampidis et al., 2002; Lee et al., 2004b). Gao & Bjork (2000) observaram que a variação na produção de valepotriatos extraídos de rizomas e raízes de espécies economicamente exploráveis era muito menor entre as espécies micropropagadas do que entre aquelas propagadas por auto polinização, quando submetidas às mesmas condições ambientais.

Como uma alternativa de se obter compostos bioativos de interesse farmacêutico, produção em sistemas *in vitro* de valepotriatos tem sido avaliada e culturas de calos indiferenciados e vários outros tecidos de *V. officinalis*, *V. wallichii*, *V. glechomifolia*, *Valerianella locusta* L. (espécie asiática), *Centranthus ruber* L.DC. e *C. macrosiphon* têm sido exploradas (Violon et al., 1983; Salles, 1999; Castillo et al., 2000; Silva, 2001; Salles et

al., 2002; Silva et al., 2002). Adição de moléculas elicitoras tipo fitormônios e/ou fitorreguladores isolados ou em combinações aos meio de cultivo, além de promoverem crescimento e regeneração de plantas, também podem incrementar a produção de metabólitos. Valepotriatos foram obtidos em concentrações consideráveis em *V. wallichii* (Mathur, 1992) e *V. edulis* ssp. *procera* (Castillo et al., 2000) com uso combinado de auxinas e citocininas. Salles e colaboradores (2002) desenvolveram um método para a multiplicação *in vitro* de *V. glechomifolia* Meyer para a produção de biomassa e valepotriatos sem adição de BAP e análises quantitativas dos valepotriatos efetuadas através de HPLC (CLAE) de fase reversa revelaram que sem a adição deste hormônio em especial, a produção de valepotriatos era maior do que plantas cultivadas à campo, embora Carvalho et al. (2004) tenham observado que adição de auxinas lábeis resultava em rendimento de cerca de 3% (peso seco) de valepotriatos depois de 3 meses de passagem para solo. Calos, suspensões celulares e culturas de raízes não transformadas também foram capazes de produzir valepotriatos, evidenciando relação direta com o crescimento, sendo que cultivos de raízes apresentaram rendimento similar ou superior ao de plantas micropropagadas e aclimatadas (Maurmann et al., 2006). Culturas líquidas e sem adição de fitormônios de plântulas inteiras de *V. glechomifolia* Meyer também se revelaram em um sistema conveniente e rápido (28 dias de cultivo) para produção de biomassa e produção de valepotriatos, mantendo a relação direta entre crescimento e produtividade. (Russowski et al., 2006).

Cultura de raízes transformadas de *V. officinalis* forneceram quantidades apreciáveis de valepotriatos quantificados por HPLC (Gränicher et al. (1994). Através da infecção por *Agrobacterium rhizogenes*, o aumento no conteúdo de metabólitos secundários permite a indentificação de novos produtos que, sob circunstâncias normais de produção, não puderam ser detectados em função de sua baixa concentração. Muitos dos valepotriatos existentes em diferentes espécies de valeriana puderam então ser identificados (Gränicher et al., 1995a). A mesma abordagem foi utilizada por Banerjee et al. (1998) em cultura de raízes em meio MS de *V. wallichii* DC., induzidas por cepas A(4) e LBA 9402 de *A. rhizogenes*, onde a última apresentou os melhores resultados nas análises quantitativas em HPLC tanto para valepotriatos totais, como individuais. O tempo de indução também se revelou como um importante parâmetro na produção dos mesmos, sendo que culturas de 20 semanas de idade na presença

de A(4) ou LBA 9402 apresentaram os melhores rendimentos. Caetano et al. (1999) obtiveram um acréscimo de sete vezes na produção de valepotriatos em cultura de células de raízes transformadas por *A. rhizogenes* de *Valerianella discoidea*. Na mesma linha de investigação, raízes de *V. locusta* foram transformadas por cepas de *A. rhizogenes* (A4 e ATCC 15834) e tratadas com elicitores bióticos (Metil jasmonato, ácido salicílico e extrato de leveduras) e abióticos (CuSO_4 , HgCl_2 , CaCl_2) para fins de incremento na produção de valepotriatos; metil jasmonato causou um aumento de sete vezes na produção de valepotriatos totais para o cultivo de raízes e este valor se eleva para 50 e 12 vezes para o cultivo de plântulas e calos, respectivamente, quando comparados aos valores obtidos nas mesmas condições de cultivo de *Valeriana thalictroides* Graebn (espécie asiática) (Kittipongpatana et al., 2002). Souret et al. (2002) encontraram em cultura de raízes transformadas de *Artemisia annua* concentrações de artemisina (sesquiterpenóides) superiores às de plantas intactas. O uso de cultura de raízes transformadas (Kittipongpatana et al., 2002; Souret et al., 2002) ou não (Martin et al., 2002) em combinação com tratamento de elicitores representa, atualmente, uma nova rota para a produção de grandes quantidades de valepotriatos e outros terpenos de interesse.

Outros gêneros produtores de valepotriatos da família Valerianaceae também têm sido investigados. Cultura de raízes transformadas por *A. rhizogenes* de *Centranthus ruber* DC cultivadas em meio B5 e sem adição de fitormônios promoveram aumento na produção de valepotriatos (Gränicher et al., 1995b). Plantas desta mesma espécie, foram regeneradas a partir de cultura de calos derivados de células radiculares, cujas raízes foram induzidas por cepas LBA 9402 de *A. rhizogenes* contendo plasmídeo 1855, em meio MS suplementado com várias combinações de fitormônios e fotoperíodo controlado. Raízes de plantas transgênicas de dois anos de idade mantidas em casa de vegetação ainda eram capazes de produzir valepotriatos em concentrações consideráveis (Vitali & Ventrone, 2002). *A. rhizogenes* provoca comportamento neoplásico em células radiculares vegetais, as quais apresentam altas taxas de crescimento e estabilidade genética, permitindo maior abundância na produção de metabólitos secundários ou, pelo menos, quantidades comparáveis às das plantas intactas (in natura). Raízes transformadas por *A. rhizogenes* são capazes de regenerar plantas geneticamente estáveis como plantas transgênicas ou clones. A propriedade de crescimento rápido e alta frequência de regeneração se constitui em um método elegante e seguro para

propagação clonal e produção de metabólitos de interesse, principalmente para espécies arbóreas e lenhosas (Giri & Narasu, 2000).

Outra vantagem do cultivo asséptico *in vitro*, além da micropropagação e aumento da produção de metabólitos secundários é permitir a elucidação de vias biossintéticas de metabólitos de interesse (Lounasmaa *et al.*, 1989; Pitta-Alvarez *et al.*, 2000; Avancini *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004; Kessler *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Pastírová *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005).

A identificação por uma via preferencial de biossíntese de IPP para produção de terpenos tem sido bastante investigada tanto em procariotos (Grolle *et al.*, 2000; Hamano *et al.*, 2002; Grieshaber *et al.*, 2004), como eucariotos (Bouvier *et al.*, 1998; Josekutty, 1998; Chahed *et al.*, 2000; Korth *et al.*, 2000; Zeidler *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2001; Loreto & Velikova, 2001; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001; Sponsel, 2001; Nagata *et al.*, 2002; Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2002; Crowell *et al.*, 2003; Hemmerlin *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2003; Laule *et al.*, 2003; Palazon *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Argyrou & Blanchard, 2004; Loreto *et al.*, 2004; Massé *et al.*, 2004; Ge & Wu, 2005; Liu *et al.*, 2005). O uso de inibidores enzimáticos específicos como estatinas para inibição de HMGR (Rota do MVA) e fosmidomicina para DxPR (Rota da DxP) para produção de IPP e, conseqüentemente de terpenóides em diferentes sistemas de cultivo, tem se tornado uma abordagem freqüente, por ser um método fácil na identificação de rotas biossintéticas. Nesse sentido, a identificação da rota preferencial de biossíntese de IPP para produção de determinados terpenos tem se valido desta estratégia (Bouvier *et al.*, 1998; Josekutty, 1998; Chahed *et al.*, 2000; Grolle *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2000; Zeidler *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2001; Loreto e Velikova, 2001; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001; Sponsel, 2001; Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Nagata *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2002; Crowell *et al.*, 2003; Hemmerlin *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2003; Laule *et al.*, 2003; Palazon *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Argyrou & Blanchard, 2004; Grieshaber *et al.*, 2004; Loreto *et al.*, 2004; Massé *et al.*, 2004; Ge & Wu, 2005), associada ou não à ferramentas de manipulação transgênica ou à bioinformática no desenho de novos inibidores (Chahed *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001; Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Hamano *et al.*, 2002; Mahmoud & Croteau, 2002;

Okada et al., 2002; Hemmerlin et al., 2003; Lange & Ghassemian, 2003; Argyrou & Blanchard, 2004; Grieshaber et al., 2004; Page et al., 2004).

OBJETIVOS E HIPÓTESES

Tendo em vista o exposto, a presente investigação teve por objetivo geral desenvolver um sistema de cultivo asséptico de *Valeriana glechomifolia* em meio líquido capaz de crescer de forma vigorosa e produzir valepotriatos, de modo a constituir um sistema experimental voltado à identificação de fatores regulatórios da biossíntese de valepotriatos e outros metabólitos acumulados por esta espécie, além de propiciar uma possível fonte renovável e sustentada destes metabólitos.

De modo específico, almejou-se testar as seguintes hipóteses:

- a) Plantas inteiras micropropagadas de *V. glechomifolia* cultivadas temporariamente em meio líquido constituem um sistema viável de produção de valepotriatos para investigação bioquímica e fisiológica.
- b) A composição e concentração de nutrientes do meio de cultura afetam o crescimento e o acúmulo de valepotriatos de forma similar, ou seja, em meio líquido, a relação entre crescimento e produção de valepotriatos é direta.
- c) A presença de luz aumenta a produção de valepotriatos por estimular a produção de IPP pela via plastídica, responsável pela produção deste precursor para monoterpenos e derivados.
- d) O uso de inibidores específicos da via mevalonato-dependente e da via da DxPS afeta de forma diferenciada a produção de valepotriatos, indicando a predominância de fornecimento de IPP pela segunda.
- e) Fatores de sinalização de ataque patogênico, herbivoria e dano mecânico aumentam o metabolismo secundário de *V. glechomifolia*, resultando em maiores acúmulos de valepotriatos e compostos fenólicos.

Para descrever o teste destas hipóteses, esta Tese está dividida em dois capítulos envolvendo dados experimentais. No primeiro (Cap. II), já publicado, é relatado o estabelecimento de um sistema de cultivo asséptico em meio líquido para *V. glechomifolia*, avaliando parâmetros de crescimento, morfométricos e a produção de

valepotriatos na presença e ausência de luz. No segundo (Cap. III), a ser submetido à publicação, avalia-se o papel do ácido jasmônico, ácido salicílico e ultrassom no crescimento, produção de valepotriatos e compostos fenólicos em plantas de *V. glehomiifolia* desenvolvidas no sistema de meio líquido. Ao final, são apresentadas considerações finais e perspectivas a partir destes trabalhos.

CAPÍTULO II

Plant Cell Tiss Organ Cult (2006) 86:211–218
 DOI 10.1007/s11240-006-9109-z

ORIGINAL PAPER

Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures

Denise Russowski · Natasha Maurmann ·
 Sandra Beatriz Rech ·
 Arthur Germano Fett-Neto

Received: 17 January 2006 / Accepted: 5 April 2006 / Published online: 7 July 2006
 © Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract A system for growing in liquid medium whole plants of *Valeriana glechomifolia*, endemic to southern Brazil and capable of accumulating bioactive valepotriates, is described. Murashige and Skoog (MS) and Gamborg B5 (B5) media (1.0×, 0.3× and 0.1× strength) without phytohormones were evaluated after four weeks of culture in relation to growth and valepotriate yield. Plants grown in 1.0× MS displayed greatest growth and valepotriate yields and the study of the light condition showed that plants grown under light and dark had similar weight increase and maximum valepotriate yield, 27.2 mg/g DW and 25.0 mg/g DW, respectively. Valtrate was the most abundant valepotriate, followed by acevaltrate and didrovaltrate.

Keywords Micropropagation · Light ·
Valerianeae · *Valeriana glechomifolia* ·
 Valepotriates

Abbreviations

ACE	Acevaltrate
DID	Didrovaltrate
B5	Gamborg B5 medium
GI	Growth Index
MS	Murashige and Skoog medium
VAL	Valtrate

Introduction

Plants of the genus *Valeriana* have sedative, antispasmodic and relaxing properties attributed to the iridoid esters, known as valepotriates (Backlund and Moritz 1998), as well as to the valerenic acids. These molecules are predominantly produced in the subterranean parts of intact plants (Houghton 1999; Herrera-Arellano et al. 2001). Valepotriates also have been shown to have antifungal (Fuzzati et al. 1996) and cytotoxic (Bounthan et al. 1981; Bos et al. 1998a) activities. As an alternative to obtain these active compounds of pharmaceutical interest, some species have been investigated: *V. officinalis*, cultivated in Europe on a large scale (Bos et al. 1998b); *V. wallichii*, native to the Himalayas (Mathur et al. 1988), and *V. edulis* originated from Central America (Castillo et al. 2002).

D. Russowski · N. Maurmann · A. G. Fett-Neto (✉)
 Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e
 Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Caixa
 Postal 15005, 91501-970 Porto Alegre, Brazil
 e-mail: fettneto@cbiot.ufrgs.br

S. B. Rech
 Programa de Pós Graduação em Ciências
 Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752,
 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

Valeriana glechomifolia is an endemic species of southern Brazil, capable of accumulating in all of its organs the terpene derivatives valepotriates (Silva et al. 2002). The plant can not be easily propagated by seeds and was successfully propagated in vitro through tissue culture (Salles et al. 2002). The growth kinetics in solid medium demonstrated that the continuous presence of 5.71 μM of IAA yielded plants with stable levels of valepotriates (De Carvalho et al. 2004). However, its small size and low biomass of individuals require an efficient system to improve the production of genetically homogeneous plants and to provide a source of bioactive compounds for the long term supply of crude drugs.

Liquid cultures are ideal in micropropagation for vigorous growth, reducing plantlet production costs and for automation (Etienne and Berthouly 2002). Bioreactor technologies are regarded as key factors for mass propagation of selected sterile plants in optimized environmental conditions, and experimental equipment for shoot cultures have been developed with the aim of reducing the production cost while maximizing plant growth (Bondarev et al. 2003; Murch et al. 2003; Liu et al. 2004). However, most of the shoot cultures are sensitive to shear stress and may vitrify after prolonged liquid culture (Liu et al. 2001). Therefore, the objective of the current study was to develop a liquid system that can provide adequate biological requirements for in vitro propagation of whole *V. glechomifolia* plantlets, and to further investigate factors modulating biomass generation and phytochemical composition of the plants.

Materials and methods

Plant material

Shoot tips (1 cm) isolated from two-month-old micropropagated *V. glechomifolia* were obtained as described by Salles et al. (2002). Plantlets used in the experiments were grown on MS medium (Murashige and Skoog 1962) containing 3% sucrose and 0.6% agar (extra pure, Merck), at pH 5.7. Prior to inoculation in liquid medium, plantlets were grown in 25 ml solid medium for eight

weeks, maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, under a 16 h photoperiod provided by cool white fluorescent lamps (approximately $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Plantlets weighing $0.65 \pm 0.19 \text{ g}$ (mean \pm SD, $n = 530$) were placed on circular membranes with a small central orifice (to allow roots to contact the medium) and transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of MS or B5 (Gamborg et al. 1968) medium, at full, 0.3 \times or 0.1 \times strength, containing 3% sucrose, without plant growth regulators, and capped with aluminum foil (Fig. 1A). Plantlets were grown on a rotatory shaker (Innova 2350, New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ) at 100 rpm under the same conditions described above. After four weeks, the residual medium volumes were recorded and plantlets were rinsed, blotted dry, and their FW was measured. Then, plants were freeze-dried for DW and valepotriate determination. Culture media were also freeze-dried for analysis of released valepotriates. In order to minimize differences in growth that may have been the result of variation in initial plantlet size, the Growth Index (GI) = $(\text{weight}_{\text{final}} - \text{weight}_{\text{initial}}) / \text{weight}_{\text{initial}}$, was also used to evaluate growth.

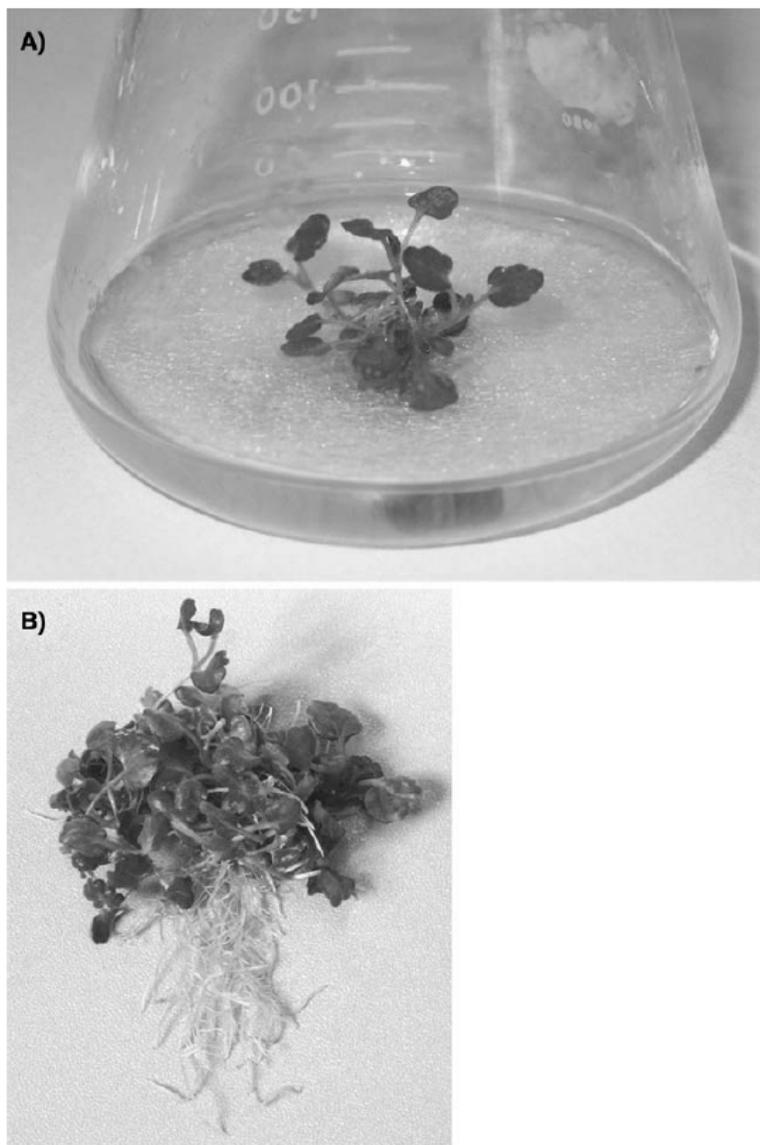
In a second set of experiments, plantlets were grown in 1.0 \times MS medium under the same conditions described above, and plant development and valepotriate contents were evaluated at seven-day intervals for seven weeks. Every week, the residual medium volumes were recorded, and plants were rinsed, blotted dry, and, after fresh weight and growth index determination, plants were freeze-dried for measuring the DW and valepotriate content.

In a third set of experiments, plants were grown on 1.0 \times MS medium as described above and were kept under dark and light conditions. Growth index, DW, root and leaf number, and valepotriate yields were recorded at seven-day intervals for 35 days.

Valepotriate extraction and analyses

The chemical extraction of the lyophilized in vitro cultures and nutrient solutions and the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis of valepotriates were performed according to Silva et al. (2002). The powdered material

Fig. 1 *V. glechomifolia* liquid culture propagation system: **(A)** Two-month-old plants grown on solid medium transferred to a membrane raft and cultured in 250 ml flask containing 50 ml of liquid medium without plant growth regulators. **(B)** Plant after four weeks of growth on 1.0× MS liquid medium (width of shoots = ~5 cm)



was extracted four times at room temperature with chloroform under 20 min sonication (Ultrasonic®, São Paulo, Brazil). The extract was dissolved in methanol to obtain a concentration of 1 mg/ml, filtered through a membrane filter (0.22 μm pore size, Merck) and analysed by HPLC in a Shimadzu instrument consisting of a LC-10AD pump, a SPD-10A UV detector and an automatic injector (SIL-10^A) with a 20 μl sample

loop. A Waters Nova-Pack C18 column (4 μm , 3.9 \times 150 mm i.d. with Waters Nova-Pack C18 guard column, 60 Å , 3.9 \times 20 mm) was the stationary phase; the mobile phase was isocratic: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 50:50 (v/v); flow rate of 1 ml min^{-1} . Detector sensitivity was set to 1.0 AUF; wavelengths used were 254 nm (dienic valepotriates) and 208 nm (monoenic valepotriate). Valtrate, acevaltrate and didrovaltrate, used as external

standards, were isolated from *V. glechomifolia* as described by Salles et al. (2000). The valepotriates (10 mg each) were individually dissolved in methanol, diluted stepwise (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 and 0.03125 mg/ml), and 10 μ l were injected into the HPLC in triplicate. The calibration plots were generated by measuring their respective peak areas and linear regression equations were calculated.

Statistical analysis

In all of the experiments, the layout was totally randomized. All treatments had five replicates and each experiment was independently carried out at least three times. One-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) and Duncan test were applied with a critical value of $P \leq 0.05$. Data transformation was done as recommended to satisfy ANOVA requirements (Sokal and Rohlf 1981).

Results and discussion

Valeriana glechomifolia grown in liquid medium produced plants with significant increase of biomass without hyperhydricity (Fig. 1B) when compared with plants grown in semi-solid medium (De Carvalho et al. 2004). The higher growth values could be explained by a better contact between the explants and liquid medium, which increases the availability and ability for nutrient uptake, and by the aeration provided by agitation. Biomass produced after four weeks of culture was influenced by the concentration of the medium with better values displayed by plants grown in MS and B5 full concentration (Fig. 2 A, B).

