



# Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais

Produção de alcalóides e óleos essenciais

## Introdução

A conversão das plantas e de suas partes, cujo valor medicinal tenha sido confirmado pelas pesquisas, em fármacos para a população esbarra na dificuldade de se obter matéria-prima na quantidade e qualidade necessária para suprir a demanda requerida pelo mercado nacional e internacional. Porém, não se cogita fazer uma incursão na já tão devastada natureza, pois, além dos danos ecológicos que essas coletas poderiam provocar, sem deixar de mencionar que diversas plantas já se extinguíram e que várias outras se encontram ameaçadas de extinção, o controle qualitativo e quantitativo dos seus princípios ativos, seria muito difícil, uma vez que existem variações nos tipos e nos teores de substâncias ativas, devido à interação do genótipo com o meio ambiente. Desse modo, recomenda-se o cultivo de plantas medicinais.

Para se ter uma produção confiável de drogas terapêuticas como uma espécie recentemente adaptada às práticas de cultivo, faz-se necessário acompanhar esse cultivo; sendo que, se se tratar de plantas anuais, o tempo para o seu cultivo leva de 3 a 5 anos, enquanto que se tratar de plantas perenes, de 10 a 12 anos. Em geral, dos princípios ativos aos medicamentos são gastos cerca de 10 a 15 anos, com o custo entre 100 a 500 milhões de dólares na elucidação química, testes pré-clínicos e clínicos. Reconhecendo-se que uma planta produza 10g de massa seca e que nessas 10g se obtenha 0,3g da droga

isolada e que sejam necessários, para atender ao mercado, 30kg dessa substância, então será preciso 100.000 plantas só nesse primeiro momento, o que se torna extremamente dispendioso. Uma possível solução para esse problema é o fitomelhoramento, que pode ser clássico ou moderno.

O melhoramento genético de plantas medicinais, apesar de estar em sua fase embrionária, tem conseguido avanços; principalmente no que refere-se às plantas produtoras de alcalóides e óleos essenciais. Esses compostos são amplamente distribuídos no reino vegetal. As famílias Apocynaceae, Euphorbiaceae e Solanaceae destacam-se como produtoras de alcalóides; já as famílias Compositae, Lamiaceae e Umbelliferae apresentam-se como produtoras de óleos.

## Melhoramento Genético Clássico e Moderno

Os trabalhos que envolvem seleção de genótipos superiores, com subsequentes cruzamentos, com vistas a obter híbridos ou cultivares, são incipientes. Com relação a composição e conteúdo de moléculas terapêuticas, encontraram-se altas herdabilidades para essas substâncias, o que facilita o melhoramento por seleção. Por esse meio, têm, freqüentemente, sido desenvolvidas e produzidas em larga escala cultivares de *Achillea*, *Chamomilla*, *Lavandula*, *Melissa*, *Menthae* *Thymus*. Com vistas à produção qualitativa e quantitativa de princípios ativos tem-se conseguido êxito

### Cláudio Lúcio Fernandes Amaral

Doutor em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa. Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Líder do Grupo de Pesquisa Biotecnologia, Genética Vegetal e Melhoramento de Plantas. Membro do Instituto Baiano de Biotecnologia. Coordenador de Pesquisa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Coordenador da Área de Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. [geneticamaralclfuesb@bol.com.br](mailto:geneticamaralclfuesb@bol.com.br)

### Anderson Brito da Silva

Especialista em Genética pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Membro do Grupo de Pesquisa Biotecnologia, Genética Vegetal e Melhoramento de Plantas, Membro da Área de Genética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. [anderbs@uol.com.br](mailto:anderbs@uol.com.br)

Ilustrações cedidas pelos autores

com a seleção de clones superiores (ex.: *Artemisia annua* - Artemisia) ou com a introdução de novos acessos (ex.: *Chamomilla recutita* - Camomila), seguidos de seleção e hibridação (ex.: *Catharanthus roseus* x *Catharanthus trichophyllus*). Entretanto, com relação a diversificação estrutural e funcional dos fitofármacos, pode ser que os híbridos apresentem características inéditas às dos parentais (ex.: *Mentha aquatica* x *Mentha longifolia*).

A biotecnologia compõe-se basicamente das seguintes tecnologias: biologia molecular, engenharia genética, transformação genética e cultura de tecidos. A biologia molecular permite identificar, isolar e caracterizar o gene de interesse. A engenharia genética possibilita clivar, por meio de enzimas de restrição, seqüências nucleotídicas específicas de ácidos nucléicos pela geração de extremidades aderentes de fitas simples da molécula de DNA de uma espécie que se associam a fragmentos de DNA de outra espécie clivados por essas mesmas enzimas. O gene selecionado é inserido enzimaticamente em um plasmídeo em particular de uma bactéria específica e, subsequentemente, introduzido por transformação genética em uma célula vegetal. Entretanto, torna-se necessário regenerar a planta a partir da célula que foi geneticamente modificada, o que pode ser feito por cultura de tecidos. Assim, espera-se que o gene para o caráter almejado seja passado, através da reprodução sexuada e assexuada, dos parentais transformados para as progênes que expressarão também esse gene, significando que tal habilidade constitui valiosa contribuição para a obtenção rápida, segura e eficiente de fármacos.

### Cultura de Tecidos e Transformação Genética

Cultura de tecidos é um processo, por meio do qual fragmentos vegetais ou suas partes denominadas explantes são isolados dos organismos ou obtidos a partir destes, sendo asepticamente cultivados em meio de cultura apropriado sob condições adequadas. Esse termo é genérico, referindo-se a cultura de células, te-

cidos, órgãos, embriões e plântulas. Essas técnicas consistem em selecionar explantes, desinfestá-los e cultivá-los em meio nutritivo mantido sob condições assépticas, sendo a multiplicação dos propágulos feita através de sucessivos subcultivos em meio próprio. Os brotos desenvolvidos em um meio são transferidos a outro meio para formação das raízes, obtendo-se, assim, plantas inteiras. Essas são cultivadas no laboratório em substrato de aclimação e, conseqüentemente, levadas à casa de vegetação antes de serem transferidas para o campo definitivamente.

Entre as principais funções da técnica de cultura de tecidos cabe dar ênfase à produção de (a) clones (ex.: *Aloe vera* - Babosa), ou seja, material homogêneo e uniforme, em larga escala, de rápida propagação, livre de patógenos, vigoroso e produtivo; (b) híbridos, por hibridação somática, através de fusão de protoplastos (ex.: *Nicotiana tabacum* - Tabaco); (c) haplóides (ex.: *Hyoscyamus niger* - Meimandro negro); (d) mutantes portadores de caracteres desejáveis, por meio do uso de agentes mutagênicos ou por variação somaclonal (ex.: *Datura innoxia* - Datura); (e) plantas-biorreatoras (ex.: *Atropa belladonna* - Beladona); (f) plantas geradoras de vacinas (ex.: *Solanum tuberosum* - Batata); bem como (g) conservação de germoplasma vegetal por criopreservação ou por manutenção do material vegetal, durante períodos prolongados, sob condições limitantes de crescimento e desenvolvimento (ex.: *Hyoscyamus muticulus* - Hiosciamus) e, finalmente, (h) biotransformação de compostos pouco interessantes em compostos muito interessantes sob o aspecto econômico [ex.: *Digitalis lanata* (Digitalis) e *Digitalis purpurea* (Dedaleira)].

A cultura de tecidos permite interferir nas rotas metabólicas vegetais mediante o cultivo de plantas em meio preparado com agentes estressantes, elicitores e mutagênicos, que afetam qualitativa e quantitativamente os princípios ativos produzidos, e altera a composição e/ou o teor, como foi observado em *Atropa belladonna* (Beladona), *Catharanthus roseus* (Vinca) e *Digitalis lanata* (Digitalis) ou

### Quadro 1 - Substâncias derivadas de cultura de células vegetais

Produtos Industriais
Óleos
Perfumes
Aromatizantes
Pigmentos
Antioxidantes
Fármacos
Gomas
Inseticidas
Vitaminas

Fonte: Amaral (1999)

### Quadro 2 - Compostos farmacológicos produzidos normalmente pelas plantas

Substâncias	Famílias
Alcalóides	Apocinaceae, Solanaceae
Flavonóides	Rutaceae
Glicosídeos Cardiotônicos	Scrophulariaceae
Taninos	Lauraceae
Terpenóides	Asteraceae, Lamiaceae