Valepotriate yields also improved with media concentration (Fig. 2C), except for 1.0 \times B5 grown plants, in which the content of these metabolites did not increase, even with a corresponding better growth. The most prominent difference between MS and B5 media is the lower $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio present in B5 medium. It is possible that this difference in proportion of N sources, combined with full strength concentration, may have influenced valepotriate yields. Similar results have been reported for taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*, which were influenced by

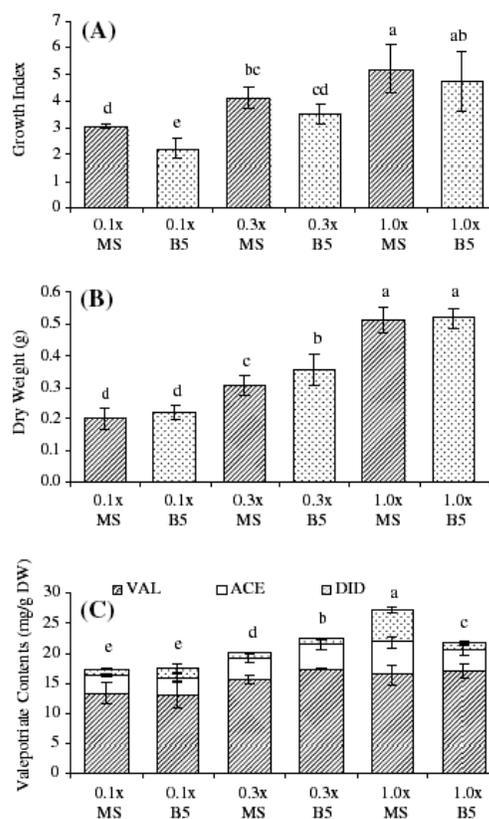


Fig. 2 Effect of MS (Murashige and Skoog) and B5 (Gamborg B5) media on growth (A and B) and valepotriate contents (VAL—valtrate, ACE—acevaltrate, DID—didrovaltrate) (C) of *V. glechomifolia* plants grown in liquid culture. Values are means of three different experiments \pm SD ($n = 15$). Bars sharing a letter within graphs are statistically equivalent ($P < 0.05$)

the nitrogen source, proportion and concentration in the medium (Chen et al. 2003). Nevertheless, except for 1.0 \times MS medium, the responses to changes in nutrient composition had only minor effects on the ratio of individual valepotriates accumulated in the plants. The overall data indicate a growth-dependent accumulation of valepotriates in plants of *V. glechomifolia*, in agreement with previous data reported for transformed root cultures of *Valerianella* sp. (Kittipongpatana et al. 2002).

The analysis of valepotriates in the nutrient solution demonstrated that the plants spontaneously released small quantities of these

compounds. The analysis, performed in the different media after four weeks of growth, yielded approximately 0.5 mg/l medium of total valepotriate yields (data not shown), maintaining the same the ratio of individual valepotriates accumulated in the plants. Considering the relatively small concentrations of valepotriates released by the plants to the liquid medium, the quantification on the nutrient solution was not further analysed nor added to the valepotriate concentration in plants for yield determination. Reports showing that valepotriates were entirely retained in tissues of hairy root cultures of *V. officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan (Gränicher et al. 1992) and in hairy root cultures of *V. wallichii* DC (Banerjee et al. 1998) are in agreement with the small release observed in the whole plant cultures of *V. glechomifolia*. Nevertheless, the permeabilization of cells and tissues for secondary metabolite release can be investigated with techniques described for other medicinal plants (Gontier et al. 2002).

The comparison of results of growth and valepotriate production indicated the use of 1.0× MS medium for further experiments. Although not tested in the present study, an intermediate concentration between 0.3 and 1.0× MS may yield equivalent results on these parameters compared to 1.0× MS. The study of plant growth kinetics showed that 1.0× MS medium contained enough nutrients to allow a growth cycle of seven weeks for *V. glechomifolia* plants; there was a four-day lag phase before plants started to grow. Dry weight (Fig. 3A) and GI (Fig. 3B) of the plants increased progressively up to six weeks (0.73 ± 0.05 g and 7.94 ± 1.4 , respectively). Weight decreased to 0.52 ± 0.12 g (GI 7.3 ± 1.3) by day 49. Plants grown for 28 days grew normally after ex-vitro transfer and resulted in plants of normal morphology (data not shown). Total valepotriate yields decreased during the lag phase and started to increase steadily from 14.1 ± 2.6 mg/g DW on day 7 to reach a maximum of 27.2 ± 4.7 mg/g DW on day 28 (Fig. 3A). The valepotriate contents decreased rapidly after 35 days to 10.8 ± 2.5 mg/g DW on day 42, whereas plant weight decreased by day 49. The production of VAL and ACE was highest on day 28 (16.1 ± 1.7 and 5.2 ± 1.4 mg/g DW, respec-

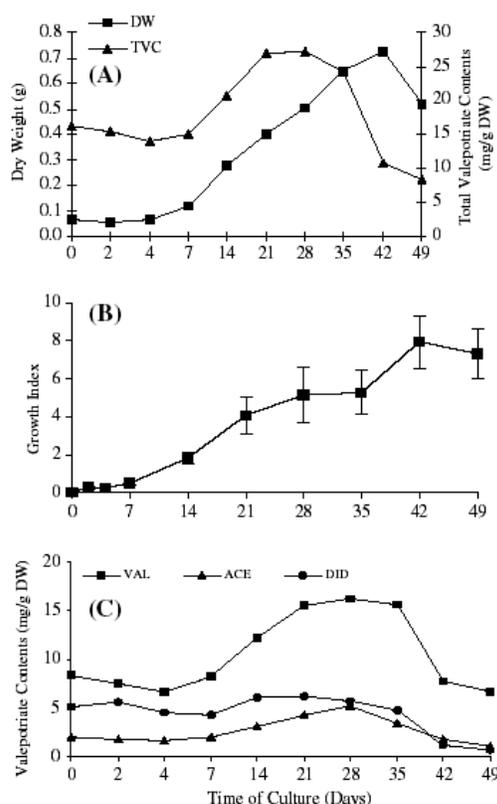


Fig. 3 Time-course study of growth and valepotriate production in plants of *V. glechomifolia* cultured in 1.0× MS liquid medium containing 3% sucrose. (A) Dry weight and total valepotriate contents (TVC), (B) Growth index (GI), (C) Individual valepotriate contents (mg/g DW). Values are means of four different experiments, bars = \pm SD ($n = 15$)

tively), whereas DID concentration was highest on day 21 (6.2 ± 1.4 mg/g DW) (Fig. 3C).

Light is an important physical factor, which influences growth, development and the formation of primary and secondary metabolites (Rout et al. 2000). The analysis of *V. glechomifolia* growth in liquid culture under light and dark conditions showed that light-grown plants yielded higher GI by 21 days of culture, although equivalent GIs were seen later for the treatments (Fig. 4A); a similar increase in number of leaves throughout the culture period was observed both under light and dark conditions (Fig. 4B). Higher numbers of roots started to be observed after 28 days of growth in dark treatment (Fig. 4C).

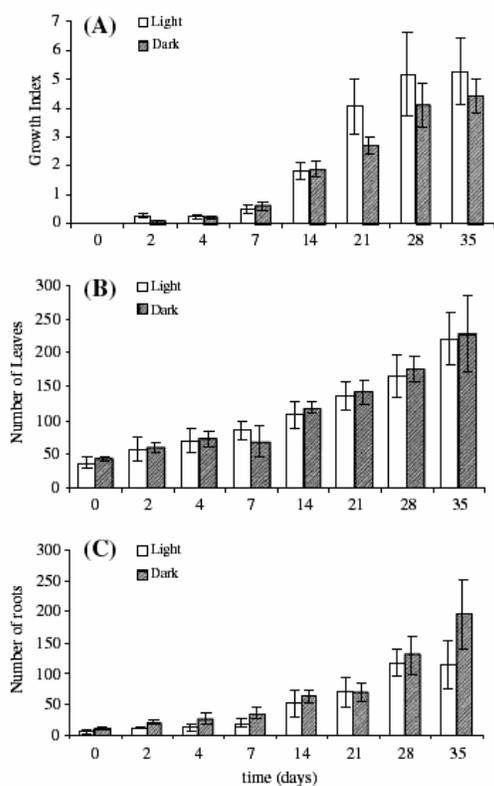


Fig. 4 Comparative growth of *V. glechomifolia* plants cultured in 1.0× MS medium under light ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and dark conditions. (A) Growth Index (B) Number of leaves and (C) Number of roots. Values are means of three different experiments \pm SD ($n = 15$)

After 14 days of culture, dark-grown plants started to show chlorosis, which was intensified toward the end of the incubation period; however, plants were still viable at the end of the experiments. The maximum valepotriate contents were observed after four ($27.2 \pm 5.9 \text{ mg/g DW}$) and five ($25.0 \pm 4.9 \text{ mg/g DW}$) weeks in the cultures growth under light and dark conditions, respectively (Fig. 5A, B, C and D). In both cases, the major valepotriate was valtrate and valepotriate contents were equivalent or higher than those reported for the intact plant of *V. glechomifolia* (Silva et al. 2002), with no significant difference in total valepotriate contents between light and dark-grown plants or in valepotriate release to the medium. In vitro callus and root differentiated tissue cultures of *V. officinalis*, *Centrathus ruber*

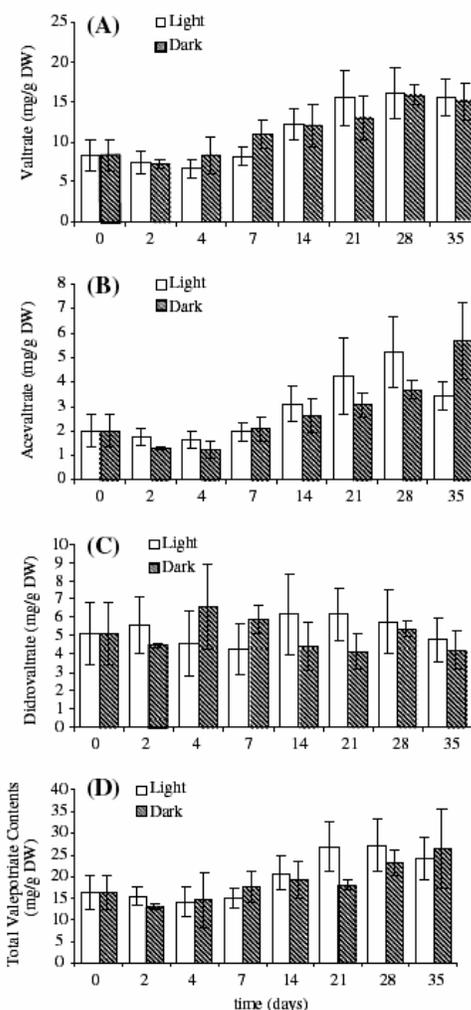


Fig. 5 Valepotriate yields (mg/g DW) accumulated by *V. glechomifolia* plants cultured in 1.0× MS medium under light ($45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and dark conditions. (A) Valtrate, (B) Acevaltrate, (C) Didrovaltrate, (D) Total valepotriate contents. Values are means of three different experiments \pm SD ($n = 15$)

and *C. macrosiphon* grown in continuous dark showed, in several cases, higher valepotriate contents than the roots of intact plants (Violon et al. 1984), indicating that light is not an indispensable physical condition for valepotriate formation. Similar results have been reported for valepotriate accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *V. glechomifolia* (Maurmann et al. 2006).

The limited effects of light and darkness on metabolite yield suggest that valepotriate production may rely on combined sources of isopentenyl pyrophosphate supplied by the mevalonate (MVA) and deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) pathways (Lange et al. 1999). Future studies should focus on the relative participation of these pathways in the biosynthesis of valepotriates.

Propagated *Valerianeae* have been shown to maintain stable valepotriate production comparable to or even higher than field-grown plants. Micropropagated *V. officinalis* plants showed less variation than seed propagated plants in contents of active constituents (Gao and Björk 2000). In another study performed with *V. edulis*, Castillo and co-workers (2002) showed that the contents of valepotriates from roots and rhizomes of *in vitro* regenerated plants were comparable to the same parts of wild plants in reproductive stage. Micropropagated plants of *V. glechomifolia* showed similar or higher contents of valepotriates compared to wild plants after three months of acclimatization (De Carvalho et al. 2004).

In conclusion, *V. glechomifolia* can be successfully propagated in liquid medium without growth regulators, and the system developed in this work can provide stable biomass and valepotriate production by whole-plant liquid culture. Valepotriate contents of liquid medium cultured plants were higher than those observed in field-grown plants. Considering the ease of medium adjuvant supply and uptake surface, and the control of environmental factors, this whole plant culture system can be useful to produce phytochemicals from *V. glechomifolia* and to study their metabolism.

Acknowledgements The authors are grateful to the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPERGS for financial support. We would also like to thank Prof. Dr. Pedro R. Petrovick (Faculdade de Farmácia, UFRGS) for lending the HPLC equipment.

References

- Backlund A, Moritz T (1998) Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochem Syst Ecol* 26:309–335
- Banerjee S, Rahman L, Uniyal GC, Ahuja PS (1998) Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Sci* 131:203–208
- Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A (2003) Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Sci* 165:845–850
- Bounthan C, Bergmann C, Beck JP, Haag-Berrurier M, Anton R (1981) Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. *Planta Med* 41:21–28
- Bos R, Hendriks H, Scheffer JJC, Woerdenbag HJ (1998a) Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine* 5:219–225
- Bos R, Woerdenbag HJ, van Putten FMS, Hendriks H, Scheffer JC (1998b) Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Med* 64:143–147
- Castillo P, Zamilpa A, Márquez J, Hernández G, Lara M, Alvarez L (2002) Comparative study of differentiation levels and valepotriate content of *in vitro* cultures and regenerated and wild plants of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *J Nat Prod* 65:573–575
- Chen Y-Q, Fei Y, Cai M, Lou J-X (2003) Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*. *Plant Growth Reg* 41:265–268
- De Carvalho CMB, Maurmann N, Luz DI, Fett-Neto AG, Rech SB (2004) Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. *Plant Cell Rep* 23:251–255
- Etienne H, Berthouly M (2001) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69:215–231
- Fuzzati N, Wolfender JL, Hostettmann K, Msonthi JD, Mavi S, Molleyres LP (1996) Isolation and antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. *Phytochem Anal* 7:76–85
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Gao XQ, Björk L (2000) Valerenic acids and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. *Fitoterapia* 71:19–24
- Gontier E, Clément A, Gravot TA, Lièvre A, Guckert F, Bourgaud F (2002) Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. *Plant Sci* 163:723–732
- Gränicher F, Christen P, Kapetanidis I (1992) High-yield production of valepotriates by hairy roots cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. *Plant Cell Rep* 11:339–342
- Herrera-Arellano A, Luna-Villegas G, Cuevas-Uriostegui ML, Alvarez L, Vargas-Pineda G, Zamilpa-Alvarez A, Tortoriello J (2001) Polysomnographic evaluation

- of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Med* 67:695–699
- Houghton PJ (1999) The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *J Pharm Pharmacol* 51:505–512
- Kittipongpatana N, Davis DL, Porter JR (2002) Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71:65–75
- Lange BM, Croteau R (1999) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: Cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365:170–174
- Liu CZ, Murch SJ, El-Demerdash M, Saxena PK (2004) *Artemisia judaica*: Micropropagation and antioxidant activity. *J Biotechnol* 110:63–71
- Liu CZ, Honda KH, Kobayashi T (2001) In situ regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus immobilized in polyurethane foam. *J Biosci Bioeng* 91:76–80
- Mathur J, Ahuja PS, Mathur A, Kukreja AK, Shah NC (1988) In vitro propagation of *Valeriana wallichii*. *Planta Med* 54:82–83
- Maurmann N, De Carvalho CMB, Silva AL, Fett-Neto AG, von Poser GL, Rech SB (2006) Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:50–53
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Murch SJ, Liu C, Romero R, Saxena PK (2003) *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 73:63–68
- Rout GR, Samantary S, Das P (2000) *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv* 18:91–120
- Salles LA, Silva AL, Rech SB, Zanatta N, von Poser GL (2000) Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochem Syst Ecol* 28:907–910
- Salles LA, Silva AL, Fett-Neto AG, von Poser GL, Rech SB (2002) *Valeriana glechomifolia*: *In vitro* propagation and production of valepotriates. *Plant Sci* 163:165–168
- Silva AL, Rech SB, von Poser GL (2002) Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. *Planta Med* 68:570–572
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*. W. H. Freeman, San Francisco
- Violon C, Dekegel D, Vercruyse A (1984) Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues of Valerianeae. *J Nat Prod* 47:934–940

CAPÍTULO III

Ultrasound and signalling molecules elicit valepotriates but not phenolics production in whole-plant liquid cultures of *Valeriana glechomifolia*

Denise Russowski¹, Natasha Maurmann¹, Sandra Beatriz Rech², Arthur Germano Fett-Neto^{1,*}

¹Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Caixa Postal 15005, 91501.970 Porto Alegre, RS, Brazil; ² Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, 90610.000 Porto Alegre, RS, Brazil. *Author for correspondence (phone: 55-51-33087642, fax: 55-51-33087309; e-mail: fettneto@cbiot.ufrgs.br)

Abstract

Valeriana glechomifolia (Valerianaceae) is an endemic species of southern Brazil capable of accumulating the bioactive terpenoid-derivatives valepotriates. Whole-plants of *V. glechomifolia* grown in MS liquid medium were submitted to the pathogen-defense or herbivory signalling molecules salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) or to mechanic stress simulated by ultrasound (US) exposure. Growth of the cultures and the production of valepotriates (valtrate, acevaltrate and didrovaltrate) and total phenolics were quantified by HPLC and by spectrophotometry, respectively. Whole plants exposed to SA 0.1 mM for 96 hours, JA 0,05mM for 3 days or to US for 2.5 min at the 7th and 14th days of culture, showed higher valepotriate production than control plants. Maximum increases in valepotriate yield induced by the treatments ranged from 1.7 to 1.8-fold. Total phenolics were not elicited by the same treatments; SA caused a slight decrease in the content of total phenolics. Nutrient medium analyses did not show significant release of valepotriates or phenolic compounds by plants exposed to all tested agents. Salicylic Acid and JA caused partial damage to shoots,

affording a decrease in dry weight (DW), whereas US did not affect this parameter. The inhibitors of the mevalonate-dependent and plastidic pathways for terpene biosynthesis, mevinolin and fosmidomycin, respectively, showed similar effects on overall valepotriate inhibition, indicating that valepotriate biosynthesis relies on both cytosolic and plastid pools of isopentenyl pyrophosphate. The results indicate the viability of biotic and abiotic eliciting treatments to specifically improve valepotriate yields in whole plant cultures of *V. glechomifolia*, as well as to provide further insights on the biosynthesis and function of these metabolites.

Keywords: Biotic and abiotic elicitors . Stress . Monoterpenes . Iridoids . Phenolics.

Abbreviations:

DW: Dry Weight . FW: Fresh Weight . GABA: γ -aminobutyric acid . GI: Growth Index .
IPP: Isopentenyl Pyrophosphate . JA: Jasmonic Acid . MS: Murashige and Skoog medium .
SA: Salicylic Acid . US: Ultrasound

Introduction

The genus *Valeriana* belongs to the Valerianaceae family and encompasses between 300 and 400 species (Backlund and Moritz, 1998), many of which occur in South America (Larsen, 1986). Currently, 17 Brazilian species are known, 12 of which are native of the state of Rio Grande do Sul (Sobral, 1999a; b; c). This family is characterized by the production of the monoterpene derivatives valepotriates (valeriana-epoxy tri-esters) (Backlund and Moritz, 1998; Gao and Bjork, 2000; Bos et al., 2002), which are often accumulated in the roots and rhizomes of plants (Keochanthabounthan et al., 1993; Bos et al., 1998b; Banerjee et al., 1998; Herrera-Arellano et al., 2001, Castillo et al., 2002). *Valeriana glechomifolia*, a Southern Brazilian endemic species is capable of accumulating valepotriates in both roots and shoots (Salles et al., 2000; Silva et al., 2002). Phytomedicines from root extracts containing valepotriates and other compounds from different valerian species, have been employed as

alternatives to the use of diazepinic medicines for treating sleeping disturbs and anxiety because of their presumed mild sedative effects and reduced secondary and dependence effects (Andreatini and Leite, 1994; Houghton, 1999; Andreatini et al., 2002, Bent et al., 2006). Recent studies from different animal models have reported that the CNS depressant effects may be caused by natural flavonoids from roots of several species of valerians and not by valepotriates (Wasowsky et al., 2002; Marder et al., 2003; Fernández et al., 2004; Simmen et al., 2005; Fernández et al., 2006). Therefore, the exact active principles behind Valerian sedative effects have not been clearly established. However, valepotriates also have other interesting properties, such as antifungal (Fuzzati et al., 1996) and cytotoxic (Keochanthabounthanh et al., 1993; Bos et al., 1998a; Hui-lian et al., 2003) activities.

Valepotriates are lipophilic monoterpenes, the C₁₀ class of isoprenoids, with a central iridoid nucleus (Mahmoud and Croteau, 2002). Terpenes are biosynthesized from isopentenyl pyrophosphate (IPP) through the mevalonate (MVA) pathway in the cytoplasm and/or 1-deoxyxylulose-5-phosphate (DxP) pathway, in the chloroplast the latter pathway would provide IPP for mono, di and tetraterpenes (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Burlat et al., 2004). Three-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase (HMGR) (Kuzuyama, 2002; Hamano et al., 2002; Dubey et al., 2003) and 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase (DxPS) (Estévez et al., 2001; Rodríguez-Concepción et al., 2001; Carretero Paulet et al., 2002; Dubey et al., 2003; Walker & Poulter, 2005) are key-enzymes of the cytosolic and plastidial pathways, respectively, and the use of specific inhibitors of these pathways, such as compactin, mevinnolin, lovastatin and mevastatin for HMGR inhibition (Ravid et al., 1999; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Kuzuyama, 2002; Hamano et al., 2002; Dubey et al., 2003) and fosmidomycin for 1-deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase (DxPR) inhibition, allows the identification of the preferential IPP biosynthetic route (Ravid et al., 1999; Estévez et al., 2001; Carretero Paulet et al., 2002; Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Kuzuyama, 2002; Hamano et al., 2002; Dubey et al., 2003). At the moment, no use of DxPS inhibitor has been reported, although fluoropyruvate (Altincicek et al., 2000) and (3R,4S)-3,4,5-trihydroxy-4-methylpentyl-phosphonic acid (Yoshioka et al., 2004) have been identified as its specific inhibitors.

Flavonoids belong to the large group of phenolic compounds, among which are included phenolic acids, proanthocyanidins (condensed tannins), stilbenes, lignans and lignin, all synthesized through the well characterized shikimate pathway localized in the plastid and cytosol in many different plant species (Herrmann and Weaver, 1999; Pastřrová et al., 2004; Schijlen et al., 2004; Mehrtens et al., 2005; Beta, et al., 2005) and are deposited in a variety of cellular locations: vacuole, cell wall, cytoplasm, nucleus or in secretory vesicles (Saslowky et al., 2005). In plants, phenolic compounds, such as tannins, lignans, flavonoids, phenolic acids and some simple phenolic compounds are often produced as defenses against herbivores and pathogens and are synthesized primarily from products of the shikimic acid pathway (Croteau et al., 2000). Most plant phenolics are products of the phenylpropanoid metabolism, which derives from phenylalanine and tyrosine; however, some phenolic compounds, such as condensed tannins, are generated through alternative pathways. In addition, lignins strengthen cell walls mechanically; many flavonoid pigments are important for seed dispersion and flower pollination. Some phenolic compounds have allelopathic activity and may adversely influence the growth of neighboring plants (Croteau et al., 2000). Furthermore, flavonoids and others phenolic compounds are well-known for their antioxidant (Peng et al., 2003; Beta, et al., 2005; Skerget et al., 2005) and anxiolytic activities, besides showing anti-inflammatory, anti-cancer, antiviral, neuroprotective (Tai et al., 2005) and sedative and anti-convulsivant actions (Fernandez et al., 2006).