Fonte: Amaral (1999)

### Quadro 3 - Compostos farmacológicos não produzidos normalmente pelas plantas

Substâncias	Espécies
Voafrina	<i>Catharanthus roseus</i>
Picracina	<i>Picralimia nitida</i>
Rutacultina	<i>Ruta graveolens</i>
Tarenosídeo	<i>Gardenia jasminoides</i>
Epicrosina	<i>Ochrosia elliptica</i>

Fonte: Amaral (1999)

*Rosmarinus officinalis* (Alecrim), *Ruta graveolens* (Arruda).

A cultura de células vegetais constitui uma fonte potencial de síntese de moléculas altamente valiosas às indústrias de alimentos, cosméticos, fármacos e têxteis, as quais têm utilizado as plantas como matéria-prima básica para seus produtos (Quadro 1).

Em cultura de células, podem-se produzir metabólitos especiais com propriedades terapêuticas (Quadro 2).

Além disso, verificou-se que substâncias que não são, usualmente, encontradas em plantas foram identifi-

cadadas, isoladas e caracterizadas nesse tipo de cultura *in vitro*. Soma-se a isso o fato de que foram obtidos, em cultura de células, compostos inteiramente novos (Quadro 3).

Além de sintetizarem e acumularem metabólitos secundários de significância comercial, as células vegetais podem ser usadas devido a apresentarem capacidade de realizar certas alterações estruturais nesses compostos. A biotransformação envolve processos bioquímicos de epoxidação, esterificação, glicosilação, hidroxilação, isomerização, oxidação, redução, saponificação, etc (Quadro 4).

Em geral, a produtividade de compostos fitoterapêuticos é menor em cultura de células se comparada a de tecidos sintetizadores nas plantas, o que provavelmente pode ser explicado pela perda da diferenciação de tecidos e de órgãos das culturas de suspensão de células e de calos em meio líquido. Acredita-se que isso seja devido à distribuição insuficiente de enzimas necessárias para a síntese e ao acúmulo de metabólitos secundários ou, simplesmente, seria reflexo do estado de não totipotência das células desenvolvidas em tais culturas. Desse modo, os calos em fase de diferenciação de raízes de *Atropa belladonna* são capazes de produzir atropina, enquanto os calos não diferenciados não produzem. Por outro lado, plantas inteiras de *Coptis japonica* produzem 5% de berberina em 5 ou 6 anos de cultivo, enquanto suspensão celular de linhagens não-selecionadas e selecionadas produzem, respectivamente, 5% e 13% dessa substância em apenas 3 semanas, o que reflete em produção rápida e econômica. Esse é um entre vários outros exemplos (Quadro 5).

A cultura de células mostra-se bastante promissora para a produção de princípios ativos, apresentando, porém, alguns inconvenientes que limitam seu uso, pois há compostos fármaco-ativos que só são produzidos em plantas intactas ou em tecidos e órgãos, mas não em células isoladas. Tem-se, como exemplo, vimblastina e vincristina, obtidos de *Catharanthus roseus*. Nesse caso, pode-se induzir, a partir das células em cultura, a organogênese ou a

**Quadro 4 - Cultura de células de plantas comercialmente viáveis pela biotransformação**

Espécies	Reações	Substratos	Produtos
<i>Cannabis sativa</i>	Oxidação	Geraniol	Nerol
<i>Datura spp.</i>	Esterificação	Tropina	Acetiltropina
<i>Digitalis spp.</i>	Hidroxilação	Digitoxina	Digoxina
<i>Digitalis spp.</i>	Glicosilação	Gitoxigenina	Gitoxina
<i>Mentha spp.</i>	Redução	Mentona	Neomentona
<i>Ruta graveolens</i>	Epoxidação	Hidroxicumarinas	Furanocumarinas

Fonte: Amaral (1999)

embriogênese somática de forma que a capacidade biosintética do vegetal seja restaurada.

A produção em larga escala de metabólitos secundários em cultura de células depende de algumas estratégias que tenham chance de se viabilizarem economicamente, e, entre elas, estão:

- Melhorar a estabilidade e a viabilidade da linhagem celular, selecionando plantas com alta produtividade;
- Selecionar meio de cultura mais adequado para o máximo crescimento;
- Minimizar a contaminação microbial;
- Identificar rotas bioquímicas que levem as células da planta à produção dos metabólitos desejáveis;
- Estabelecer métodos para aumentar a produção de metabólitos secundários;
- Determinar meios para aumentar a excreção de metabólitos secundários;
- Estudar os mecanismos regulatórios associados;
- Obtenção de produtos das células em suspensão, via excreção natural ou induzida;

- Otimização da produção média;
- Obtenção de extratos das células organizadas quando elas mesmas forem utilizadas.

Diante do exposto, sugere-se um esquema básico que permita produzir princípios ativos por meio de cultura de células, para contornar alguns problemas peculiares a esse sistema de produção, o qual, em suma, segue os seguintes passos: seleção do material vegetal, introdução "in vitro" de plantas altamente produtivas, indução de calos com separação de linhas celulares estáveis, otimização das condições de cultivo, re-seleção de linhas celulares superiores, cultura em massa em biorreatores, isolamento e purificação dos metabólitos desejáveis e, finalmente, comercialização (Figura 1).

A produção de metabólitos especiais com propriedades fitoterápicas em cultura de células diferenciadas (tecidos e órgãos) é mais previsível do que em células indiferenciadas (células em suspensão e calos). A diferenciação associa-se, usualmente, a uma melhor produção qualitativa e quantitativa. O teor e a composição de fitofármacos em órgãos, tais como raízes, são comparáveis àqueles das plantas intactas. Generalizando-se, tem-

**Quadro 5 - Comparação da produção de compostos bioativos in vivo e in vitro**

Espécies	Substâncias	Produção in vivo (%)	Produção in vitro (%)
<i>Talictum minus</i>	Berberina	0,80	1,00
<i>Galium aparine</i>	Antraquinona	0,43	20,00
<i>Morinda citrifolia</i>	Antraquinona	2,50	8,00
<i>Coleus blumei</i>	Ácido Rosmarínico	3,60	5,00
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Xiconina	2,75	14,00
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Vomileina	0,06	51,00

Fonte: Amaral (1999)

se que raízes não transformadas apresentam crescimento lento, desenvolvimento retardado e menor produtividade de fitoterápicos, ao passo que raízes transformadas possuem crescimento rápido, desenvolvimento acelerado e maior produtividade de fitoterápicos (Quadro 6). As raízes não-transgênicas, ao contrário das transgênicas, necessitam ser cultivadas em meio preparado com substâncias reguladoras de crescimento. Cabe enfatizar que o uso de raízes, transformadas ou não, é limitado àqueles biofármacos sintetizados somente em raízes. Entretanto, plantas inteiras podem ser regeneradas a partir dessas raízes.

A tecnologia transgênica oferece enormes oportunidades para o melhoramento de plantas. Para manipular o metabolismo produtor de princípios ativos nas plantas, têm sido feitos muitos esforços. Não é fácil controlar a produção dessas substâncias, até mesmo por meio de métodos moleculares sofisticados; devido a esses compostos serem sintetizados em diversos passos enzimáticos que ocorrem em vários tipos celulares.

A manipulação desse metabolismo pode-se dar por estímulo anabólico por meio da inclusão de rotas metabólicas feita pela tecnologia super-expressora, ou por desestímulo catabólico por meio da exclusão de vias feita pela tecnologia supressora-senso ou supressora anti-senso. Um dos pré-requisitos para o sucesso da manipulação genética é identificar, isolar e caracterizar os genes envolvidos na biossíntese de princípios ativos e o outro pré-requisito é compreender os mecanismos de regulação espaço-temporal desses genes em fases distintas de crescimento e desenvolvimento vegetal. Concomitantemente, faz-se necessário desenvolver protocolo de regeneração e de transformação. Embora, isso nem sempre seja possível, algum progresso tem sido, recentemente, alcançado. Esse avanço envolve duas categorias: cultura de órgãos transformados e plantas transgênicas.