Plant cell and tissue cultures are known to be an excellent tool in the study of biosynthetic pathways of secondary metabolites in plants and are promising strategies for mass production of plant-derived natural products, particularly the secondary metabolites of naturally rare and slow growing plant species (Wu and Lin, 2002). The use of biotic and abiotic elicitors has been one of the most effective means to improve the yields of secondary metabolites in plant cell cultures (Pitta–Alvarez et al., 2000; Kittipongpatana et al., 2002). The strategy is based on the fact that the accumulation of most secondary metabolites in plants is part of the defense response to pathogen infection, herbivore attack and environmental stimuli (Wu and Lin, 2002; Kliebenstein, 2004).

Pathogen attack and herbivory simulations (Baldwin et al., 2001; Kessler et al., 2004) by applying SA or JA and their esters (Bulgakov et al., 2002; Kittipongpatana et al., 2002;

Kachroo et al., 2003; Wu & Lin, 2003; Lee et al., 2004; Gao et al., 2004; Gregianini et al., 2004; Kang et al., 2004; Peng et al., 2004; Wang et al., 2004; Zhao et al., 2005) and the use of physical or mechanical stimuli such as ultrasound (US) (Lin et al., 2001; Lin and Wu, 2002; Wu and Lin, 2002; Wu and Lin, 2003; Chisti, 2003) are methods often employed to enhance interesting metabolite production *in vitro*. These chemicals (SA and JA) are components of signal transduction pathways in stress and disease resistance, including systemic acquired resistance (SAR) of plants to pathogens (Avancini et al., 2003; Gao et al., 2004; Peng et al., 2004), whereas US is a special type of physical stimulus that has a range of biological effects (Miller et al., 1996). Mild intensity ultrasound may stimulate or inhibit biological activities, such as enzymatic and microbial bio-conversions, cellular biosynthesis and changes in cell membranes and other cellular structures, becoming an important tool for use in biotechnology (Lin et al., 2001; Liu et al., 2003).

Since US is a form of mechanical wound, SA or JA pathways may be involved in such response, particularly the former (Kachroo et al., 2003). It is well established that there is a network of cross-talking connections and mutual inhibitions between SA and JA mediated responses, activating different sets of plant defense genes, including those related to secondary metabolite assembly (Kachroo et al., 2003; Gregianini et al., 2004; Zhao et al., 2005).

In the present study we investigated the metabolic responses of valepotriates and phenolic compounds in whole-plants of *V. glechomifolia* grown in liquid medium upon exposure to SA, US or JA, and examined the relationship between these two types of metabolites under control and stress conditions, as well as the preferential biosynthetic source of IPP.

Materials and Methods

Plant Material

Two-month-old whole plants of *V. glechomifolia* were used in the experiments. The origin of explants and culture conditions were as previously described (Russowski et al, 2006).

Micropropagated *V. glechomifolia* were grown in 200 mL glass flasks capped with a double layer of aluminum foil containing 25 mL MS (Murashige and Skoog, 1962) solid medium containing 3 % sucrose and 5.5 % agar (extra pure, Merck), at pH 5.8, maintained at 25 ± 1 °C, under a 16 h photoperiod provided by cool white fluorescent lamps (approximately $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Eight weeks after the last subculture, whole plants were placed in liquid medium as previously described (Russowski et al., 2006). After various times of incubation, the residual medium volumes were recorded and plants were harvested, rinsed and blotted dry. The fresh weight (FW) of the plants was recorded. The Growth Index was calculated using the equation: $(\text{weight}_{\text{final}} - \text{weight}_{\text{initial}}) / \text{weight}_{\text{initial}}$. The plants were lyophilized for at least 48h to obtain the Dry Weight (DW) and for extraction of valepotriates and total phenolics. The residual medium volumes were lyophilized for at least 96h for analysis of exuded valepotriates and phenolic compounds.

Salicylic Acid Experiments

Two different concentrations of SA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 0.1 and 1.0 mM were studied by addition to 21 day-old whole plants cultured in MS liquid medium and harvested after 24, 48, 72 and 96 hours of exposure to the treatments. Salicylic acid was solubilized in an aliquot of the fresh medium solution with mild heating and the pH was adjusted to 5.8 with NaOH 5%. Cultures without SA administration but with equivalent fresh medium addition were used as controls.

Ultrasound Experiments

An ultrasonic cleaning bath (Ultrasonic[®], São Paulo, Brazil) with a fixed frequency of 40 Hz was used to treat the cultures. The treatments consisted in different exposure times to ultrasonic waves at certain days of the growth cycle (Table 1). For exposure, the flasks were dipped in the ultrasonic bath. The control plants were dipped in the ultrasonic cleaning bath,

but without ultrasonic wave and with mild manual agitation. Valepotriate and total phenolics exudated to medium were evaluated in the same fashion described for the SA experiment. All treatments were carried out at room temperature and the plants were harvested after 21 days of culture in liquid medium.

Table 1. Duration and days of culture of plants exposed to Ultrasound

Treatments	Time of Exposure (min.)	Time of Culture in Liquid Medium (Days)
A	2.5	7 th
B	2.5	14 th
C	2.5 / 2.5	7 th /14 th
D	5.0	14 th

Jasmonic Acid Experiments

Three different concentrations of JA (Sigma, Saint Louis, USA) 0.05, 0.1 and 1.15 mM in water (prepared from a concentrated etanolic solution of JA stock) were evaluated by addition to 21 day-old whole plants cultured in MS liquid medium and harvested after 3 and 14 days of exposure to the treatments. Cultures without JA administration but with equivalent water and ethanol residue addition were used as controls.

Inhibitors Experiments

Mevinolin (5 μ M) and fosmidomycin (100 μ M) aqueous solutions were added to samples submitted to treatment B of the US experiment, and harvested at 21 days of culture. The control plants were dipped in the ultrasonic cleaning bath, but without ultrasonic wave and with mild manual agitation and equivalent water was added.

Valepotriate Determinations

The lyophilized and ground samples were submitted to chemical extraction: the plants were extracted four times at room temperature with chloroform under 20 min sonication (Ultrasonic[®], São Paulo, Brazil) and nutrient solutions were extracted two times using the same conditions, as previously described Silva et al. (2002). The extracts were dissolved in methanol to obtain a concentration of 1 mg/ml, filtered through a membrane filter (0.22 µm pore size, Merck) and analysed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in a Shimadzu equipment consisting of an LC-10AD pump, an SPD-10A UV detector and an automatic injector (SIL-10^A) with a 20 µl sample loop. A Waters Nova-Pack C18 column (4 µm, 3.9 x 150 mm i.d.) with Waters Nova-Pack C18 guard column (60 Å. 3.9 x 20 mm) were used as stationary phase; the mobile phase was isocratic: CH₃CN/H₂O 50:50 (v/v); flow rate was 1 ml.min⁻¹. Detector sensitivity was set to 1.0 Aups; wavelengths used were 254 nm (dienic valepotriates) and 208 nm (monoenic valepotriate). Valtrate, acevaltrate and didrovaltrate were used as external standards and isolated from *V. glechomifolia* as described by Salles et al. (2000). The valepotriates (10 mg each) were individually dissolved in methanol, diluted stepwise (0.5. 0.25. 0.125. 0.0625 and 0.03125 mg/ml), and 10 µl were injected into the HPLC in triplicate. The calibration plots were generated by measuring their respective peak areas and linear regression equations were calculated.

Total Phenolics Determination

From each lyophilized and powdered plant sample, 50mg were used for extraction of phenolic compounds with 1.5 ml of HCl 0.1 M for two times by sonication (Ultrasonic[®], São Paulo, Brazil) and centrifuged in a refrigerated benchtop microcentrifuge at 12.000 rpm and 4°C. The Folin Method was used for phenol quantification (Fett-Neto et al., 1992). Calibration curves were generated with pirogalol (Merck) and the spectrophotometric (Bioespectro, São Paulo, Brazil) readings were done at 750nm.

Statistical Analysis

In all of the elicitors assays the experimental design was totally randomized. All treatments had five replicates and each experiment was independently carried out two or three times. One-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) was applied with a critical value of $p \leq 0.05$ and Duncan test at the same level of significance was applied when appropriate. Microsoft® Excell 2002 and SPSS for Windows 10.0.1 were used in the analyses.

Results

Valepotriates Production

In all elicitors treatments, the three monitored valepotriates were equally induced by the treatments (data not shown). Valtrate was the dominant valepotriate, followed by didrovaltrate and acevaltrate, and these relationships were essentially maintained across the various treatments. Therefore, data on elicitation are expressed as total valepotriates.

All SA treatments resulted in improved valepotriate production over time (Fig. 1). The elicitation appeared more efficient after 72 and 96 hours (equivalent to 24 and 25 days of culture, respectively) of exposure to 0.1 mM SA, affording approximately 1.7 to 1.8-fold (45.94 ± 9.95 and 48.51 ± 10.82 mg/g DW, respectively) increase in valepotriate contents compared to control plants (26.64 ± 3.37 and 28.31 ± 7.82 mg/g DW). These values correspond to approximately an 1.7 fold increase in the maximum value observed at 28 days of culture (27.23 ± 5.97 mg/g DW) from *in vitro* valepotriate production profile during the growth cycle reported in a previous study without addition of elicitors under the same culture conditions (Russowski et al., 2006) (Fig. 1A and 1D). Salicylic acid at 1.0 mM improved valepotriate contents only at 48h; its yield (42.58 mg/g DW) was just slightly smaller than that displayed by the treatment with SA 0.1mM at 72 and 96h of exposure (24 and 25 days of culture, respectively). Despite of a decrease in valepotriate content after 24 and 48h (22 and 23 days of culture, respectively) of exposure to 0.1 mM SA, the valepotriate contents showed a

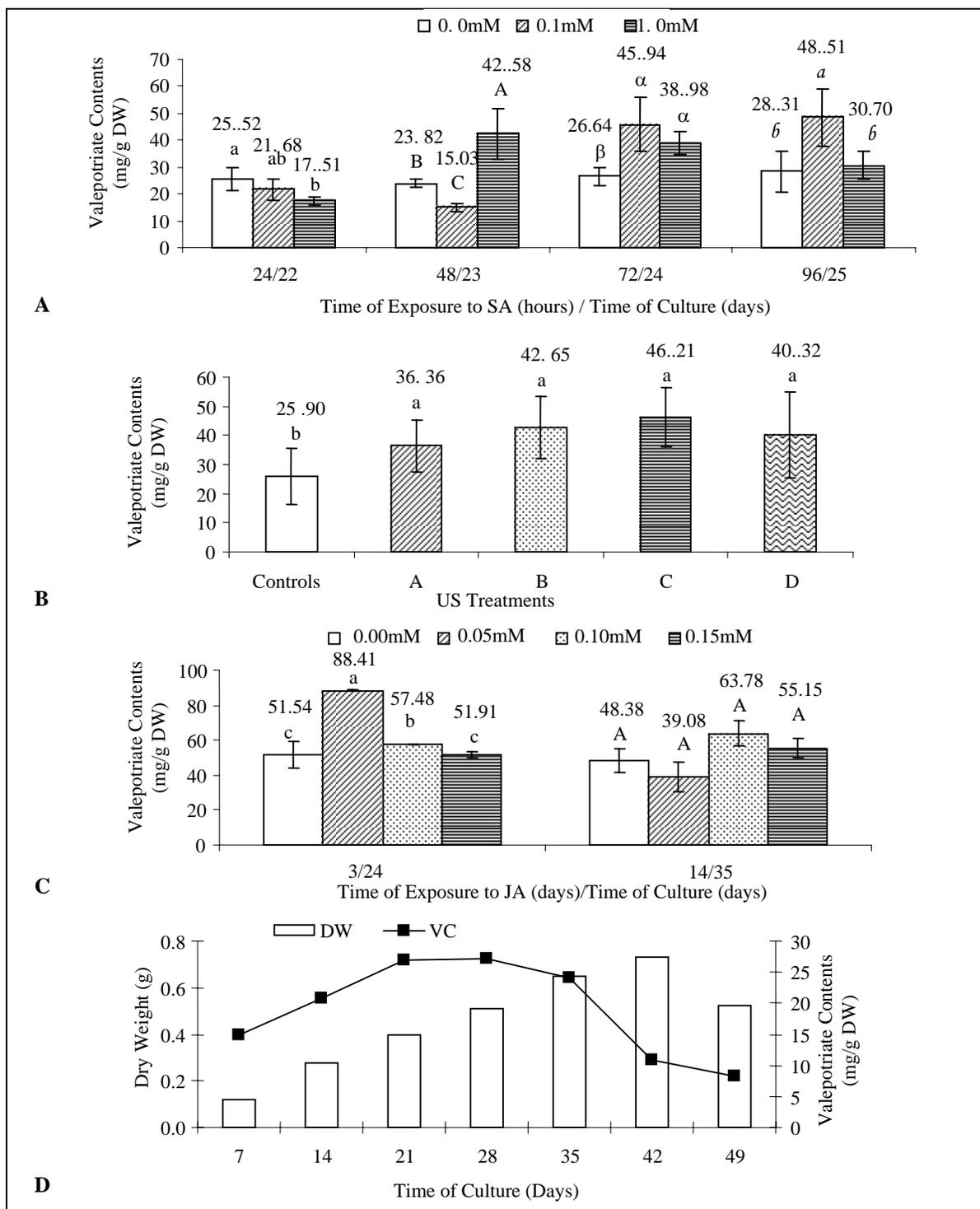


Figure 1 - Valepotriate contents of plants exposed to SA (A), US (B), or JA (C). Growth and production of a 49 day cycle of culture (D). Values are means of three or four independent experiments \pm SD ($n = 15$ or 20 , error bars = \pm SD). One-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan test when appropriate was applied. Identical superscripts on bars at each Time of Exposure to Elicitors /Time of Culture have no significant difference ($p \leq 0.05$) between means.

progressive decrease after the induction peak in 1.0mM treated plants (Fig. 1A). Therefore, although 1.0 mM SA was able to induce valepotriate production 24h before the 0.1mM SA treatment, the production was not maintained at higher levels as was the case of plants submitted to the latter treatment (Fig. 1A).

In the US experiment, treated plants yielded a total valepotriate content increase between 1.4 and 1.8-fold (36.36 ± 8.90 and 46.21 ± 10.19 mg/g DW, corresponding to treatments A and C) compared to plants kept in control conditions (25.90 ± 9.45 mg/g DW) and to those evaluated at 28 days of regular culture (Fig.1B and 1D). All US treatments elicited the valepotriate productions in the same proportion; significant statistical differences were not observed among them (Fig. 1B). The highest values of valepotriates induced in the US (C treatment) and SA (0.1mM 96h) experiments were equivalent.

Elicitation by JA afforded the highest valepotriate production (88.41 ± 1.99 mg/g DW) observed at 3 days after the 0.05 mM elicitor addition. The other JA concentrations were not able to elicit valepotriate production, except 0.10 mM at 14 days (Fig. 1C).

A quantitative analysis of valepotriates released in the culture medium in the various treatments and experiments showed very low amounts of these metabolites (data not shown); therefore, released valepotriates were not considered for yield determination.

Total Phenolics Production

In all of the experiments carried out, there was no induction of phenolics production. Total phenolics contents were not statistically different between controls and SA treatments except for the first 24h, in which a reduction was observed. Unlike valepotriate production, which was induced by SA and JA treatments (at later and initial time points, respectively), total phenolics contents were unaffected. There were also no significant differences between treatments and controls in the US treatment. Moreover, the total phenolics production observed from SA and US experiments were equivalent. Overall average content of phenolics was 7.72 ± 1.86 mg/g DW (mean \pm sd), ranging from 4.25 to 10.5 mg/g DW. Total phenolics were not detected in the culture medium.

Growth Parameters

The FW accumulation and GI parameter (data not shown) showed the same profile of DW increase (Fig. 2A and 2C) in the SA and JA experiments. SA-treated plants were slightly smaller than controls plants, but without showing a drastic reduction of DW (Fig. 2A). Decreases were more evident at higher concentrations of SA, without significant changes over time (Fig. 2A). A mild chlorosis was observed in SA-treated plants, which were light-green compared to control plants. The plants treated with JA did not show any changes related to morphological aspects and DW accumulation did not present a regular behavior (Fig. 2C).

The points of highest valepotriate production did not correspond to decreases in DW (for example, 1.0mM SA yielded a significant increase of 178% in valepotriate content and a non-significant reduction of 17% in DW of the plants, Fig. 1A and Fig. 2A). Ultrasound treatments did not affect growth (Fig 2B), although valepotriate yield improvement was clear (Figs. 1B and 2B) at the time of harvest and analysis (21 days of culture, corresponding to the peak of valepotriate production during the log phase of the growth curve) (Fig. 2C).

Preferential Biosynthetic Pathway

Mevinolin and fosmidomycin were both capable of reducing the yield of valepotriates (Fig. 3). Valtrate accumulation was equally diminished by both inhibitors. Didrovaltrate accumulation was inhibited by fosmidomycin, whereas acevaltrate yield was down regulated by mevinolin (Fig. 3). Both inhibitors reduced biomass accumulation to a similar extent, amounting to approximately 25% decrease in relation to the control.

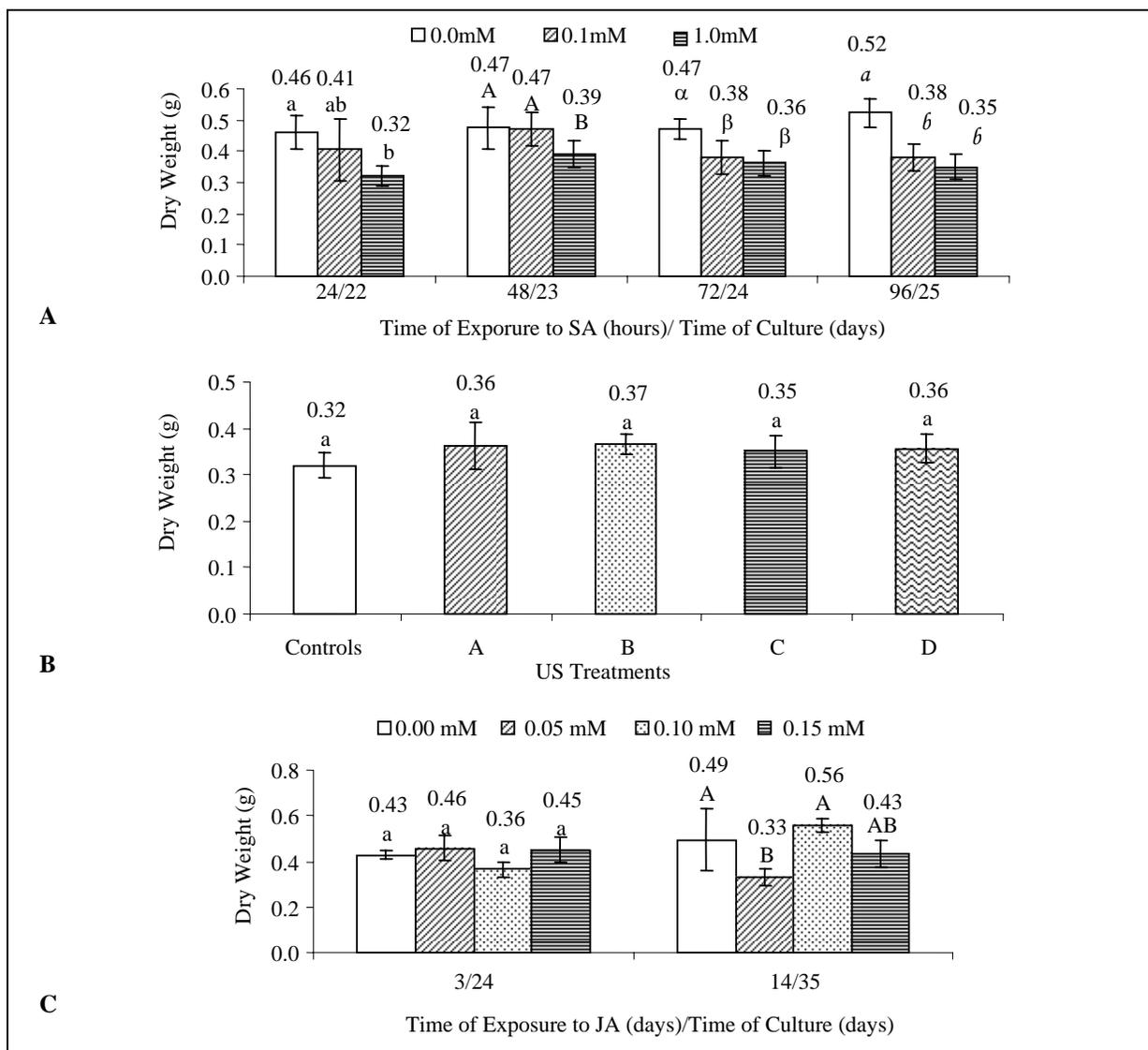


Figure 2 – Dry weight of plants exposed to SA (A), US (B) and JA (C). Values are means of three independent samples \pm SD ($n = 15$, error bars = \pm SD). One-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan test when appropriate. Identical superscripts on bars at each Time of Exposure to Elicitors on Time of Culture have no significant difference ($p \leq 0.05$) between means.

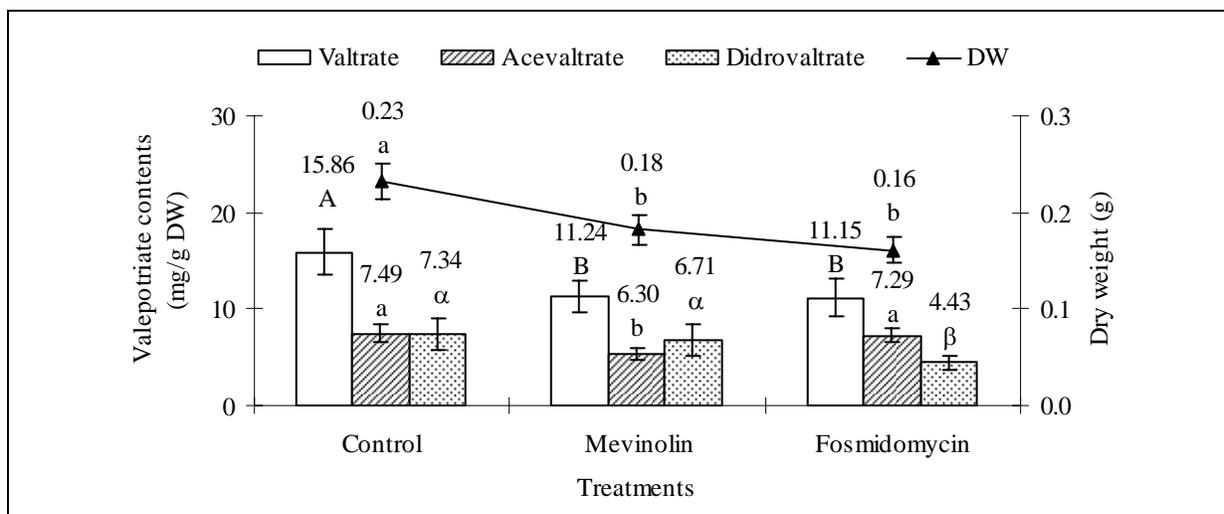


Figure 3 – Individual valepotriates and dry weight accumulation in plants of *V. glechomifolia* exposed to inhibitors of IPP biosynthesis. Values are means of two independent samples \pm SD (n = 20, error bars = \pm SD). One-way or two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan test when appropriate. Identical superscripts on bars at each treatment have no significant difference ($p \leq 0.05$) between means.

Discussion

The highest valepotriate amounts reported have been found in roots of a Peruvian species, *Valeriana thalictroides* Graebn. (14.51%), a Costa Rican species, *V. prionophylla* Standl. (10.04%), and from leaves of another Peruvian species, *Phyllactispulvinata* (8.48%) (Kittipongpatana et al., 2002). In the study with root cultures of *Valerianella locusta*, Kittipongpatana and co-workers (2002), using similar times of exposure to some of the elicitors used in the present study, observed that neither SA 0.1 mM nor 0.01 mM treatments showed significant increase in valepotriate contents, in despite of JA being able to cause strong induction. Small increases in the first three days of treatment were observed, but afterwards valepotriate contents declined to control levels. Nevertheless, in whole plants of *V. glechomifolia*, the valepotriate contents were higher than controls in SA and JA-treated plants at least in certain points of the time course evaluated (Fig 1A and 1C). For the lower SA concentration evaluated in the present study (0.1 mM), valepotriate production was persistent and tended to increase with time. In spite of the fact that SA is a well-known inducer of SAR

in plant–pathogen interaction, it is not a universal elicitor for production of plant defense metabolites since the induction of many secondary products can be SA-independent (Zhao et al., 2005). The difference between our results and those of Kittipongpatana et al. (2002) may be explained by the fact that valepotriates in root cultures could be produced by an SA-independent pathway, which would not be the case of whole-plants. Species-related differences could also account for these variable results. In cell cultures of the woody species *Taxus chinensis*, Wang et al. (2004) observed improved yields of the diterpene amide taxol upon treatment with SA concentrations ranging from 0.0725 to 0.29mM, with a peak at 0.145mM. Concentrations in excess of 0.29mM were deleterious to taxol accumulation. In the present study, a transient and precocious induction of valepotriate production was observed at the highest SA concentration (1.0 mM), which returned to control levels at later sampling times associated with more intense decreases in growth. The production of brachycerine, a monoterpenoid indole alkaloid not detected in roots, but predominantly accumulated in inflorescences of *Psychotria brachyceras*, was not changed by plant exposure to SA, suggesting an SA-independent pathway for its production (Gregianini et al., 2004). Tropane alkaloids of *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez et al., 2000), *Atropa belladonna* (Lee et al., 2001) and *Scopolia paviflora* (Kang et al., 2004), anthraquinones of *Rubia cordifolia* (Bulgakov et al., 2002) and *Hypericum perforatum* (Sirvent and Gibson, 2002), are induced in cell cultures in response to SA exposure. Pilocarpine, a pyridine alkaloid from *Pilocarpus microphyllus* and *P. jaborandi* was induced by SA, but wounding had a strong depressive effect on pilocarpine content (Avancini et al., 2003). The increase of alkaloids or other metabolites such as valepotriates and other terpenoids and phytoalexins in plants due to SA treatment varies considerably, depending on plant species, type of culture and the concentration of the inducer.

Herbivore attack is associated with wounding, and recognition of herbivory frequently involves modifications of a plant's wound response (Baldwin et al., 2001). Herbivory, wounding and ultrasound can all be considered forms of mechanical stimuli and JA is a mediator in plants responses. As moderate sonic power is propagated through the biological medium via wave motion rather than mechanical agitation, US can produce mechanical effects on biological materials in the medium in a relatively non-intrusive fashion (Wu and Lin,

2002). These mechanical stresses trigger endogenous JA and SA mediated response cascades, involving the activation of wounding-responsive and pathogenesis-related genes (Menke et al., 1999). The involvement of ethylene in the US-induced production of valepotriates cannot be discarded, since this hormone is known for mediating several plant defense responses (Kachroo et al., 2003). Moreover, a possible role for nitric oxide (NO) in this response could also be considered. NO inhibitors suppressed US-induced activation of phenylalanine ammonium-lyase (PAL) and accumulation of the diterpenoid taxanes taxol and baccatin III in *Taxus* cells, suggesting that NO plays a signalling role in the US-induced responses of secondary metabolism (Wang et al., 2006). Jasmonic acid is a plant stress hormone that acts as a regulator of defense responses, particularly in relation to herbivory. The induction of accumulation of many secondary metabolites, such as alkaloids and terpenes, is an important stress response that depends on JA as a regulatory signal. In several elicitor responses, including secondary metabolite production, JAs and some of its octadecanoid precursors (JA is a volatile fatty acid derivative with a 12-carbon backbone that is synthesized from an 18-carbon intermediate via the octadecanoid pathway), play key roles as intermediate signals. In different plant species, elicitors were shown to induce accumulation of endogenous JA and SA, and to increase secondary metabolite production, among them diterpenes (taxol), sesquiterpenes, triterpenes and terpenoid indole alkaloids (Memelink et al., 2001).

Significant increases on yields of ginsenoside saponins (triterpenoids) of *Panax ginseng* cells (Lin et al., 2001) and shikonins of *Lithospermum erythrorhizon* cells (Lin and Wu, 2002) were reported using low-intensity ultrasound. Wu and Lin (2003) reported an increase in taxol yield of 1.6 to 1.8-fold with 2 min of US treatment once or twice during a 4-week culture period in *Taxus chinensis* cell cultures. The authors also reported that the effect of US on taxol production was not significantly dependent on the day or number of exposures (once or twice). The same feature also was observed in valepotriate production (Fig 1B). These results imply that both taxol (diterpene) and valepotriates (monoterpenes) biosynthesis can be induced by US-caused mechanical stimuli in a similar fashion. Ultrasound acts as an abiotic inducer of plant defense systems and US-induced secondary metabolite production may be part of the defense response of the sonicated cultures, although the exact physiological role of valepotriates in *Valeriana* species is currently unknown. The application of US to liquid

cultures induces energy-intensive hydrodynamic events such as acoustic cavitation and microstreaming, which causes mechanical damage and shear stress to the cells. Mechanical stress is regarded as the primary cause of the elicitor-like effects of US, including the stimulation of secondary metabolite accumulation (Wu and Lin, 2003). Taken together, our results suggest a potential role for valepotriates in pathogen and wounding-response of *V. glechomifolia*.

The application of low-energy ultrasound (US) for short periods on whole plants of *V. glechomifolia* caused significant increases in valepotriate production in whole plants but, the absence of valepotriates in the nutrient medium and the lack of significant reductions in plant growth are indications that the US treatments employed did not induce severe cell damage.

In previous attempts to quantify flavonoids in *V. glechomifolia* we found out that these metabolites are present in low concentrations (data not shown), unlike what has been reported for other valerian species (Salles, 1999; Silva, 2001; Marder et al., 2003; Fernández et al., 2004). Therefore, to investigate the potential interactions between the isoprenoid and shikimate derivatives upon stress treatments, the accumulation of valepotriates and total phenolics was monitored.

Because phenolics compounds also operate as defense against pathogens in plants (Croteau et al., 2000; Schijle et al., 2004), they therefore can be increased by SA or JA elicitation. Flavonoids (Schijlen et al., 2001) and coumarins have previously been reported to be induced by stress conditions. Coumarin response was dependent on the tissue type and the elicitor used (Pastírová et al., 2004). Similarly, production and accumulation of phenolic compounds were described in *Thunbergia alata* after elicitation by 5mM SA and wounding (Housti et al., 2002). Jasmonate can induce multiple secondary metabolite classes in a single plant species, for example alkaloids and phenolics in tobacco, anthocyanins and gum in peach and tulip, and naphthoquinones and rosmarinic acid in *Lithospermum erythrorhizon* (Memelink et al., 2001).

The present study showed that factors capable of inducing valepotriate production were not able to affect the total phenolic content. Not even the apparently much higher content of valepotriates in comparison to total phenolics (at least an order of magnitude more valepotriates than total phenolics) resulted in changes of phenolic content. Therefore, the

biosynthetic pathways of valepotriates and phenolic compounds appear to be non competitive in *V. glechomifolia* upon induction with SA, US or JA, and these treatments are capable of specifically inducing valepotriates. Moreover, the moderate growth inhibition effects of SA and the lack of growth effects of US indicate that the procedures herein described are suitable for improving valepotriate yields without significant loss of biomass or cell viability due to excessive accumulation of phenolic compounds.

The SA, US and JA treatments did not result in release of significant quantities of valepotriates into the liquid medium (data not shown). This is in agreement with previous works that reported valepotriate secretion only when surfactants were added to *V. glechomifolia* liquid medium (Maurmann, 2004; (Russowski et al., 2006). Studies on different Valerianaceae under several culture systems (callus, cell suspensions and tissues) showed that none of the media that had served for growth contained any valepotriates (Violon et al., 1983). However, *in vitro* culture of different species (Lin and Wu, 2002; Wu and Lin, 2003; Thimmaraju et al., 2003) released terpenoids to liquid medium, when submitted to US, because this treatment can disrupt cell membranes (Chrisri, 2003), or act on living cells increasing membrane permeability. Ultrasonication is a well-established laboratory technique for cell disruption and intracellular stored compounds can be easily released to culture medium (Lin et al., 2001; Liu et al., 2003). Currently, US has been applied for obtaining and extracting several secondary metabolites (Shotipruk et al., 2001; Valachovic et al., 2001; Hromádková et al., 2002; Chrisri, 2003;).

The lack of phenolic compounds released in the nutritive solution is not surprising because, in a study about phenolic acids (including SA) exudation by roots, it was reported that the nutrient solution showed fast phenolic acid degradation of root exudates. These can be the reason, for which phenolics compounds were found at small concentrations into the liquid medium culture (Jung et al., 2004). SA accumulation can be toxic and it has been related to the induction of PR proteins related to defense (Zhao et al., 2005). This process may have contributed to a reduction in growth of SA treated plants in the current assays, due to diversion of C and N to defense proteins.

In these work, the lack of a preferential pathway for the supply of IPP for the assembly of valepotriates disagree with the expected predominant control of the IPP pool for

monoterpene (and therefore valepotriate) production by the DxPS pathway (Croteau et al., 2000; Carretero-Paulet et al., 2002; Souret et al., 2002) and are in agreement with previous results from our group that showed lack of significant effect of the absence of light on valepotriate accumulation in *V. glechomifolia* (Russowski et al., 2006) and with Gerdov et al. (2005) works. These authors found that IPP and consequently monoterpene derivatives originate from the both pathways. HMGR isoforms with typical leader peptides to target these proteins into the chloroplasts have not been reported. There are some biochemical indications of existence of a plastidic HMGR; however, whether HMGR plays any role in the biosynthesis of plastidial terpenoids is still an obscure point (Dubey et al., 2003). At least two *DXS* genes encode DXS in both procaryotes and eucaryotes (Walter et al., 2000; Brandle et al., 2002; Khemvong & Suvachittanont, 2005); *DXS1* would be involved in primary metabolism, whereas *DXS2*, in secondary metabolism (Walter et al., 2000). Although the results suggested a shared source of IPP for valepotriate biosynthesis, there is an apparent preference for cytosolic pools of IPP for the production of acevaltrate and for plastidic ones for the biosynthesis of didrovaltrate. The use of mevinolin and fosmidomycin caused a reduction in biomass accumulation probably because they affected the production of molecules that have roles in growth control, such as membrane sterols and brassinosteroids (mevalonate pathway-derived), gibberellins (DxP pathway-derived) and cytokinin (partially derived from both pathways) (Croteau et al., 2000).

Considering the nature (biotic and abiotic) of the effective stimulatory agents for the production of valepotriates herein described, it seems that these metabolites perform defense functions *in planta*.

Acknowledgements: The authors are grateful to the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPERGS for financial support. We would also like to thank Prof. Dr. Pedro R. Petrovick (Faculdade de Farmácia, UFRGS) for lending the HPLC equipment.

References

- Altincicek, B.; Hintz, M.; Sanderbrand, S.; Wiesner, J.; Beck, E. & Jomaa, H. Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, 190: 329-333, 2000.
- Andreatini R, Leite JR. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. **European Journal of Pharmacology**, 260(2-3):233-235, 1994.
- Andreatini R, Sartori VA, Seabra MLV, Leite JR. Effect of valepotriates (valerian extract) in generalized anxiety disorder: a randomized placebo- controlled pilot study. **Phytotherapy Research**, 16(7):650-654, 2002.
- Avancini G, Abreu IN, Saldanha MDA, Mohamed RS, Mazzafera P. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**, 63:171-175, 2003.
- Backlund A, Moritz T. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, 26:309-335, 1998.
- Baldwin IT, Halitschke R, Kessler A, Schittko U. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, 4:351-358, 2001.
- Banerjee S, Rahman L, Uniyal GC, Ahuja PS. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots cultures of *Valeriana wallichii* DC. **Plant Science**, 131:203-208, 1998.
- Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD. Phenolic content and antioxidant activity of pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. **Cereal Chemistry**, 82(4):390-393, 2005.
- Bent S, Padula A, Moore D, Patterson M, Mehling W. Valerian for sleep: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Medicine**, 119: 1005-1012, 2006.
- Bos R, Hendriks H, Scheffer JJC, Woerdenbag HJ. Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. **Phytomedicine**, 5:219-225, 1998a.
- Bos R, Woerdenbag HJ, van Putten FMS, Hendriks H, Scheffer JC. Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots

- and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. **Planta Medica**, 64:43-147, 1998b.
- Bos R, Woerdenbag HJ, Pras N. Determination of valepotriates. **Journal of Chromatography**, 967 (1):131-146, 2002.
- Brandle, J.E.; Richman, A.; Swanson, A.K. & Chapman, B.P. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. **Plant Molecular Biology**, 50: 613-622, 2002.
- Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Khodakovskaya MV, Glazunov VP, Radchenko SV, Zvereva EV, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. **Journal of Biotechnology**, 97:213–221, 2002.
- Burlat V, Oudin A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. **The Plant Journal**, 38: 131-141, 2004.
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A, Campos N. Expression and molecular analysis of the arabidopsis dxr gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. **Plant Physiology**, 129:1581-1591, 2002.
- Castillo P, Zamilpa A, Márquez J, Hernández G, Lara M, Alvarez L. Comparative study of differentiation levels and valepotriate content of *in vitro* cultures and regenerated and wild plants of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. **Journal of Natural Products**, 65:573-575, 2002.
- Chisti Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, 21:89-93, 2003.
- Contin A, Van Der Heijden R, Lefeber AWM, Verpoorte R. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. **FEBS Letters**, 434: 413-416, 1998.

- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. **Natural Products** (Secondary Metabolites). In: Buchanan B, Grissem W, Jones R. Editors. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (American Society of Plant Physiologists, chapter 24, p. 1250-1268, 2000.
- Dubey VS, Bhalla R, Luthra R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. Review. **Journal of Bioscience**, 28(5):637–646, 2003.
- Estévez JM., Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P. 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, 276 (25):22901–22909, 2001.
- Fernández S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 77:399-404, 2004.
- Fernández S, Wasowski C, Loscalzo LM, Granjer RE, Johnston GAR, Paladini AC, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides **European Journal of Pharmacology**, 539: 168-176, 2006.
- Fett-Neto AG, Teixeira SL, Silva EAM, Santanna RS. Biochemical and morphological changes during in vitro rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D.Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, 140:720-728, 1992.
- Fuzzati N, Wolfender JL, Hostettmann K, Msonthi JD, Mavi S, Molleyres LP. Isolation and antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. **Phytochemical Analysis**, 7:76-85, 1996.
- Gao XQ, Bjork L. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. **Fitoterapia**, 71:19-24, 2000.
- Gao X, Zeng X, Xia K, Yoshihara T, Zhou X. Interactive effects of methyl jasmonate and salicylic acid on floret opening in spikelets of Sorghum. **Plant Growth Regulation**, 43: 269–273, 2004.
- Gerdov SM, Grishin YK, Roznyatovsky VA, Ustynyuk YA, Kuchin AV, Alekseev IN, Frolova LL. Quantitative ²H NMR spectroscopy "H/D-Isotope portraits" of cyclic monoterpenes and discrimination of their biosynthetic pathways. **Russian Chemical Bulletin**, 54(5): 1258-1265, 2005.

- Gregianini TS, Porto DD, Nascimento NC do, Fett JP, Henriques AT, Fett-Neto AG. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Chemical Ecology**, 30(10):2023-2036, 2004.
- Hamano Y, Dairi T, Yamamoto M, Kuzuyama T, Itoh N, Seto H. Growth-phase dependent expression of the mevalonate pathway terpenoid antibiotic-producing *Streptomyces* strain. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 66(4):808-819, 2002.
- Herrera-Arellano A, Luna-Villegas G, Cuevas-Uriostegui ML, Alvarez L, Vargas-Pineda G, Zamilpa-Alvarez A, Tortoriello J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. **Planta Medica**, 67:695-699, 2001.
- Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50:473–503,1999.
- Houghton PJ. The biological activity of valerian and related plant. **Journal of Ethnopharmacology**, 22 (2):121-142, 1988.
- Houghton PJ. The scientific basis for the reputed activity of valerian. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 51(5):505-512, 1999.
- Housti F, Andary C, Gargadennec A, Amssa M. Effect of wounding and salicylic acid on hydroxycinnamoylmalic acids in *Thunbergia alata*, **Plant Physiology and Biochemistry**, 40:761-769, 2002.
- Hui-lian W, Dong-fang Z, Zhao-feng L, Yang L, Qian-rong L, Yu-zhena W. In vitro study on the genotoxicity of dichloromethane extracts of valerian (DEV) in human endothelial ECV304 cells and the effect of vitamins E and C in attenuating the DEV-induced DNA damages. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 188(1):36-41, 2003.
- Kachroo A, Lapchyk L, Fukushige H, Hildebrand D, Klessig D, Kachroo P. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid– and jasmonic acid–mediated defense pathways in the *Arabidopsis ssi2* mutant. **The Plant Cell**, 15:2952-2965, 2003.
- Kang, S-M, Jung H-Y, Kang Y-M, Yun D-J, Bahk J-D, Yang J-K, Choi, M-S. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the

- expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora* **Plant Science**, 166:745–751, 2004.
- Keochanthabounthan C, Beck JP, Haagberrurier M, Anton R. Effects of 2 monoterpene esters. valtrate and didrovaltrate. isolated from valeriana wallichii. on the ultrastructure of hepatoma-cells in culture. **Phytotherapy Research**, 7(2):124-127,1993.
- Kessler A, Badldwin IT. Herbivore-induced plant vaccinatio. Part I. The Orchestration of plant defenses in nature and their fitness consequences and the wild tobacco *Nicotiana attenuata*. **The Plant Journal.**, 38:639-649, 2004.
- Khemvong, S. & Suvachittanont, W. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. **Plant Science**, 169: 571–578, 2005.
- Kittipongpatana N, Davis DL, Porter JR. Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*.**Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 71: 65-75, 2002.
- Kliebenstein DJ. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinged glasses. **Plant, Cell and Environment**, 27: 675-684, 2004
- Kuzuyama T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 66 (8):1619-1627, 2002.
- Larsen, B.B. A taxonomic revision of *Phyllactis* and *Valeriana* sect. *Bracteata* (Valerianaceae). **Nordic Journal of Botany**, 6:427-46, 1986.
- Lee KT, Hirano H, Yamakawa T, Kodama T, Igarashi Y, Shimomura K. Responses of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. **Journal of Bioscience and Bioengineer**, 91:586–589, 2001.
- Lee M-H, Jeong J-H, Seo J-W, Shin C-G, KimY-S, In J-G, Yang D-C, Yi J-S, Choi Y-E. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. **Plant Cell Physiology**, 45 (8):976-984, 2004.
- Lin LD, Wu JY, Ho KP, Qi SY. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. **Ultrasound Medicine and Biology**, 27: 1147–1152, 2001.

- Lin L, Wu J. Enhancement of shikonin production in single and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. **Biotechnology and Bioengineering**, 78:81-88, 2002.
- Liu Y, Takatsuki H, Yoshikoshi A, Wang B, Sakanishi A. Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H⁺-ATPase activity of *Aloe arborescens* callus cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 32:105-116, 2003.
- Mahmoud SS, Croteau RB. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, 7(8):366-373, 2002.
- Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernández S, Medina JH, Paladini AC. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 75:537-545, 2003.
- Maurman, N. **Estudo da exsudação de valepotriatos e da sobrevivência de plântulas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas em meio líquido frente a diferentes agentes permeabilizantes.** Monografia de Conclusão de Curso em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2004.
- Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, Weisshaar B. The arabidopsis transcription factor myb12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Physiology**, 138:1083-1096, 2005.
- Memelink JB, Verpoorte R, Kijne JW. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. **Trends in Plant Science**, 6: 212-219, 2001.
- Menke FLH, Parchmann S, Mueller MJ, Kijne JW, Memelink J. Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, 119:1289-1296, 1999.
- Miller MW, Miller DL, Brayman AA. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. **Ultrasound in Medicine and Biology**, 22:1131-1154, 1996.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.

- Pastírová A, Repcák. M, Eliašová A. Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. **Plant Science**, 167: 819-824, 2004.
- Peng ZF, Strack D, Baumert A, Subramaniam R, Goh NK, Chia TF, Tan SN, Chia L.S. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **Phytochemistry**, 62: 219-228, 2003.
- Peng JY, Deng XJ, Huang JH, Jia SH, Miao XX, Huang YP. Role of salicylic acid in tomato defense against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* hubner. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, 59(11-12): 856-862, 2004.
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida* **Enzyme and Microbial Technology**, 26:252-258, 2000.
- Ravid T, Avner, R. Polak-Charcon, S.; Faust, J.R. & Roitelman, J. Impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase degradation in lovastatin-resistant cells. **Journal of Biological Chemistry**, 274(41): 29341-29351, 1999.
- Rodríguez-Concepción M, Boronat A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, 130:1079-1089, 2002.
- Russowski D, Maurmann N, Rech SB, Fett-Neto A.G. Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 86(2):211-218, 2006.
- Salles, L. de A. Estudo fitoquímico e estabelecimento de culturas de calos de *Valeriana glechomifolia* Meyer. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 1999.
- Salles LD, Silva AL, Rech SB, Zanatta N, von Poser GL. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. **Biochemical Systematics and Ecology**, 28(9):907-910, 2000.
- Salles LA, Silva AL, Fett-Neto AG, von Poser GL, Rech SB. *Valeriana glechomifolia*: In vitro propagation and production of valepotriates. **Plant Science**, 163:165-168, 2002.
- Saslowsky DE, Warek U, Winkel BSJ. Nuclear localization of flavonoid enzymes in arabidopsis. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(25): 23735-23740, 2005.