Em cultura de células, suspensões celulares podem passar por crescimento em larga escala em biorreatores, usando-se, para tal fim, linhas

celulares superiores, isto é, estáveis e com alta produção em detrimento de linhas celulares inferiores, ou seja, instáveis e com baixa produção. Esse tipo de cultura pode ser manipulado suplementando-se o seu meio com elicitores, tais como: preparações fúngicas; o que é exemplificado por *Tagetes patula*, cuja cultura de células produziu, ao ser submetida a extratos de *Phytophthora sp.*, níveis significativos de polienos. Contudo, em cultura de células, instabilidade e baixa produtividade é regra e estabilidade e alta produtividade é exceção. Além disto, verificou-se, nesse tipo de cultura, compostos que não são, usualmente, encontrados em plantas, como os tarenosídeos em *Gardenia jasminoides*.

Há substâncias terapêuticas que não são produzidas em cultura de células, mas só em órgãos e em cultura destes, ou em plantas inteiras, a exemplo dos alcalóides vimblastina e vincristina, encontrados em *Catharanthus roseus*.

A cultura de órgãos não transformados apresenta produção estável e média, com crescimento lento, menor ramificação lateral e meio acrescido com reguladores de crescimento; ao passo que a cultura de órgãos transformados possui produção estável e alta, com crescimento rápido, maior ramificação lateral e meio não acrescido com reguladores de crescimento.

Figura 1 - Esquema básico de produção de princípios ativos em cultura de células



Brotos tumorados como os de *Mentha citrata* são menos usados que as raízes em cabeleira como as de *Scopolia japonica*, pois é mais fácil estabelecer raízes do que brotos em cultura em meio líquido. A cultura de órgãos não é manipulada como a cultura de células, ao se alterarem as condições do meio. Entretanto, a adição de quitosana elevou a produção de hiosciamina em *Hyoscyamus multicus*.

Cabe enfatizar que, em se tratando de viabilidade comercial da produção de princípios ativos, deve-se considerar não apenas a produtividade, mas também a liberação dos princípios ativos no meio de cultivo, no sentido de se colherem os compostos fitoterápicos sem danificar ou destruir o material biológico que os produz. Em *Duboisia leichhardtii*, 75% de escopolamina é liberado no meio em 4 semanas. Todavia, há produtos, como os fitocomplexos,

Quadro 6 - Produção excedente de metabólitos secundários em cultura de raízes transformadas comparada com a de raízes não-transformadas

Espécies	Metabólitos	Conteúdo
<i>Atropa belladonna</i>	Escopolamina	0,37%
	Hiosciamina	0,95%
<i>Datura stramonium</i>	Escopolamina	0,56%
	Hiosciamina	0,30%
<i>Scopolia japonica</i>	Escopolamina	0,50%
	Hiosciamina	1,30%

Fonte: Amaral (1999)

que não são obtidos em órgãos, porém só em plantas intactas.

Estudos que envolvam plantas transgênicas regeneradas a partir de órgãos transformados são escassos. Em plantas medicinais transformadas por *Agrobacterium* spp. tem-se, preferencialmente, usado a *Agrobacterium rhizogenes* para transformar aquelas cujos princípios ativos se encontram em suas partes subterrâneas, como a hiosciamina nas raízes de *Ajuga reptans* e a *Agrobacterium tumefaciens* para transformar aquelas cujos princípios ativos se encontram em suas partes aéreas, como a artemisinina nas folhas de *Artemisia annua*. Entretanto, essa condição não constitui uma regra, o que significa que esses sistemas podem ser usados independentemente do local de síntese dos compostos farmacológicos nos vegetais, o que tem sido verificado em *Catharanthus roseus*. No que tange aos princípios ativos, a transformação pode levar à produção acentuada ou atenuada.

Em plantas medicinais, há exemplos de ganhos obtidos pela tecnologia transgênica, quais sejam: no que se refere a plantas produtoras de alcalóides, tem-se em *Atropa belladonna* a conversão de hiosciamina, pela enzima hiosciamina 6 $\beta$  hidroxilase, cujo gene é oriundo de *Hyoscyamus niger*, em escopolamina. Já no tocante às plantas produtoras de isoprenóides, tem-se em *Mentha spicata* a conversão de limoneno, pela enzima limoneno 3 hidroxilase, cujo gene é oriundo de *Mentha piperita*, em Mentol.