- Schijlen EGWM, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. Review. **Phytochemistry**, 65:2631-2648, 2004.
- Silva AL. **Quantificação de valepotriatos em espécies de Valeriana e em cultura de calos e suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia* Meyer.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2001.
- Silva. AL, Rech SB, Von Poser GL. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. **Planta Medica**, 68:570-572, 2002.
- Simmen U, Saladin C, Kaufmann P, Poddar M, Wallimann C, Schaffner W. Preserved pharmacological activity of hepatocytes-treated extracts of valerian and St. John's wort. **Planta Medica**, 71 (7):592-598, 2005.
- Sirvent T, Gibson D. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 60:311-320, 2002.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hras AR, Simonic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, 89: 191-198, 2005.
- Sobral M. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul: Valeraniaceae. **Boletim do Instituto de Biociências**. 58:1-61, 1999a.
- Sobral M. *Valeriana tajuvensis* (Valeraniaceae). A new species from southern Brazil. **Novon**, 9(1):114-117, 1999b.
- Sobral M. *Valeriana eupatoria* (Valeraniaceae). A new species from southern Brazil. **Novon**, 10(2):149-152, 1999c.
- Souret FDF, Weathers PJ, Wobbe KK. The mevalonate-independent pathway is expressed in transformed roots of *Artemisia annua* and regulated by light and culture age. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 38 (6): 581-588, 2002.
- Tai MC, Tsang SY, Chang LYF, Xue H. Therapeutic potential of wogonin: a naturally occurring flavonoid. **CNS Drug Reviews**, 11(2):141-150, 2005.

- Thimmaraju, R.; Bhagyalakshmi, N.; Narayan, M.S.; Ravishankar G.A. Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress. **Process Biochemistry** 38: 1069-1076, 2003.
- Walker JR, Poulter CD. Synthesis and evaluation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate analogues as chelation-based inhibitors of methylerythritol phosphate synthase. **Journal of Organic Chemistry**, 70:9955-9959, 2005.
- Walter, M.H.; Hans, J. & Strack, D. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. **The Plant Journal**, 31(3): 243–254, 2002.
- Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RX. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. **Nitric Oxide** 15: 351–358, 2006.
- Wang Y-D, Yuan Y-J, Wu J-C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. **Biochemical Engineering Journal** 19:259–265, 2004.
- Wasowski C, Marder M, Viola H, Medina JH, Paladini AC. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA receptors. from *Valeriana wallichii* D.C. **Planta Medica**, 68:934-936, 2002.
- Wu J, Lin L. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. **Applied in Microbiology and Biotechnology**, 59:51-57, 2002.
- Wu J, Lin L. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. **Applied in Microbiology and Biotechnology**, 62:151-155, 2003.
- Yoshioka T, Shimizu H, Ohruiy H. Synthesis of (3r,4s)-3,4,5-trihydroxy-4-methylpentylphosphonic acid as a potential inhibitor of the nonmevalonate pathway **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68(6): 1259–1264, 2004.

Zhang C-H, Wu J-Y, He G-Y. Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. **Applied in Microbiology and Biotechnology**, 60: 396-402, 2002.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, 23:283–333, 2005.

CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A viabilidade do cultivo de plantas inteiras de *V. glechomifolia* em meio líquido foi demonstrada neste trabalho, bem como sua utilidade para estudos de metabolismo de valepotriatos. Tanto o meio MS como B5 (Apêndice X) se mostraram adequados para o cultivo na ausência de fitormônios. Este sistema tem a vantagem de reunir a complexidade estrutural e fisiológica de plantas inteiras com a facilidade de absorção de moléculas sinalizadoras e inibidores enzimáticos em um meio axênico.

Do ponto de vista de produção de valepotriatos ou outros metabólitos de interesse, este sistema apresenta potencial de utilização, embora muitos estudos sejam ainda necessários do ponto de vista de desenho de biorreatores e dinâmica de larga escala. Além disso, o fato de plantas micropropagadas aclimatizadas em solo por 4 meses produzirem teores equivalentes aos obtidos no sistema desenvolvido neste trabalho aponta para a necessidade de estudos criteriosos de custos de produção. No entanto, a própria existência de um mercado de valepotriatos necessita a definição exata de suas funções e propriedades, estando hoje o interesse em valeriana voltado para o mercado de fitoterápicos.

No sistema de cultivo de plantas inteiras em meio líquido, confirmou-se o padrão observado anteriormente para plantas micropropagadas, cultivo de calos, células em suspensão e raízes não transformadas, ou seja, o acúmulo de valepotriatos relaciona-se com o crescimento de forma direta. A redução na produção de valepotriatos coincide com a desaceleração do crescimento e o início da fase estacionária de cultivo.

Ao contrário do que se esperava com base na literatura recente de terpenos, a luz não alterou de forma significativa a produção de valepotriatos, sugerindo a participação conjunta das vias do mevalonato e da DxPS no fornecimento de IPP para a produção destes metabólitos. De fato, o uso de inibidores específicos das referidas vias apresentou impacto equivalente na inibição de acúmulo de valepotriatos totais, confirmando esta participação conjunta dos “pools” de IPP na biossíntese de valepotriatos. Embora os resultados pareçam indicar que diferentes tipos de valepotriatos possam ser preferencialmente sintetizados a partir da via do mevalonato ou da DxPS, estudos adicionais serão necessários para confirmar esta evidência.

É possível estimular de forma significativa a produção de valepotriatos por meio da exposição a agentes sinalizadores de ataque patogênico e herbivoria, tais como o ácido salicílico e jasmonato. Da mesma forma, a aplicação de dano mecânico moderado, por meio de ultrassom, induz o acúmulo de valepotriatos, presumivelmente envolvendo sinalizadores como jasmonato endógeno. Os resultados sugerem que os valepotriatos atuam na proteção ecoquímica de *V.glechomifolia*. A indução de valepotriatos por estes fatores não foi acompanhada pelo aumento no teor de compostos fenólicos, sugerindo que, em *V. glechomifolia* no sistema investigado, estas rotas bioquímicas sejam reguladas de forma independente. Este aspecto deve ser levado em consideração quando a produção de diferentes princípios ativos da espécie, tais como valepotriatos e flavonóides (estes últimos oriundos da via do chiquimato-malonato), é almejada.

Como perspectivas deste estudo, pode-se citar a investigação sobre o papel de outros fatores de estresse, como choque osmótico, exposição a metais pesados e transições de temperatura, bem como o envolvimento de sinalizadores como etileno e óxido nítrico na produção de valepotriatos. Além disso, a quantificação das atividades enzimáticas de HMGR e DxPS em relação à biossíntese de valepotriatos induzida por algum dos fatores de estímulo identificados neste trabalho deve ser realizada.

No entanto, embora fora do escopo desta Tese, permanece a necessidade premente de mais investigações farmacológicas sobre valepotriatos e, especialmente, valepotriatos isolados, de modo a se identificar as reais moléculas de interesse deste grupo de monoterpenos.

APÊNDICE I

Sinopse dos Gêneros Descritos para Família Valerianaceae (Backlund & Moritz, 1998).

Gênero e Autor	Forma Reduzida	Nº de Espécies
<i>Aligera</i> Sucksd.	<i>Valeriana</i>	15
<i>Amblyorrhinum</i> Tucz.	<i>Valeriana</i>	-
<i>Amplophus</i> Raf.	<i>Valeriana</i>	-
<i>Arietrastum</i> (DC.)Spach	-	5-7
<i>Astrephia</i> Dufr.	-	1
<i>Axia</i> Lour.	<i>Valeriana</i>	-
<i>Belonanthus</i> Graebn.	-	5
<i>Centranthus</i> DC.	-	9
<i>Clarkeifedia</i> Kuntze	<i>Patrinia</i>	-
<i>Dufresnia</i> DC.	<i>Valerianella</i>	-
<i>Fedia</i> Gaertn.	-	3
<i>Gyonanthus</i> Raf.	<i>Patrinia</i>	-
<i>Hemesotria</i> Raf.	<i>Astrephia</i>	-
<i>Hoechia</i> Graebn. ex Diels	<i>Triplostegia</i>	-
<i>Mouffeta</i> Neck.	<i>Patrinia</i>	-
<i>Nardostachys</i> DC.	-	3
<i>Odontocarpa</i> Neck.	<i>Valerianella</i>	-
<i>Oligaeoce</i> Willd.	<i>Astrephia</i>	-
<i>Patrinia</i> Juss.	-	20
<i>Phuodendron</i> Graebner ex Dalla Torre and Harms	-	1
<i>Phyllactis</i> Pers.	-	25
<i>Plectritis</i> (Lindley) DC.	-	10
<i>Polypremum</i> Adans. non Mich.	<i>Valerianella</i>	-
<i>Porteria</i> Hook.	<i>Phyllactis</i>	-
<i>Pseudobetckea</i> (Höck) Lincz	-	1
<i>Stangea</i> Graebn.	-	7
<i>Triplostegia</i> Wall. ex DC.	-	2
<i>Valeriana</i> L.	-	200
<i>Valerianella</i> Miller	-	80
<i>Valerianopsis</i> (Wedd.)K.A.E. Müll.	<i>Valeriana</i>	-
Total		~395

APÊNDICE II

Lista de Valepotriatos Identificados e Publicados em Espécies da Família Valerianaceae (Backlund & Moritz, 1998)

Valepotriato	Sinonímea
1-Acevaltrato	Acevaltrato
11-Acevaltrato	-
7-epi-Deacetilisoaltrato	-
8,11-Desoxidodidroaltrato	Desoxidodidroaltrato
Acetovaltrato	Acevaltrato, Acetoxivalepotriatum, Acetoxivaltrato, Acevaltratum
AHD-valtrato	-
Desoidodidroaltrato	Desoxidodidroaltrato
Desoxidohomodidroaltrato	-
Diavaltrato	-
Didroaltrato	Didroaltratum, Diidroisoaltratum Diidroisoaltrato, Diidroisoalepotriato
Homoacevaltrato	-
Homodidroaltrato	Homodiidroisoalepotriato, Homodiidroisoaltrato, Homodiidroisoaltratum
Homovaltrato 1	-
Homovaltrato 2	-
Hidroxivaltrato	-
IHVD-valtrato	Isovaleroxiidroxididroaltrato
Isodidroaltrato	-
Iso-homoacevaltrato	-
Isovaleroxiidroxididroaltrato 1	-
Isoaltrato	-
Senecioaltrato	-
Valtrato	Baldrisedon, Valepotriatum, Halazuchrome B, Valtratum

APÊNDICE III

Composição Química Adicional aos Valepotriatos do Gênero *Valeriana* (Valerianaceae).

(Backlund & Moritz, 1998).

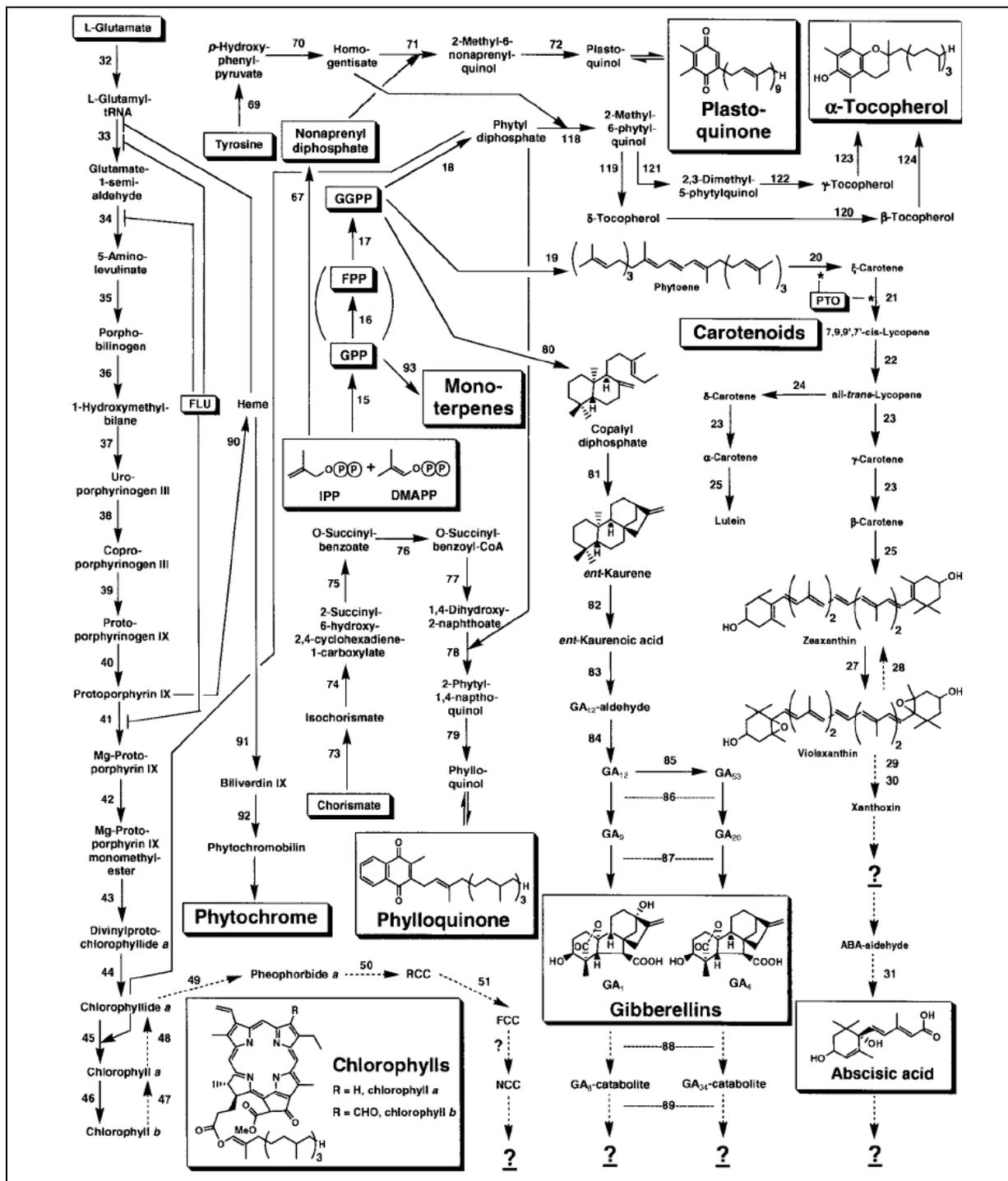
Classe de Metaból.	Compostos Encontrados
Alcalóides	Actinidina, Catinina, Cloreto de Colina, Gentianina, Gentianidina, Gentiopicrina, Metoxiactinidina (Valerianina), 8-Metoxiactinidina, Alcalóides Monoterpênicos, Alcalóides Piridínicos, Swertiamarina
Compostos Alifáticos	Entriakontano (<i>V.wallichii</i>), Ácido Isovalérico, n-Hexacosano Isovalerato de n-hexacosanila, n-Hexacosanol, n-Valeraldeído-Pentanal, Valerato de Pentila
Carboidratos	Sacarose, Amido
Ácidos Carboxílicos	Ác. Elaeostearico, Ác. Araquínico Ác. Isovalérico, Ác. Valérico (Pentanóico)
Ácidos Poli-Carboxílicos	Ác. Cítrico, Ác. Málico (2-hidróxi Butanodióico), Ác. Succínico (Butanodióico), Ác. Tartárico (2,3- hidróxi Butanodióico)
Cumarinas	Lomatina (Jatamansinol)
Flavonóides	Acacetina, Apigenina, Crisoeriol, Diosmetina, Hidróxi-6-luteolina, Iso-hamnetina, Kaempferol, Luteolina, Luteolina-7-rutinosídeo, Luteolinosídeo, Luteolosídeo, Quercetina, Linarina
Polifenóis	6-Hidroxoluteolina, Àc. Clorogênico, Àc. Cafeico, Àc. Isoferúlico (Àc. Hesperetínico)
Iridóides	Valepotriatos e Gentiosídeos
Iridóides – Derivados	Baldrinal, Deacilbaldrinal, Homobaldrinal, Valtrato Hidrinas B1-B8, Valtrato Cloridrina, Valeclorina, Valeridina, Valerisodato
Monoterpenos	1,8-Cineol, α -Pinoeno, α -Terpineol, Alo-aromadendreno, β -Cubeneno, β -Ionona, β -Mirceno, β -Felandreno, Borneol, Canfeno, Carvacrol, Elêmola, γ -Terpineno (g-Terpineno), Geraniol, Isoborneol, Limoneno, Mirtenol, Sabineno, Terpineol, Terpinoleno Timol, Valeno, Valerato
Monoterpenos - Derivados	Acetato de Bornila, Isovalerato de Bornila, Isovalerato de Citronelila, Isovalerato de Eugenila, Acetato de Isobornila, Isovalerato de Isobornila
Sesquiterpenos	α -Bisaboleno, β -Bisaboleno, β -Patchouli, Azuleno, Carofileno, d-Bisaboleno, Eremofilona, Guaianolídeo, Valeranon (Jatamanson, Valeranal), Kessanol (alcool α -kessílico), Kessan, Kessoglicol, Ác. Valerenólico
Sesquiterpenos - Derivados	8-epi-Kessanolacetato
Triterpenos	Patrinosódeos C, Ci, D, Di, Sibirosídeos A, B, C, Isovalerato de Sitosterol

Continuação...

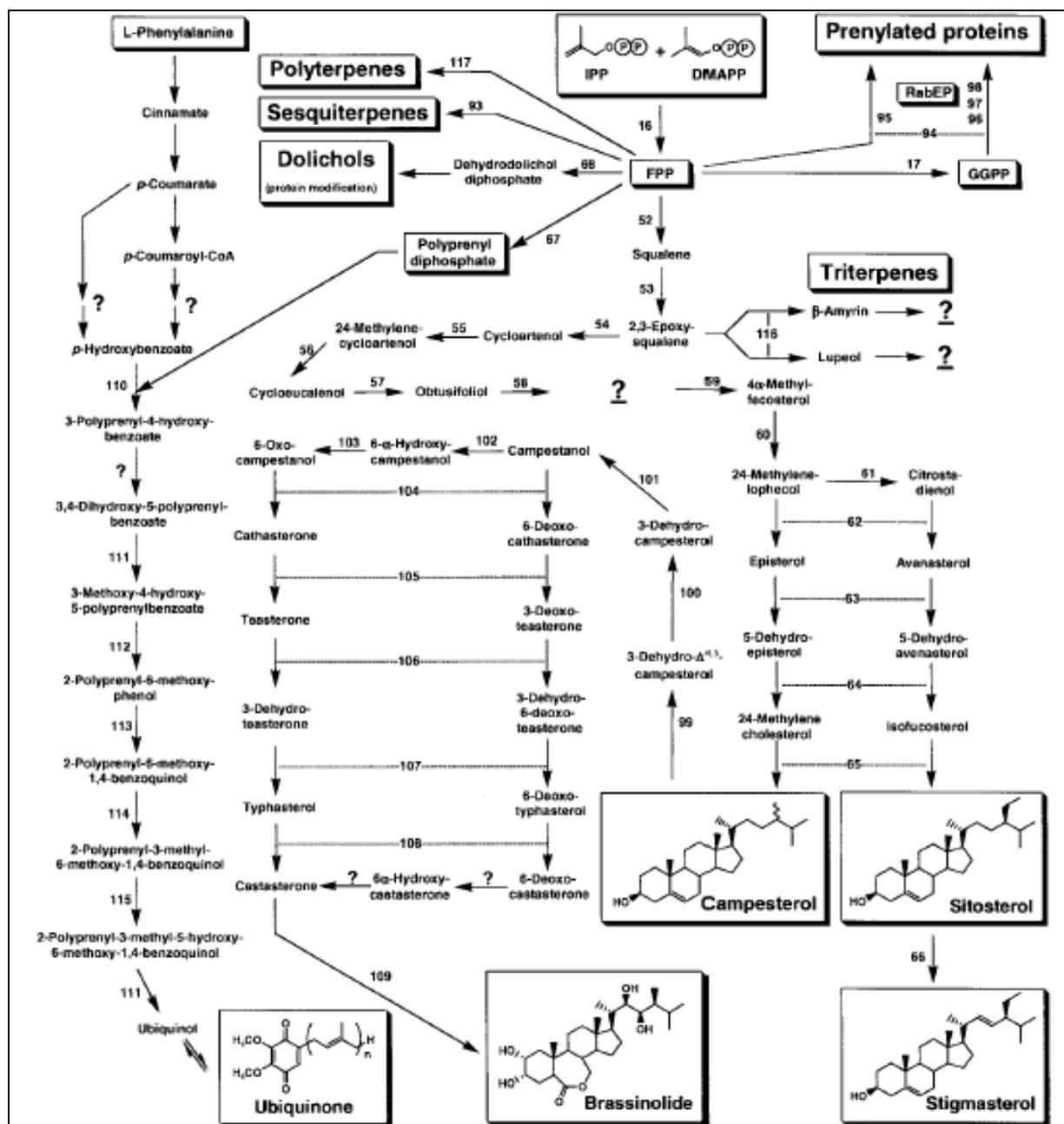
Classe de Metaból.	Compostos Encontrados
Saponinas Triterpenóides	Hederagenina, Ác. Oleanóico, Sapogenina
Poliacetilenos	3,5,7,9,11-Pentain-1-trideceno
Esteróis e Derivados	β -Sitosterol, Diosgentina, Palmitato de β -Sitosterina
Miscelaneous	2-Isdopropil-4-metilanisoil, Criptofauronol, Fauronol, Acetato de Fauronila, Kanokokosídeo, Kanokonol, Kongol, Ác. p-Cumárico, Alcool Patchouli, Eudesm-11-en-4a-ol,

APÊNDICE IV

Representação Esquemática da Biossíntese de Isoprenóides Produzidos na Rota Plastídica (Lange & Ghassemian, 2003).



Representação Esquemática da Biossíntese de Isoprenóides Produzidos na Rota Citosólica (Lange & Ghassemian, 2003).



Metabolismo dos isoprenóides derivados das rotas citosólica e mitocondrial. Seta sólida se refere às reações anabólicas e as linhas pontilhadas, às catabólicas. Enzimas conhecidas envolvidas no metabolismo dos isoprenóides estão numeradas e o sinal de interrogação se refere a etapas para as quais uma atividade enzimática ainda não foi demonstrada.

APÊNDICE V

**Relação de Espécies Caracterizadas Geneticamente que Apresentam a Rota da DXP,
suas Enzimas e Inibidores (Lichtenthaler, 2000)**

Presence of, and accession numbers for, gene sequences of the DOXP/MEP pathway of isoprenoid formation in higher plants, apicomplexa (<i>P. falciparum</i>) and in eubacteria					
The genes code for the enzymes DXS (<i>dxs</i>), DXR (<i>dxr</i>), CDP-ME synthase (<i>ygbP</i>), 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol (CDP-ME) kinase (<i>yhbB</i>) and 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (ME cyclodiphosphate) synthase (<i>ygbB</i>). The <i>dxs</i> , <i>dxr</i> , <i>ygbP</i> , <i>yhbB</i> and <i>ygbB</i> homologues have not been found in mammals and archaeobacteria and do not exist in the complete sequenced genomes of the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> or the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> . +, Highly similar sequences to the <i>E. coli dxs</i> , <i>dxr</i> , <i>ygbP</i> and <i>yhbB</i> genes have been found in these organisms, given as preliminary data in the database of the Institute of Genomic Research (http://www.tigr.org).					
Organism	<i>dxs</i>	<i>dxr</i>	<i>ygbP</i>	<i>yhbB</i>	<i>ygbB</i>
Plants					
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38854*	AJ242588†	AF230737†	AAC32234†	AAF07360†
<i>Capsicum annuum</i>	O78327†				
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	O81954†				
<i>Mentha piperita</i>	O64904†	AF116825†			AF179283†
<i>Oryza sativa</i>	O22567*				
Protozoan parasites					
<i>Plasmodium falciparum</i>	O96694†	O96693†			AAC71873†
Eubacteria: photosynthetic bacteria					
<i>Synechocystis</i> sp.§	P73067*	Q55663*	P74323*	P72663*	P73426*
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	Y18874†	AJ250721†			
<i>Chlorobium tepidum</i>	+	+	+	+	
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	P26242*		Q08113*		Q08113*
Eubacteria: pathogenic bacteria					
<i>Escherichia coli</i> ¶	P77488*	P45568*	Q46893*	P24209*	P36663*
<i>Haemophilus influenzae</i> §	P45205*	P44055*	O05029*	P45271*	P44815*
<i>Helicobacter pylori</i> §	Q9ZM94†	AAD05777†	AAD5981†		O25664*
<i>Chlamydia pneumoniae</i> §	Q9Z6J9†	Q9Z8J8†	AAD18718†	AE001363†	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	O07184*	Q10798*	P96864*	+	P96863*
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	+	+

APÊNDICE VI

Comparação de Genes Expressos em Ambas Rotas de Biossíntese de Isoprenóides
(Rohdich et al., 2001)

Terpenoid genes in completely sequenced organisms.														
Organism	Non-mevalonate pathway							Mevalonate pathway						
	<i>dxs</i>	<i>ispC</i>	<i>ispD</i>	<i>ispE</i>	<i>ispF</i>	<i>lytB</i>	<i>gcpE</i>	<i>mvaS</i>	<i>mvaA</i>	<i>mvaK1</i>	<i>mvaK2</i>	<i>mvaD</i>	<i>ipil</i>	<i>ipill</i>
Bacteria														
<i>Aquifex aeolicus</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+							+
<i>Buchnera</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Campylobacter jejuni</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Chlamydia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Deinococcus radiodurans</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+						+	
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	+	+	+	+	+						+	
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Synechocystis</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+							+
<i>Thermotoga maritima</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Trepomea pallidum</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	+	+	+	+					+		
<i>Xylella fastidiosa</i>	+	+	+	+	+	+	+							
<i>Borrelia burgdorferi</i>								+	+	+	+	+		+
Archaea														
<i>Aeropyrum pernix</i>								+	+	+				+
<i>Archeoglobus fulgidus</i>								+	+	+				+
<i>Halobacterium</i> sp.								+	+	+				+
<i>M. thermoautotrophicum</i>								+	+	+				+
<i>Methanococcus jannaschii</i>								+	+	+				+
<i>Pyrococcus abyssi</i>								+	+	+				+
<i>Pyrococcus horikoshii</i>			+					+	+	+				+
<i>Thermoplasma acidophilum</i>								+	+	+				+
Eukarya														
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Caenorhabditis elegans</i>								+	+	+	+	+	+	+
<i>Drosophila melanogaster</i>								+	+	+	+	+	+	+
<i>Homo sapiens</i>								+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								+	+	+	+	+	+	+

dxs, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; *ipil*, isopentenyl pyrophosphate isomerase type I; *ipill*, Isopentenyl pyrophosphate isomerase type II; *ispC*, 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase; *ispD*, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase; *ispE*, 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase; *ispF*, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; *mvaA*, HMG-CoA reductase; *mvaD*, mevalonate diphosphate decarboxylase; *mvaK1*, mevalonate kinase; *mvaK2*, phosphomevalonate kinase; *mvaS*, HMG-CoA synthase.

Rota do Mevalonato para biossíntese de isoprenóides: genes, enzimas e intermediários.

APÊNDICE VII

Relação de Espécies em que a Enzima DxPS Tem Sido Encontrada (Dubey et al., 2003)

Enzyme	Plant species
DOXP synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Capsicum annuum</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Mentha piperita</i> <i>Medicago truncatula</i>
DOXP reductoisomerase	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Mentha piperita</i>
CDP-ME synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Capsicum annuum</i>
CDP-ME kinase	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Mentha piperita</i>
MECP synthase	<i>Capsicum annuum</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Narcissus pseudonarcissus</i>
Terminal enzymes	
HMBPP synthase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
HMBPP reductase	<i>Capsicum annuum</i>

Resumo de enzimas presentes na rota da DxP (MEP ou Mevalonato independente) para biossíntese de isoprenóides vegetais.

APÊNDICE VIII

Relação de Proteínas que Participam da Rota MVA-independente em *A. thaliana* (Rodríguez-Concepción, M. & Boronat, A. 2002)

Table 1. *Arabidopsis* MEP pathway proteins

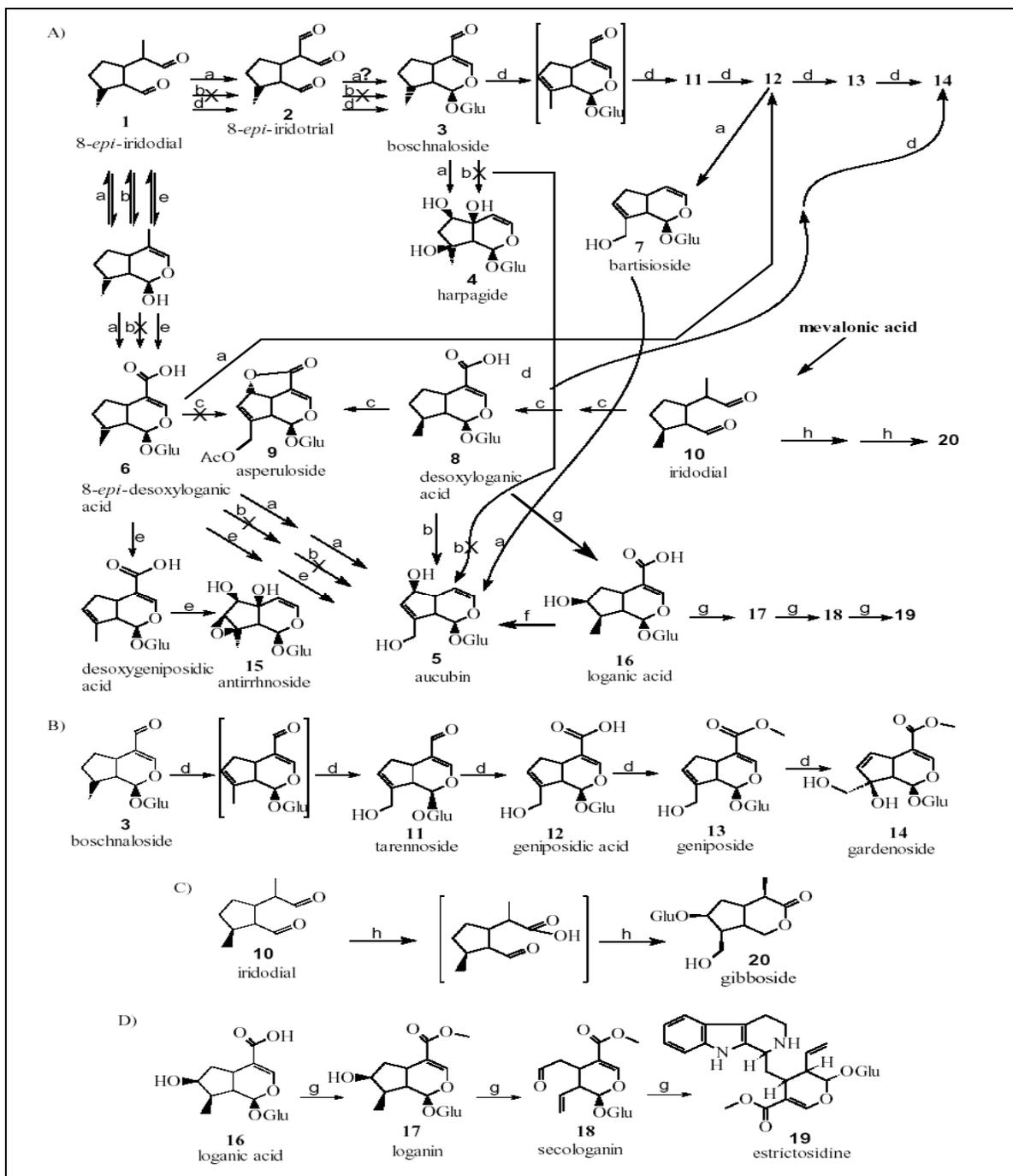
The enzymes that have been demonstrated to be involved in plastid isoprenoid biosynthesis are shown in bold. The length of the proteins and their predicted plastid targeting peptides (PTP) is indicated with the number of amino acid residues. The total number of ESTs in GenBank *Arabidopsis* collections (113,330 ESTs) is also shown.

Protein	Other Names	Accession No.	Length (PTP)	ESTs
DXS	CLA1	At4g15560	717 (58)	23
DXS2		At3g21500	628 (35)	3
DXS3		At5g11380	700 (47)	1
DXR	ISPC,YAEM	At5g62790	477 (49)	4
CMS	ISPD,YGBP	At2g02500	302 (61)	1
CMK	ISPE,YCHB	At2g26930	383 (41)	6
MCS	ISPF,YGBB	At1g63970	223 (52)	4
HDS	ISPG,GCPE	At5g60600	740 (38)	24
IDS	ISPH,LYTB	At4g34350	452 (38)	13

Elucidação da rota DxP, (ou MEP ou MVA-independente) para biossíntese de isoprenóides em bactérias e plastídeos.

APÊNDICE IX

Rotas de Biossíntese de Iridóides (Sampaio-Santos et al., 2001)



Seqüência proposta para biossíntese de iridóides. a) *Scrophularia umbrosa* 15, 16, b) *Buddleja albiflora* 15, c) *Theligon cynocrambe* 20, d) *Gardenia jasminoides* 18, 19, 21, e) *Antirrhinum majus* 23, 24, f) *Daphniphyllum macropodum* 5, *Aucuba japonica* 5, g) *Catharanthus roseus* 27, and h) *Patrinia gibbosa* 3.

APÊNDICE X

Composição dos Meios MS e B5 (Torres & Caldas, 1990.)

Componentes	Concentrações no MS (mM)	Concentrações no B5 (mM)
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	20.60	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	1.91
KNO ₃	18.8	24.70
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.99	1.02
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.50	1.01
KH ₂ PO ₄	1.25	-
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	-	1.05
Micronutrientes		
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.100	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	0.059
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0299	0.007
H ₃ BO ₃	0.100	0.048
KI	0.005	0.0045
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.001	0.001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0001	0.0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0001	0.0001
FeEDTA		
NaEDTA. 2H ₂ O	0.100	0.050
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.100	0.050
Orgânicos		
Glicina	0.0266	-
Ácido Nicotínico	0.004	0.008
Piridoxina.HCl	0.0024	0.0049
Tiamina.HCl	0.0003	0,030
Mio-Inositol	0.55	0.55
Sacarose	87.6	58.4

APÊNDICE XI

Espécies da Família Valerianaceae Micropropagadas e Cultivadas em Meio MS. Valores de Valepotriatos em % do Peso Seco (A) em Comparação aos Valores Obtidos da Literatura em Raízes de Plantas Intactas (B) (Becker & Schrall, 1980)

Tissue Culture Species	Valtrato		Acevaltrato		Didrovaltrato	
	A	B	A	B	A	B
<i>Valeriana officinalis</i>	-	0.05-1.0	-	0.01	-	0.01
<i>Valeriana wallichii</i>	0.66	0.60	0.34	0.40	0.10	1.40
<i>Valeriana alliariifolia</i>	0.36	2.50	0.23	-	0.06	0.30
<i>Valeriana sambucifolia</i>	0.40	-	0.02	-	traços	-
<i>Fedia cornucopiae</i>	1.38	0.60	0.08	0.01-0.02	0.30	0.01
<i>Centranthus ruber</i>	0.63	-	0.10	-	0.06	-
<i>Valerianella dentata</i>	0.80	0.20-0.60	0.19	0.05	traços	traços
<i>Valerianella coronata</i>	0.61	0.50-0.70	0.45	0.05	traços	traços
<i>Valerianella locusta</i>	0.88	0.05	0.21	traces	0.05	traços

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M.A.; ALI, A.M.; MARZIAH, M.; LAJIS, N.H. & ARIFF, A.B. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 54: 173-182, 1998.

ACTIS-GORETTA, L.; OTTAVIANI, J.I.; KEEN, C.L. & FRAGA, C.G. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. **FEBS Letters**, 555: 597-600, 2003.

ALTINCICEK, B.; HINTZ, M.; SANDERBRAND, S.; WIESNER, J.; BECK, E. & JOMAA, H. Tools for discovery of inhibitors of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase and DXP reductoisomerase: an approach with enzymes from the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, 190: 329-333, 2000.

ALTINCICEK, B.; KOLLAS, A.-K.; EBERL, M.; WIESNER, J.; SANDERBRAND, S.; HINTZ, M.; BECK, E. & JOMAA, H. LytB, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, 499: 37-40, 2001.

ANDREATINI, R. & LEITE, J.R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. **European Journal of Pharmacology**, 260 (2-3): 233-235, 1994.

ANDREATINI, R.; SARTORI, V.A.; SEABRA, M.L.V. & LEITE, J.R. Effect of valepotriates (valerian extract) in generalized anxiety disorder: a randomized placebo-controlled pilot study. **Phytotherapy Research**, 16(7): 650-654, 2002.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_internet.asp. Acesso em: 28/03/ 2007.

APÁTI, P.; SZENTMIHÁLYI, K.; KRISTÓ, Sz.T.; PAPP, I.; VINKLER, P.; SZOKE, É. & KÉRY, Á. Herbal remedies of Solidago - correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 32: 1045-1053, 2003.

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

ARGYROU, A. & BLANCHARD, J.S. kinetic and chemical mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate isomeroreductase. **Biochemistry**, 43: 4375-4384, 2004.

AVANCINI, G.; ABREU, I.N.; SALDANHA, M.D.A.; MOHAMED, R.S. & MAZZAFERA, P. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. **Phytochemistry**, 63: 171–175, 2003.

BACH, K.K.; GHIA, F. & TORSSELL, K.B.G. Valtrates and lignans in *Valeriana microphylla*. **Planta Medica**, 59: 478-479, 1993.

BACKLUND, A. & MORITZ, T. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in *Valeraneceae*. **Biological Systematics and Ecology**, 26: 309-335, 1998.

BALDWIN, I.T.; HALITSCHKE, R.; KESSLER, A. & SCHITTKO, U. Merging molecular and ecological approaches in plant–insect interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, 4: 351–358, 2001.

BANERJEE, S.; RAHMAN, L.; UNIYAL, G.C.; & AHUJA, P.S. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots cultures of *Valeriana wallichii* DC. **Plant Sciences** 131:203-2081998.

BENT, S.; PADULA, A.; MOORE, D.; PATTERSON, M.; MEHLING, W. Valerian for sleep: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Medicine*, 119: 1005-1012, 2006.

BARBOSA, S. **Ervas brasileiras enriquecem capital estrangeiro**. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br>>. Acesso em: Abril/2005.

BARKOVICH, R. & LIAO, J.C. Metabolic Engineering of Isoprenoids. **Metabolic Engineering**, 3: 27-39, 2001.

BEAUBRUN, G. & GRAY, G.E. A review of herbal medicines for psychiatric disorders. **Psychiatric Services**, 51(9):1130-1134, 2000.

BECKER, H. & SCHRALL, E. Valepotriates in tissue cultures of nine different Valerianaceae species in comparison to literature data of the intact plants. **Journal of Natural Products**, 43(6): 721-723, 1980.

CHAVADEJ, S. & WEBERLING, F. Valepotriates in *Valeriana thalictroides*. **Planta Medica**, 49(1): 64, 1983.

BERGAN T. Pharmacokinetic comparison between fosfomicin and other phosphonic acid derivatives. **Chemotherapy**, 36 (Suppl 1): 10-18, 1990.

BETA, T.; NAM, S.; DEXTER, J.E. & SAPIRSTEIN, H.D. Phenolic content and antioxidant activity of pearled. **Wheat Cereal Chemistry**, 82(4): 390-393, 2005.

BICCHI, C.; BINELLO, A. & RUBIOLO, P. Packed column SFC/UV versus HPLC/UV analysis of valerenic acids and valepotriates in extracts of *Valeriana officinalis* L. **Phytochemical Analysis**, 11(3): 179-183, 2000.

BICK, J.A. & LANGE, B.M. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 415: 146–154, 2003

BOJE, K.; LECHTENBERG, M. & NAHRSTED, A. New and known iridoid- and phenylethanoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* and their in vitro inhibition of human leukocyte elastase. **Planta Medica**, 69 (9): 820-825, 2003.

BOLAND, W.; HOPKE, J.; DONATH, J.; NUESKE, J. & BUBLITZ, F. Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. **Angew Chemistry (Int. Ed. England)**, 34:1600-1602, 1995.

BONDAREV, N.; RESHETNYAK, O. & NOSOV, A. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. **Plant Science**, 165:845–850, 2003.

BOROS, C.A. & STERMITZ, F.R. Iridoids. An update review. Part I. **Journal of Natural Products**, 53: 1055, 1990.

BORRMANN, S.; ISSIFOU, S.; ESSER, G.; ADEGNIKA, A.A.; RAMHARTER, M.; MATSIEGUI, P.B.; OYAKHIROME, S.; MAWILI-MBOUMBA, D.P.; MISSINOU, M.A.; KUN, J.F.; JOMAA, H. & KREMSNER, P.G. Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Infectious Diseases**, 190(9): 1534-1540, 2004.

BOS, R.; WOERDENBAG, H.J.; HENDRIKS, H.; ZWAVING, J.H.; DESMET, P.A.G.M.; TITTEL, G.; WIKSTROM, H.V. & SCHEFFER, J.J.C. Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations. **Phytochemical Analysis**, 7(3): 143-15, 1996.

BOS, R.; HENDRIKS, H.; SCHEFFER, J.C. & WOERDENBAG, H.J. Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. **Phytomedicine**, 5(3):219-225, 1998 a.

BOS, R.; WOERDENBAG, H.J.; van-PUTTEN, F.M.S.; HENDRIKS, H & SCHEFFER, J.J.C. Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. **Planta Medica**, 64(2): 143-147, 1998 b.

BOS, R.; WOERDENBAG, H.J. & PRAS, N. Determination of valepotriates. **Journal of Chromatography**, 967(1):131-146, 2002.

BOUNTHANH, C.; BERGMANN, C.; BECK, J.P.; HAAG-BERRURIER, M. & ANTON, R. Valepotriates, a new class of cytotoxic and antitumor agents. **Planta Medica**, 41:21–28, 1981.

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

BRANDLE, J.E.; RICHMAN, A.; SWANSON, A.K. & CHAPMAN, B.P. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. **Plant Molecular Biology**, 50: 613-622, 2002.

BULGAKOV, V.P.; TCHERNODED, G.K.; MISCHENKO, N.P.; KHODAKOVSKAYA, M.V.; GLAZUNOV, V.P.; RADCHENKO, S.V.; ZVEREVA, E.V.; FEDOREYEV, S.A. & ZHURAVLEV, YN. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on

anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. **Journal of Biotechnology**, 97: 213-221, 2002.

BURLAT, V.; OUDIN, A.; COURTOIS, M.; RIDEA, M. & ST-PIERRE, B. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. **The Plant Journal**, 38: 131-141, 2004.

CAETANO, L.C.; CHARLWOOD, B.V. & GAHAN, P.B. The localisation and accumulation of valepotriates in hairy roots of *Valerianella discoidea* (L.) Loisel. **Phytochemical Analysis** 10 (4): 181,1999.

CARRETERO-PAULET, L.; AHUMADA, I.; CUNILLERA, N.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; FERRER, A.; BORONAT, A. & CAMPOS, N. Expression and molecular analysis of the arabidopsis dxr gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. **Plant Physiology**, 129: 1581–1591, 2002.

CASTILLO, P.; MARQUEZ, J.; RUBLUO, A.; HERNANDEZ, G. & LARA, M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis ssp procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, 151(2): 115-119, 2000.

CASTILLO, P.; ZAMILPA, A.; MÁRQUEZ, J.; HERNÁNDEZ, G.; LARA, M. & ALVAREZ, L Comparative study of differentiation levels and valepotriate content of *in vitro* cultures and regenerated and wild plants of *Valeriana edulis ssp. procera*. **Journal of Natural Products**, 65:573-575, 2002.

CHAHED, K.; OUDIN, A.; GUIVARC'H, N.; HAMDI, S.; CHENIEUX, J.-H.; RIDEAU, M. & CLASTRE, M. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from periwinkle: cDNA identification and induced gene expression in terpenoid indole alkaloid producing cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38: 559-566, 2000.

CHARLWOOD, B.V.; CHARLWOOD, K.A. & MOLINA-TORRES, J. Accumulation of secondary compounds organised plant cultures. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (eds.). **Secondary Products From Plant Tissue Culture**. Clarendon Press. Oxford, Cap.9, p.167- 200, 1990.

CHEN Y-Q, FEI Y, CAI M, LOU J-X. Effects of amino acids, nitrate, and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*. **Plant Growth Regulation**, 41:265-268, 2003.

CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, 21: 89-93, 2003.

CONTIN, A.; VAN DER HEIJDEN, R.; LEFEBER, A.W.M. VERPOORTE, R. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. **FEBS Letters** 434: 413-416, 1998.

CORSINO, J.; SILVA, D.H.S.; ZANONI, M.V.B.; BOLZANI, V.D.S.; FRANCA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. & FURLAN, M. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, 17(8): 913-916, 2003 .