Há, também, exemplos de perdas obtidas pela tecnologia transgênica, as quais se tem, no que diz respeito às plantas produtoras de isoprenóides, a redução dos teores de glicirizina, tanto em *Glycyrrhiza glabra* quanto em *Glycyrrhiza uralensis*.

Atualmente, vem-se tentando transformar outros caracteres de plantas medicinais que não a produtividade, como é o caso da resistência. Transferiu-se para *Atropa belladonna* o gene *bar*, que codifica para enzima fosfinotricina acetil transferase, a qual confere resistência ao herbicida fosfinotricina. O problema é que, ao invés de uma correlação positiva, obteve-se uma correlação negativa entre a

produtividade e a resistência; resultando em plantas resistentes com menos princípios ativos e em plantas suscetíveis, com mais princípios ativos.

## Conclusões

As possibilidades de obterem-se novas moléculas terapêuticas destinadas à produção de fármacos tornam a biotecnologia imprescindível ao desenvolvimento técnico-científico dos programas de melhoramento genético do país, e tem como consequência a melhoria na qualidade de vida, principalmente na área da saúde da população brasileira. Portanto, diversos avanços foram alcançados e vários desafios têm sido subjulgados; mas, decerto, há ainda bastante para se fazer em se tratando de biotecnologia no melhoramento de medicinais.

## Referências Bibliográficas

- AMARAL, C. L. F.; OLIVEIRA, J. E. Z.; CASALI, V. W. D. **Plantas Medicinais e Aromáticas: Avanços no Melhoramento Genético**. Viçosa - MG.: Editora/Departamento de Fitotecnia - UFV., 2001.v.1.155p.
- AMARAL, C. L. F.; OLIVEIRA, J. E. Z.; CASALI, V. W. D. **Plantas Medicinais e Aromáticas: Melhoramento Genético**. Viçosa - MG.: Editora/Departamento de Fitotecnia - UFV., 1999.v.1.153p.
- CALDENTEY, K.M.O., HILTUNEN, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. **Fields Crops Research**, v.45, p.57-69, 1996.
- DERISI, J.L., IYER, V.R., BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, v.278, p.680-686, 1997.
- LEWINSOHN, E. Molecular biology for the improvement of medical and aromatic plants. **Acta Horticulturae**, v.426, p.443-463, 1996.
- LOWE, K.C. DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant tissue culture: past, present and future. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, n.4, p.175-186, 1996.
- PAULS, K.P. Plant biotechnology for crop improvement. **Biotechnology Advances**, v.13, n.4, p.673-693, 1995.
- REES, T.A. Prospects of manipulating plant metabolism. **Trends in Biotechnology**, v.13, p.375-378, 1995.
- SAITO, K., YAMAZAKI, M., MURAKOSHI, I. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. **Journal of Natural Products**, v.55, p.149-162, 1992.
- SIEMENS, J., SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of the art. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, n.2, p.66-75, 1996.
- SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspective from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.1-15, 1996.
- SPRAGUE, G.F., ALEXANDER, D.E., DUDLEY, J.W. Plant breeding and genetic engineering: a perspective. **BioScience**, v.30, p.17-21, 1980.
- STABA, E.J. Milestone in plant tissue culture systems for the production of secondary products. **Journal of Natural Products**, v.48, p.203-209, 1985.
- STEPHANOPOULOS, G.; VALLINO, J.J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. **Science**, v.252, p.1675-1681, 1991.
- VENCOVSKY, R. Melhoramento genético em vegetais. **Ciência e Cultura**, v.38, n.7, p.1155-1160, 1986.
- VERPOORT, R. Metabolic engineering as a strategy to improve the production of secondary metabolites in plants or plant cell cultures. **Acta Horticulturae**, v.457, p.403-409, 1998.
- WETTSTEIN, D. von. Genetic engineering in the adaptation of plants to evolving human needs. **Experientia**, v.39, p.687-713, 1983.
- WOOLHOUSE, H.W. New plants and old problems. **Annals of Botany**, v.60, n.4, p.189-198, 1987. (Suppl.).
- YEOMAN, M.M. Bypassing the plant. **Annals of Botany**, v.60, n.4, p.157-174, 1987. (Suppl.).