COURTOIS, M.; MINCHEVA, Z.; ANDREU, F.; RIDEAU, M. & VIAUD-MASSUARD, M.C. Synthesis and biological evaluation with plant cells of new fosmidomycin analogues containing a benzoxazolone or oxazolopyridinone ring. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 19(6): 559-565, 2004.

COXETER, P.D.; SCHLUTER, P.J.; EASTWOOD, H.L.; NIKLES, C.J. & GLASZIOU, P.P. Valerian does not appear to reduce symptoms for patients with chronic insomnia in general practice using a series of randomised n-of-1 trials. **Complementary Therapies in Medicine**, 11: 215-222, 2003.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia Universal Press, 1981.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M. & LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM W, JONES R. Editors. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000, chapter 24, p. 1250-1268.

CROWELL, D.N.; PACKARDA, C.E.; PIERSONA, C.A.; GINERB, J.-L.; DOWNES, B.P. & S. CHARY, N. Identification of an allele of CLA1 associated with variegation in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, 118: 29-37, 2003.

CUNNINGHAM FX, LAFOND TP, GANTT E. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, 182(20): 5841-5848, 2000 .

De CARVALHO, C.B.; MAURMANN, N.; LUZ, D.; FETT-NETO, A.G. & RECH, S . Control of development and valepotriate production by auxins in micropropagated *Valeriana glechomifolia*. **Plant Cell Reports**, 23: 251-255, 2004.

DICKE, M.; VAN BEEK, T.A.; POSTHUMUS, M.A.; BEN, D.; VAN BOKHOVEN, H. & GROOT, A.E. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. Involvement of host plant in its production. **Journal of Chemical Ecology**, 16: 381-396, 1990.

DONATH, F.; QUISPE, S.; DIEFENBACH, K.; MAURER, A.; FIETZE, I. & ROOTS, I. Critical evaluation of the effect of valerian extract on sleep structure and sleep quality. Comment in: *Pharmacopsychiatry*, 33(6):239, 2000. **Pharmacopsychiatry**, 33(2):47-53, 2000.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R. & LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Bioscience**, 28(5): 637–646, 2003.

EISENREICH, W.; SAGNER, S.; ZENK, M.H. & BACHER, A. Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. **Tetrahedron Letters**, 38(22): 3889-3892, 1997

EISENREICH, W.; ROHDICH, F. & BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Review. **Trends in Plant Science**, 6(2): 78-84, 2001.

EISENREICH, W.; BACHER, A.; ARIGONI, D. & ROHDICH, F. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular And Molecular Life Sciences**, 61(12): 1401-1426, 2004.

ERASTO, P.; BOJASE-MOLETA, G.; MAJINDA, R.R.T. Antimicrobial and antioxidant favonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*. **Phytochemistry**, 65: 875-880, 2004.

ERIKSEN, B. Notes on generic and infrageneric delimitation in the Valerianaceae. **Nordic Journal of Botany**, 9(2): 179-187, 1989.

ESTÉVEZ, J.M.; CANTERO, A.; ROMERO, C.; KAWAIDE, H.; JIMENEZ, L.F.; KUZUYAMA, T.; SETO, H.; KAMIYA, Y. & LEON, P. Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 124: 95-103, 2000.

ESTÉVEZ, J.M.; CANTERO, A.; REINDL, A.; REICHLER, S.; LEÓN, P. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, 276(25): 22901–22909, 2001.

ETIENNE, H. & BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69:215-231, 2001.

FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, 4:129-134, 1992.

FELLERMEIER, M.; SAGNER, S.; SPITELLER, P.; SPITELLER, M. & ZENK, M.H. Early steps of deoxyxylulose phosphate pathway in chromoplasts of higher plants. **Phytochemistry**, 64(1): 199-207, 2003.

FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A.C. & MARDER, M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 77: 399–404, 2004.

FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A.C. & MARDER, M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. **European Journal of Pharmacology**, 539: 168-176, 2006.

FIELDS, A.M.; RICHARDS, T.A.; FELTON, J.A.; FELTON, S.K.; BAYER, E.Z.; IBRAHIM, I.N. & KAYE, A.D. Analysis of responses to valerian root extract in the feline pulmonary vascular bed. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 9(6): 909-918, 2003

FUZZATI, N.; WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K.; MSONTHI, J.D.; MAVI, S. & MOLLEYRES, L.P. Isolation of antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the

search for valepotriates in crude Valerianaceae extracts. **Phytochemical Analysis**, 7(2):76-85, 1996.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151–158, 1968.

GAO, X.Q. & BJORK, L. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of *Valeriana*. **Fitoterapia**, 71(1):19-24, 2000.

GAO, X.; ZENG, X.; XIA, K.; YOSHIHARA, T. & ZHOU, X. Interactive effects of methyl jasmonate and salicylic acid on floret opening in spikelets of Sorghum. **Plant Growth Regulation**, 43: 269–273, 2004.

GE, X. & WU, J. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. **Plant Science**, 168: 487-491, 2005.

GENARO, A.R. **Remington's pharmaceutical science**. 19 ed. Easton: Merk, 1999.

GERDOV, S.M.; GRISHIN, Y.K.; ROZNYATOVSKY, V.A.; USTYNYUK, Y.A.; KUCHIN, A.V.; ALEKSEEV, I.N. & FROLOVA, L.L. Quantitative ²H NMR spectroscopy "H/D-Isotope portraits" of cyclic monoterpenes and discrimination of their biosynthetic pathways. **Russian Chemical Bulletin**, 54(5): 1258-1265, 2005.

GIRI, A. & NARASU, M.L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications **Biotechnology Advances**, 18: 1-22, 2000.

GLASS, J.R.; SPROULE, B.A.; HERRMANN, N. & BUSTO, U.E. The acute pharmacological effects of temazepam, diphenhydramine and valerian in healthy elderly subjects. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 71(2): 6, 2002.

GLASS, J.R.; SPROULE, B.A.; HERRMANN, N.; STREINER, D. & BUSTO, U.E. Acute pharmacological effects of temazepam, diphenhydramine, and valerian in healthy elderly subjects. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, 23 (3): 260-268, 2003 .

GONTIER, E.; CLÉMENT, A.; GRAVOT, T.A.; LIÈVRE, A.; GUCKERT, F. & BOURGAUD, F. Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production. **Plant Science**, 163:723-732, 2002.

GOTTLIN, E.B.; BENSON, R.E.; CONARY, S.; ANTONIO, B.; DUKE, K.; PAYNE, E.S.; ASHRAF, S.S. & CHRISTENSEN, D. High-throughput screen for inhibitors of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase by surrogate ligand competition. **Journal of Biomolecular Screening**, 8(3): 332-339, 2003.

GOULART, H.R.; KIMURA, E.A.; PERES, V.J.; COUTO, A.S.; DUARTE, F.A.A. & KATZIN, A.M. Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(7): 2502-2509, 2004.

GOUTMAN, J.D.; WAXEMBERG, M.D.; DONATE-OLIVER, F.; POMATA, P.E. & CALVO, D.J. Flavonoid modulation of currents mediated GABA_A and GABA_C receptors. **European Journal of Pharmacology**, 461: 79-87, 2003.

GRAEF, F.G. **Drogas psicotrópicas e seu mecanismo de ação**. 2 ed. São Paulo: EPU, p. 61-83, 1990.

GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P. & KAPETANIDIS, I. High-yield production of valepotriates by hairy roots cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. **Plant Cell Reports**, 11:339-342, 1992.

GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P. & VUAGNAT, P. Rapid high-performance liquid-chromatographic quantification of valepotriates in hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia* Mikan. **Phytochemical Analysis**, 5(6): 297-301, 1994.

GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P.; KAMALAPRIJA, P. & BURGER, U. An iridoid diester from *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia* hairy roots. **Phytochemistry**, 38(1):103-105, 1995a.

GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P. & KAPETANIDIS, I. Production of valepotriates by hairy root cultures of *Centranthus ruber* Dc. **Plant Cell Reports**, 14(5): 294-298, 1995b

GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P. & KAPETANIDIS, I. Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia*. **Phytochemistry**, 40(5):1421-1424, 1995c.

GREGIANINI, T.S.; PORTO, D.D.; NASCIMENTO, N.C. DO; FETT, J.P.; HENRIQUES, A.T. & FETT-NETO, A.G. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. **Journal of Chemical Ecology**, 30(10): 2023-2036, 2004.

GRIESHABER, N.A.; FISCHER, E.R.; MEAD, D.J.; DOOLEY, C.A. & HACKSTADT, T. Chlamydial histone–DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 101(19): 7451-7456, 2004.

GROLLE, S.; BRINGER-MEYER, S. & SAHM, H. Isolation of the dxr gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. **FEMS Microbiology Letters**, 191: 131-137, 2000.

GUTIERREZ, S.; ANG-LEE, M.K.; WALKER, D.J. & ZACNY, J.P. Assessing subjective and psychomotor effects of the herbal medication valerian in healthy volunteers **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 78 (1): 57-64, 2004

GUTIÉRREZ-NAVA, M. de la L.; GILLMOR, C.S.; JIMÉNEZ, L.F.; GUEVARA-GARCÍA, A. & LEÓN, P. Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. **Plant Physiology**, 135, pp. 471-482, 2004,

HALLAM, K.T.; OLVER, J.S.; McGRATH, C. & NORMAN, T.R. Comparative cognitive and psychomotor effects of single doses of Valeriana officianalis and triazolam in healthy volunteers. **Human Psychopharmacology-Clinical and Experimental**, 18(8): 619-625, 2003

HAMANO, Y.; DAIRI, T.; YAMAMOTO, M.; KUZUYAMA, T.; ITOH, N. & SETO, H. Growth-phase dependent expression of the mevalonate pathway terpenoid antibiotic-producing *Streptomyces* strain. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 66 (4): 808-819, 2002.

SCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55: 77-84, 1999.

HARALAMPIDIS, K.; TROJANOWSKA, M. & OSBOURN, A.E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. **Advanced in Biochemical Engineering and Biotechnology**, 75, p.31-49, 2002.

HEMMERLIN, A.; HOEFFLER, J.-F.; MEYER, O.; TRITSCH, D.; KAGAN, I.A.; GROSDÉMANGE-BILLIARD, C.; ROHMER, M. & BACH, T.J. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 278(29): 26666-26676, 2003.

HERRMANN, K.M. & WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 50: 473-503, 1999.

HERRERA-ARELLANO, A.; LUNA-VILLEGAS, G.; CUEVAS-URIOSTEGUI, M.L.; ALVAREZ, L.; VARGAS-PINEDA, G.; ZAMILPA-ALVAREZ, A. & TORTORIELLO, J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. **Planta Medica**, 67(8): 695-699, 2001

HILLER, K.O. & KETLER, G. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L: behavioural and anticonvulsant activities. **Physiotherapy Resesearch Int**, 10:145-51, 1996.

HINTZ, M.; REICHENBERG, A.; ALTINCICEK, B.; BAHR, U.; GSCHWIND, R.M.; KOLLAS, A.-K.; BECK, E.; WIESNER, J.; EBERL, M. & JOMAA, H. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human QN T cells in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, 509: 317-322, 2001.

HOBBS, C. Valerian: a literature review. **HerbalGram**, 21: 19-34,1989.

HOEFFLER, J.-F.; HEMMERLIN, A.; GROSDEMANGE-BILLIARD, C.; BACH, T.J. & ROHMER, M. Isoprenoid biosynthesis in higher plants and in *Escherichia coli*: on the branching in the methylerythritol phosphate pathway and the independent biosynthesis of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate. **Biochemistry Journal**, 366: 573-583, 2002.

HÖLZL, J. **The pharmacology and therapeutics of Valeriana**. In: Houghton, P.J.(Ed). Valerian. The Netherlands: Harwood, p. 55-75, 1997.

HONG, S.B.; HUGHES, E.H.; SHANKS, J.V.; SAN, K.Y. & GIBSON, S.I. Role of the non-mevalonate pathway in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots. **Biotechnology Progress**, 19(3): 1105-1108, 2003.

HOUGHTON, P.J. The biological activity of valerian and related plant. **Journal of Ethnopharmacology**, 22(2):121-142, 1988.

HOUGHTON, P.J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 51(5): 505-512, 1999.

HOUSTI, F.; ANDARY, C.; GARGADENNEC, A. & AMSSA, M. Effect of wounding and salicylic acid on hydroxycinnamoylmalic acids in *Thunbergia alata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40: 761-769, 2002.

HUI-LIAN, W.; DONG-FANG, Z.; ZHAO-FENG, L.; YANG, L.; QIAN-RONG, L. & YU-ZHEN, W. *In vitro* study on the genotoxicity of dichloromethane extracts of valerian (DEV) in human endothelial ECV304 cells and the effect of vitamins E and C in attenuating the DEV-induced DNA damages. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 188(1): 36-41, 2003.

JEONG, T.C.; KIM, H.J. & PARK, J.I.. Protective effects of red ginseng saponins against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague Dawley rats. **Planta Medica**, 63(2): 136-140, 1997.

JOHNSON, R.D. & WALTER, G.R. Isolation of actinidine from *Valeriana officinalis*. **Phytochemistry**, 10(12):3334-3335, 1971.

JOMAA, H.; WIESNER, J.; SANDERBRAND, S.; ALTINCICEK, B.; WEIDEMEYER, CLAUS.; HINTZ, M.; TÜRBACHOVA, I.; EBERL, M.; ZEIDLER, J.; LICHTENTHALER, H.K.; SOLDATI, D. & BECK, E. Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. **Science**, 285: 1573-1576, 1999.

JOSEKUTTY, P.C. Inhibition of plant growth by mevinolin and reversal of this inhibition by isoprenoids. **South African Journal of Botany**, 64 (1): 18-24, 1998.

JUNG, V.; OLSSON, E.; CASPERSEN, S.; ASP, H.; JENSÉN, P. & ALSANIUS, B.W. Response of young hydroponically grown tomato plants to phenolic acids. **Scientia Horticulturae**, 100: 23-37, 2004.

KACHROO, A.; LAPCHYK, L.; FUKUSHIGE, H.; HILDEBRAND, D.; KLESSIG, D. & KACHROO, P. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid-and jasmonic acid-mediated defense pathways in the Arabidopsis ssi2 mutant. **The Plant Cell**, 15: 2952-2965, 2003.

KANG, S.-M.; JUNG, H.-Y.; KANG, Y.-M.; YUN, D.-J.; BAHK, J.-D.; YANG, J.-K. & CHOI, M.-S. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. **Plant Science**, 166: 745-751, 2004.

KAPCZINSKI, F. & RIBEIRO, L. Ansiedade. In: KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. & ISQUIERDO, I. (Ed). **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**. São Paulo: Artmed, p. 137-149, 2000.

KARL, T.; FALL, R.; ROSENSTIEL, T.N.; PRAZELLER, P.; LARSEN, B.; SEUFERT, G. & LINDINGER, W. On-line analysis of the ¹³CO₂ labeling of leaf isoprene suggests multiple subcellular origins of isoprene precursors. **Planta**, 215(6): 894-905, 2002.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T. & JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, 94: 550-557, 2006.

KAUR, R.; SOOD, M.; CHANDER, S.; MAHAJAN, R.; KUMAR, V. & SHARMA, D.R. In vitro propagation of *Valeriana jatamansi*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 59(3): 227-229, 1999.

KEOCHANHALABOUNTHANH, C.; BECK, J.P.; HAAGBERRURIER, M. & ANTON, R. Effects of 2 monoterpene esters, valtrate and didrovaltrate, isolated from *Valeriana wallichii*, on the ultrastructure of hepatoma-cells in culture. **Phytotherapy Research**, 7(2):124-127, 1993.

KESSLER, A. & BADLDWIN, I.T. Herbivore-induced plant vaccination. Part I. The Orchestration of plant defenses in nature and their fitness consequences and the wild tobacco *Nicotiana attenuata*. **The Plant Journal**, 38: 639-649, 2004.

KHEMVONG, S. & SUVACHITTANONT, W. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase from oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. **Plant Science**, 169: 571-578, 2005.

KITTIPONGPATANA, N.; DAVIS, D.L. & PORTER, J.R. Methyl jasmonate increases the production of valepotriates by transformed root cultures of *Valerianella locusta*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 71(1):65-75, 2002.

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

KOETTER, U.W.; ABOURASHED, E.; BRATTSTROM, A. & SCHELLENBERG, R. Effects of a fixed valerian-hops extract combination (ZE 91019) on quantitative EEG data in healthy subjects with caffeine induced hyperarousal. **SLEEP**, 25: A46-A46 Suppl. 062, 2002.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.-H. & ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. Analytical, Nutritional and Clinical Methods. **Food Chemistry**, 2006.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário de especialidades farmacêuticas**. Ed. 1998/1999. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-10, 1999.

KORTH, K.L.; JAGGARD, D.A. & DIXON, R. Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. **The Plant Journal**, 23(4): 507-516, 2000.

KUNTZ, L.; TRITSCH, D.; GROSDÉMANGE-BILLIARD, C.; HEMMERLIN, A.; WILLEM, A.; BACH, T.J. & ROHMER, M. Isoprenoid biosynthesis as a target for antibacterial and antiparasitic drugs: phosphonohydroxamic acids as inhibitors of deoxyxylulose phosphate reducto-isomerase. **Biochemistry Journal**, 386(Pt 1): 127-35, 2005.

KUZUYAMA, T.; TAKAGI, M.; TAKAHASHI, S. & SETO, H. Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. **Journal Of Bacteriology**, 182(4): 891-897, 2000a.

KUZUYAMA, T.; TAKAGI, M.; KANEDA, K.; DAIRI, T. & SETO, H. Formation of 4-(cytidine 50-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. **Tetrahedron Letters**, 41: 703-706, 2000b.

KUZUYAMA, T.; TAKAGI, M.; KANEDA, K.; WATANABE, H.; DAIRI, T. & SETO, H. Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 50-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol to its 2-phospho derivative by 4-(cytidine 50-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase. **Tetrahedron Letters**, 41: 2925-2928, 2000c.

KUZUYAMA, T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 66(8): 1619-1627, 2002.

LANGE, B.M.; WILDUNG, M.R.; McCASKILL, D. & CROTEAU, R. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. **Proceeding National Academic Science**, 95: 2100-2104, 1998.

LANGE, B.M. & CROTEAU, R. Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 365(1): 170-174, 1999.

LANGE, B.M.; RUJAN, T.; MARTIN, S.W. & CROTEAU, R. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. **Proceeding National Academic Science USA**, 97(24): 13172-13177, 2000.

LANGE, B.M.; KETCHUM, R.E.B. & CROTEAU, R. B. Isoprenoid biosynthesis. Metabolite profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis. **Plant Physiology**, 127: 305-314, 2001.

LANGE, B.M.; & GHASSEMIAN, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. **Plant Molecular Biology**, 51: 925-948, 2003.

LARSEN, B.B. A taxonomic revision of *Phyllactis* and *Valeriana* sect. *Bracteata* (Valerianaceae). **Nordic Journal of Botany**, 6(4): 427-446, 1986.

LEE, K.T.; HIRANO, H.; YAMAKAWA, T.; KODAMA, T.; IGARASHI, Y. & SHIMOMURA, K. Responses of transformed root culture of *Atropa belladonna* to salicylic acid stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 91: 586-589. 2001.

LEE, M-H; JEONG, J-H; SEO, J-W; SHIN, C.-G.; KIM, Y.-S.; IN, J.-G.; YANG, D.-C.; YI J.-S. & CHOI, Y.-E. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. **Plant Cell Physiology**, 45(8): 976-984, 2004.

LELL, B.; RUANGWEERAYUT, R.; WIESNER, J.; MISSINOU, M.A.; SCHINDLER, A.; BARANEK, T.; HINTZ, M.; HUTCHINSON, D.; JOMAA, H. & KREMSNER, P.G. Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(2): 735-738, 2003.

LICHTENTHALER, H.K.; SCHWENDER, J.; DISCH, A. & ROHMER, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. **FEBS Letters**, 400: 271-274, 1997.

LICHTENTHALER, H.K. Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. **Biochemical Society Transactions**, 28(part 6): 785-789, 2000a.

LICHTENTHALER, H.K.; ZEIDLER, J.; SCHWENDER, J. & MULLER, C. The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, 55(5-6): 305-313, 2000b.

LIN, L.D.; WU, J.Y.; HO, K.P. & QI, S.Y. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. **Ultrasound Medicine and Biology**, 27:1147-1152, 2001.

LIN, L. & WU, J. Enhancement of shikonin production in single and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. **Biotechnology and Bioengineering**, 78:81-88, 2002.

LIU, C.Z.; HONDA, K.H. & KOBAYASHI, T. *In situ* regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus immobilized in polyurethane foam. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 91:76-80, 2001.

LIU, C.Z.; MURCH, S.J.; EL-DEMERDASH, M. & SAXENA, P.K. *Artemisia judaica*: micropropagation and antioxidant activity. **Journal of Biotechnology**, 110:63-71, 2004.

LIU, Y.; TAKATSUKI, H.; YOSHIKOSHI, A.; WANG, B. & SAKANISHI, A. Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H⁺-ATPase activity of *Aloe arborescens* callus cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 32: 105-116, 2003.

LIU, Z.; YU, L.J.; LI, C.Y. & ZHA, C.F. Effects of fosmidomycin and lovastatin treatment on taxol biosynthesis in suspension culture cells of *Taxus chinensis*. **Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao**, 31(2): 199-204, 2005.

LOIS, L.M.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; GALLEGU, F.; CAMPOS, N. & BORONAT, A. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase. **The Plant Journal**, 22: 503-513, 2000.

LORETO, F.; CICCIOI, P.; BRANCALEONI, E.; CECINATO, A.; FRATTONI, M.; & SHARKEY, T.D. Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. **Proceedings in National Academic Science**, 93: 9966-9969, 1996.

LORETO, F. & VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, 127: 1781-1787, 2001.

LORETO, F.; PINELLI, P.; BRANCALEONI, E. & CICCIOLO, P. ^{13}C labeling reveals chloroplastic and extrachloroplastic pools of dimethylallyl pyrophosphate and their contribution to isoprene formation. **Plant Physiology**, 135: 1903-1907, 2004.

LOUNASMAA, M. & GALAMBOS, J. Indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. In: HERZ, W., GRISEBACH, H., KIRBY, G.W., TAMM, CH. (eds). **Progress in the chemistry of organic natural products**. New York. Springer-Verlag, p.89-115, 1989.

LÜCKER, J.; EL TAMER, M.K.; SCHWAB, W.; VERSTAPPEN, F.W.A.; VAN DER PLAS, L.H.W.; BOUWMEESTER, H.J. & VERHOEVEN, H.A. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. **European Journal of Biochemistry**, 269: 3160-3171, 2002.

MAHMOUD, S.S. & CROTEAU, R.B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proceeding National Academic Science**, 98(15): 8915-8920, 2001.

MAHMOUD, S.S. & CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, 7(8): 366-373, 2002.

MALVA, J.O.; SANTOS, S.; & MACEDO, T. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extracts. **Neurotoxicity Research**, 6 (2): 131-140, 2004.

MANNENSTÄTER, E.; GERLACH, H. & POETHKE, W. Phytochemical studies on *Centranthus ruber*. **Pharmazie**, 21(3): 321-327, 1966.

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C. FERNÁNDEZ, S.; MEDINA, J.H. & PALADINI, A.C. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 75:537-545, 2003.

MARIOT, A.; HENRIQUES, A.T.; LAPA, A.J. *et al.* (orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 1999. 821p.

MARTIN, D.; THOLL, D.; GERSHENZON, J. & BOHLMANN, J. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway Spruce stems. **Plant Physiology**, 129: 1003-1018, 2002

MASSÉ, G.; BELT, S.T.; ROWLAND, S.J. & ROHMER, M. Isoprenoid biosynthesis in the diatoms *Rhizosolenia setigera* (Brightwell) and *Haslea ostrearia* (Simonsen). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 101(13): 4413-4418, 2004.

MATHUR, J.; AHUJA, P.S.; MATHUR, A.; KUKREJA, A.K. & SHAH, N.C. *In vitro* propagation of *Valeriana wallichii*. **Planta Medica**, 54:82-83, 1988.

MATHUR, J. Plantlet regeneration from suspension cultures of *Valeriana wallichii* DC. **Plant Science**, 81: 111-115, 1992.

MAURMAN, N. **Estudo da exudação de valepotriatos e da sobrevivência de plântulas de Valeriana glechomifolia cultivadas em meio líquido frente a diferentes agentes permeabilizantes**. Monografia de Conclusão de Curso em Farmácia. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2004.

MAURMANN, N.; De CARVALHO, C.M.B. de ; SILVA, A.L. ; FETT-NETO, A.G.; POSER, G Von & RECH, S. Valepotriates accumulation in callus, suspended cells and untransformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, 42(1): 50-53, 2006.

MEHRTENS. F.; KRANZ, H.; BEDNAREK, P.; WEISSHAAR, B. The arabidopsis transcription factor myb12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Physiology**, 138: 1083-1096, 2005.

MEMELINK, J.B.; VERPOORTE, R. & KIJNE, J.W. ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. **Trends in Plant Science**, 6: 212-219, 2001.

MENKE, F.L.H.; PARCHMANN, S.; MUELLER, M.J.; KIJNE, J.W. & MEMELINK, J. Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. **Plant Physiology**, 119:1289-1296.1999.

MENNINI, T.; BEMASCONI, P. & BOMDARDELLI, E. *In vitro* study of interaction of extracts and pure compounds from valerian, a officinalis root with GABA, benzodiazepine and barbituate receptors in rat brain. **Fitoterpia**, 54:291-300,1993.

MIKELL, J.R.; GANZERA, M. & KHAN, I.A. Analysis of sesquiterpenes in *Valeriana officinalis* by capillary electrophoresis. **Pharmazie**, 56: 946-948, 2001.

MILANE, H.A.; UBEAUD, G.; VANDAMME, T.F. & JUNG, L. Isolation of quercetin's salts and studies of their physicochemical properties and antioxidant relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 12: 3627-3635, 2004.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R. & VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, 85: 231-237, 2004.

MIZUNO, M.; YAMADA, J.; TERAJ, H.; KOZUKUE, N.; LEE, Y.S. & TSUCHIDA, H. Differences in immunomodulating effects between wild and cultured *Panax ginseng*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 200(3): 1672-1678, 1994.

MUELLER, C.; SCHWENDER, J.; ZEIDLER, J. & LICHTENTHALER, H.K. Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis **Biochemical Society Transactions**, 28(part 6): 792-793, 2000.

MÜLLER, C.A. Valerianaceae. In: MARTIUS, K.F.P. (Org.) **Flora Brasiliensis**, 6(4):339-350, 1885.

MÜLLER, D.; PFEIL, T. & VON DEN DRIESCH, V. Treating depression comorbid with anxiety - results of an open, practice-oriented study with St John's wort WS (R) 5572 and valerian extract in high doses. **Phytomedicine**, 10(Suppl. 4): 25-30, 2003.

MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M. & BIAVATTI, M.W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37: 399-403, 2005.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.

MURCH, S.J.; LIU, C.; ROMERO, R. & SAXENA, P.K. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 73:63-68, 2003.

NAGATA, N.; SUZUKI, M.; YOSHIDA, S.; & MURANAKA, T. Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in Arabidopsis lacking the non-mevalonate pathway. **Planta**, 216: 345-350, 2002..

OKADA, K.; KAWAIDE, H.; KUZUYAMA T.; SETO, H.; CURTIS, I.S. & KAMIYA, Y. Antisense and chemical suppression of the nonmevalonate pathway affects ent-kaurene biosynthesis in Arabidopsis. **Planta**, 215: 339-344, 2002.

OKAMOTO, T. Safety of quercetin for clinical application (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, 16 (2): 275-278, 2005.

OWEN, R.W.; HAUBNER, R.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E.; SPIEGELHALDER, B. & BARTSCH, H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. **Food and Chemical Toxicology**, 41: 703-717, 2003.

OLIVA, I.; GONZALEZ-TRUJANO, M.E.; ARRIETA, J.; ENCISO-RODRIGUEZ, R. & NAVARRETE, A. Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. **Phytotherapy Research**, 18 (4) : 290-296, 2004.

PAGE, J.E.; HAUSE, G.; RASCHKE, M.; GAO, W.; SCHMIDT, J.; ZENK, M.H. & KUTCHAN, T.M. Functional analysis of the final steps of the 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) Pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. **Plant Physiology**, 134: 1401-1413, 2004.

PALADINI, A.C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C. & MEDINA, J.H. Flavonoids and the central nervous system: for forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 51(5):519-526, 1999.

PALAZON, J.; CUSIDO, R.M.; BONFILL, M.; MORALES, C. & PINOL, M.T. Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. **Journal of Biotechnology**, 101(2):157-1563, 2003.

PANDE, A. & SHUKLA, Y.N. Alkaloids from *Valeriana wallichii*. **Fitoerapia**, 66(5): 467-73, 1995.

PASQUALI, G.P.; PORTO, D.D. & FETT-NETO, A.G. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 101: 287-296, 2006.

PASTÍROVÁ, A.; REPCÁK, M. & ELIAŠOVÁ, A. Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. **Plant Science**, 167: 819-824, 2004.

PAVARINO, M.A. **Viabilidade de miniestaquia de raízes em cinco espécies de uso medicinal**. Brasília: Universidade de Brasília, 1995. 12p. (Mineogr.)

PENG, Z.F.; STRACK, D.; BAUMERT, A.; SUBRAMANIAM, R.; GOH, N.K.; CHIA, T. F.; TAN, S.N. & CHIA, L.S. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **Phytochemistry**, 62: 219-228, 2003.

PENG, J.Y.; DENG, X.J.; HUANG, J.H.; JIA, S.H.; MIAO, X.X. & HUANG, Y.P. Role of salicylic acid in tomato defense against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* hubner. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, 59(11-12): 856-862, 2004.

PHAOSIRI, C. & PROTEAU, P.J. Substrate analogs for the investigation of deoxyxylulose-5-phosphate reductoisomerase inhibition: synthesis and evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 14: 5309-5312, 2004.

PITTA-ALVAREZ, S.I.; SPOLLANSKY, T.C. & GIULIETTI, A.M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 252-258, 2000.

PLANT SCIENCE – The **Plant Science Magazine on Line**. Disponível em: <http://www.plantsci.cam.ac.uk/plantsci/teaching/univonly/cornah0102/Isoprenoids-2.ppt>. Acesso em: outubro/2002; julho/2006.

PLUSHNER, S. L. Valerian: *Valeriana officinalis*. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 57(4): 328-335, 2000

POYARES, D.R.; GUILLEMINAULT, C.; OHAYON, M.M. & TUFIK, S. Can valerian improve the sleep of insomniacs after benzodiazepine withdrawal? **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 26: 539-545, 2002.

PROTEAU, P.J. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. Mini-Review. **Bioorganic Chemistry**, 32: 483-493, 2004.

QUÍMICA E FARMACÊUTICA NIKKHO DO BRASIL LTDA. Marketing Folder In: **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 3(9): 362, 2002.

RAVEN, P.H. **The nature and value of biodiversity**. In: Global biodiversity strategy. World Resources and Conservation Union Institute. New York, 1992. p.1-5.

RAVID, T.; AVNER, R.; POLAK-CHARCON, S.; FAUST, J.R. & ROITELMAN, J. Impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase degradation in lovastatin-resistant cells. **Journal of Biological Chemistry**, 274(41): 29341-29351, 1999.

RE, E.B.; JONES, D. & LEARNED, R.M. Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in Arabidopsis. **The Plant Journal**, 7(5): 771-784, 1995.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; CAMPOS, N.; LOIS, L.M.; MALDONADO, C.; HOEFFLER, J.-F.; GROSDÉMANGE-BILLIARD, C.; ROHMER, M. & BORONAT, A. Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. **FEBS Letters** 473: 328-332, 2000.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; AHUMADA, I.; DIEZ-JUEZ, E.; SAURET-GÜETO, S.; LOIST, L.M.; GALLEGU, F.; CARRETERO-PAULET, L.; CAMPOS, N. & BORONAT, A.

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. **The Plant Journal**, 27(3): 213-222, 2001.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. & BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, 130: 1079-1089, 2002.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; FORÉS, O.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J.F.; GONZÁLEZ, V.; PHILLIPS, M.A.; FERRER, A. & BORONAT, A. Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during arabidopsis seedling development **The Plant Cell**, 16: 144-156, 2004a.

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. **Current Pharmaceutical Design**, 10(19): 2391-2400, 2004b.

ROHDICH, F.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; EISENREICH, W.; RICHTER, G.; SCHUHR, C.A.; HECHT, S.; ZENK, M.H. & BACHER, A. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2Cmethyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. **Proceeding National Academic Science**, 97(12): 6451-6456, 2000.

ROHDICH, F.; HECHT, S.; GÄRTNER, K.; ADAM, P.; KRIEGER, C.; AMSLINGER, S.; ARIGONI, D.; BACHER, A. & EISENREICH, W. Studies on the mevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. **Proceeding National Academic Science**, 99(3): 1158-1163, 2001a.

ROHDICH, F.; KIS, K.; BACHER, A. & EISENREICH, W. The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. **Current Opinion in Chemical Biology**, 5: 535-540, 2001b.

ROHDICH, F.; ZEPECK, F.; ADAM, P.; HECHT, S.; KAISER, J.; LAUPITZ, R.; GRÄWERT, T.; AMSLINGER, S.; EISENREICH, W.; BACHER, A. & ARIGONI, D. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. **Proceeding National Academic Science**, 100(4): 1568-1591, 2003.

ROHMER, M.; KNANI, M.; SIMONIN, P.; SUTTER, B. & SAHM, H. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochemistry Journal**, 295: 517-524, 1993.

ROHMER, M.; SEEMANN, M.; HORBACH, S.; BRINGER-MEYER, S. & SAHM, H. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. **Journal of American Chemistry Society**, 118: 2564-2566, 1996.

ROHMER, M.; GROSDÉMANGE-BILLIARD, C.; SEEMANN, M. & TRITSCH, D. Isoprenoid biosynthesis as a novel target for antibacterial and antiparasitic drugs. **Current Opinion in Investigation for Drugs**, 5(2): 154-62, 2004.

ROUT, G.R.; SAMANTARY, S. & DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, 18:91-120, 2000.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PASQUALE, A. de.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D. & BONINA, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, 199: 39-47, 2000.

SALLES, L.A. Estudo Fitoquímico e Estabelecimento de Cultura de Calos de *Valeriana glechomifolia Meyer*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 1999.

SALLES, L.A.; SILVA, A.L.; RECH, S.B.; ZANATTA, N. & von POSER, G.L. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. **Biochemical Systematics and Ecology**, 28(9): 907-910, 2000.

SALLES, L.A.; SILVA, A.L.; FETT-NETO, A.G.; von POSER, G.L. & RECH, S.B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates. **Plant Science**, 163: 165-168, 2002.

SAMPAIO, M.I.R.; CASTILHO, R.O. & KAPLAN, M.A.C. Valerianaceae: etnofarmacologia, farmacologia e química. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 74(3):54-59, 1993.

SAMUKAWA, K.; YAMASHITA, H.; MATSUDA, H. & KUBO, M. Simultaneous analysis of ginsenosides of various ginseng radix by HPLC. Resumo. **Yakugaku Zasshi**, 115(3): 241-249, 1995.

SANTOS, M.S.; FERRIRA, F., CUNHA, A.P. An aqueous extract of valerian influences the transport of GABA in synaptosomes. **Planta Medica**, 60(3): 278-279, 1994a.

SANTOS, M.S.; FERRIRA, F., FARAO, C. The amount of GABA present in aqueous extract of valerian is sufficient to account for $[H^+]$ GABA release in synaptosomes. **Planta Medica**, 60(5): 2475-2476, 1994b.

SASLOWSKY, D.E.; WAREK, U. & WINKEL, B.S.J. Nuclear localization of flavonoid enzymes in arabidopsis. **The Journal of Biological Chemistry**, 280(25): 23735-23740, (2005).

SCHIJLEN, E.G.W.M.; RIC DE VOS, C.H.; VAN TUNEN, A.J. & BOVY, A.G. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, 65: 2631-2648, 2004.

SEMA – Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://www.sema.gov.rs.br>. Acesso: Julho 2002 – Setembro 2006.

SHARKEY, T.D.; CHEN, X. & YEH, S. Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. **Plant Physiology**, 125: 2001-2006, 2001.

SHARKEY, T.D. & YEH, S. Isoprene emission from plants. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52: 407-436, 2001.

SHELDON, J.W.; BALIK, M.J. & LAIRD, S.A. **Medicinal Plants: can utilization and conservation coexist?** In: **Advances in economic botany**. New York Botanic Garden, New York, 1997. v.12. 104 p.

SHOHET, D.; WILLS, R.B.H.; STUART, D.L. Valepotriates and valerenic acids in commercial preparations of valerian available in Australia. **Pharmazie**, 56(11): 860-863, 2001.

SILVA, A.L. **Quantificação de valepotriatos em espécies de *Valeriana* e em cultura de calos e suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia***. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2001.

SILVA, A.L.; RECH, S.B. & VON POSER, G.L. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brasil. **Planta Medica**, 68: 570-572, 2002.

SIMMEN U. SALADIN C. KAUFMANN P. PODDAR M. WALLIMANN C & SCHAFFNER W. Preserved pharmacological activity of hepatocytes-treated extracts of valerian and St. John's wort. **Planta Medica**, 71 (7): 592-598, 2005.

SIRVENT, T. & GIBSON, D. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 60: 311-320, 2002

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R.; SIMONIC, M. & KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, 89: 191-198, 2005.

SPONSEL, V.M. The deoxyxylulose phosphate pathway for the biosynthesis of plastidic isoprenoids: early days in our understanding of the early stages of gibberellin biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(4): 332-345, 2001.

SOBRAL, M. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul: Valeraniaceae. *Boletim do Instituto de Biociências*, 58:1-61, 1999a.

SOBRAL, M. *Valeriana tajuvensis* (Valeraniaceae). A new species from southern Brazil. *Novon*, 9(1):114-117, 1999b.

SOBRAL, M. *Valeriana eupatoria* (Valeraniaceae). A new species from southern Brazil. *Novon*, 10(2):149-152, 1999c.

SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. **Biometry**. W. H. Freeman, San Francisco, 1981.

SOURET, F.D.F.; WEATHERS, P.J. & WOBBE, K.K. The mevalonate-independent pathway is expressed in transformed roots of *Artemisia annua* and regulated by light and culture age. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 38 (6): 581-588, 2002.

SPRENGER, G.A.; SCHÖRKEN, U.; WIEGERT, T.; GROLLE, S.; DE GRAAF, A.A.; TAYLOR, S.V.; BEGLEY, T.P.; BRINGER-MEYER, S. & SAHM, H. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-

xylulose-5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. **Proceeding National Academic Science USA**, 94: 12857-12862, 1997.

STASI, L.C.di (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. UNESP, São Paulo, 1996. 230p.

STEINBACHER, S.; KAISER, J.; EISENREICH, W.; HUBER, R.; BACHER, A. & ROHDICH, F. Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-c-methyl-d-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. **The Journal of Biological Chemistry**, 278(20): 18401-18407, 2003.

SUIRE, C.; BOUVIER, F.; BACKHAUS, R.A.; BÉGU, D.; BONNEU, M. & CAMARA, B. Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering a new role of oil bodies. **Plant Physiology**, 124: 971-978, 2000.

TAI, M.C.; TSANG, S.Y.; CHANG, L.Y.F. & XUE, H. Therapeutic potential of wogonin: a naturally occurring flavonoid. **Central Nervous System Drug Reviews**, 11 (2): 141-150, 2005.

TATTINI, M.; GUIDI, L.; MORASSI-BONZI, L.; PINELLI, P.; REMORINI, D.; DEGL'INNOCENTI, E.; GIORDANO, C.; MASSAI, R. & AGATI, G. On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. **New Phytologist**, 167: 457-470, 2005.

TEIXEIRA, S.; SIQUET, C.; ALVES, C.; BOAL, I.; MARQUES, M.P.; BORGES, F.; LIMA, J.L.F.C. & REIS, S. Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. **Free Radical Biology & Medicine**, 39: 1099-1108, 2005.

THIMMARAJU, R.; BHAGYALAKSHMI, N.; NARAYAN, M.S.; RAVISHANKAR G.A. Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress. **Process Biochemistry**, 38: 1069-1076, 2003.

TORRES, A.C. & CALDAS, L.S.(Eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. EMBRAPA/CNPH, Brasília, 1990. pp.39-40, 433p.

TORSELL, K. & WAHLBERG, K. Isolation, structure and synthesis of alkaloids from *Valeriana officinalis* L. **Acta Chimica Scandinavica**, 21(1): 53-62, 1967.

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

UMNOVA, N.V.; MICHURINA, T.L.; SMIRNOVA, N.I.; ALEKSANDROVA, I.V. & POROSHENKO, G.G. Study of antimutagenic properties of bio-ginseng in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Resumo. **Biulletin Eksperimental Biological Medicine**, 111(5): 507-509, 1991.

VIOLON, C.; DEKEGEL, D. & VERCRUYSSSE, A. Relation between valepotriate content and differentiation level in various tissues of Valeraneae. **Journal of Natural Products**, 47: 934-940, 1984.

VITALI, G.& VENTRONE, A. *In vitro* shoot regeneration of *Centranthus ruber* DC from hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes*, and determination of valepotriate content **Plant Biosystems**, 136(1): 109-114, 2002.

WAGNER, J.; WAGNER, M.L. & HENING, W.A. Beyond benzodiazepines: alternative pharmacologic agents for the treatment of insomnia. **Annual Pharmacotherapy**, 32(6): 680-691, 1998.

WALKER, J.R. & POULTER, C.D. Synthesis and evaluation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate analogues as chelation-based inhibitors of methylerythritol phosphate synthase. **Journal of Organic Chemistry**, 70: 9955-9959, 2005.

WALTER, M.H.; HANS, J. & STRACK, D. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. **The Plant Journal**, 31(3): 243-254, 2002.

WANG, J.W.; ZHENG, L.P.; WU, J.Y.; TAN, R.X. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. **Nitric Oxide**, 15: 351-358, 2006.

WANG, Y.-D.; YUAN, Y.-J.; LU, M.; WU, J.-C. & JIANG, J.-L. Inhibitor studies of isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of the yew *Taxus chinensis* var *mairei*. **Biotechnology Applied and Biochemistry**, 37: 39-43, 2003.

WANG, Y.-D.; YUAN., Y.-J. & WU, J.-C.. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. **Biochemical Engineering Journal**, 19: 259-265, 2004.

WANKE, M.; SKORUPINSKA-TUDEK, K. & SWIEZEWSKA, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-Cmethyl-D-erythritol-4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, 48(3): 663-672, 2001.

WASOWSKI, C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; MEDINA, J.H. & PALADINI, A.C. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA_A receptors, from *Valeriana wallichii* D.C. **Planta Medica**, 68: 934– 936, 2002.

WIESNER, J.; HENSCHKER, D.; HUTCHINSON, D.B.; BECK, E. & JOMAA, H. In vitro and in vivo synergy of fosmidomycin, a novel antimalarial drug, with clindamycin. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 46(9): 2889-2894, 2002.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (Ed). **Secondary Products from Plant Tissue Culture**. Clarendon Press, Oxford, Cap.2, p.23-41, 1990.

WU, J. & LIN, L. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59: 51-57, 2002.

WU, J. & LIN, L. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound. methyl jasmonate and in situ solvent extraction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 62: 151-155, 2003.

YANG, Z.; PARK, H.; LACY, G.H. & CRAMER, C.L. Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase genes by wounding and patogen challenge. **The Plant Cell**, 3: 397-405, 1991.

YOSHIOKA, T.; SHIMIZU, H. & OHRUIY, H. Synthesis of (3r,4s)-3,4,5-trihydroxy-4-methylpentylphosphonic acid as a potential inhibitor of the nonmevalonate pathway **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68(6): 1259-1264, 2004.

YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D. & SUFFREDINI, I.B. Selection, extration and identification of new anti-cancer drugs from Brazilian plants. **Acta Oncológica Brasileira**, 2, 2000.

YUAN, Y.J.; WEI, Z.J.; MIAO, Z.Q. & WU, J.C. Acting paths of elicitors on taxol biosynthesis pathway and their synergistic effect. **Biochemical Engineering Journal**, 10: 77-83, 2002.

YUAN, C.S.; MEHENDALE, S.; XIAO, Y.P.; AUNG, H.H.; XIE, J.T. & ANG-LEE, M.K. The gamma-aminobutyric acidergic effects of valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity. **Anesthesia and Analgesia**, 98(2): 353-358, 2004.

ZEIDLER, J.; SCHWENDER, J.; MUELLER, C. & LICHTENTHALER, H.K. The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. **Biochemical Society Transactions**, 28(part 6): 796-798, 2000.

ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H. In: BARZ, W., REINHARD, E., ZENK, M.H. (eds). **Plant tissue culture and its biotechnological application**. Springer-Verlag, Berlin, p.27, 1977.

ZHANG, C.-H.; WU J.-Y. & HE, G.-Y. Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 60:396-402, 2002.

ZHAO, J.; DAVIS, L.C. & VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, 23: 283-333, 2005.

ZHEN, R.G. & SINGH, B.K From inhibitors to target site genes and beyond-herbicide inhibitors as powerful tools for functional genomics. **Weed Science**, 49(2): 266-272, 2001.

ZIEGLER, G.; PLOCH, M.; MIETTINEN-BAUMANN, A. & COLLET, W. Efficacy and tolerability of valerian extract LI 156 compared with oxazepam in the treatment of non-organic insomnia - a randomized, double-blind, comparative clinical study. **European Journal of Medical Research** 7(11): 480-486, 2002