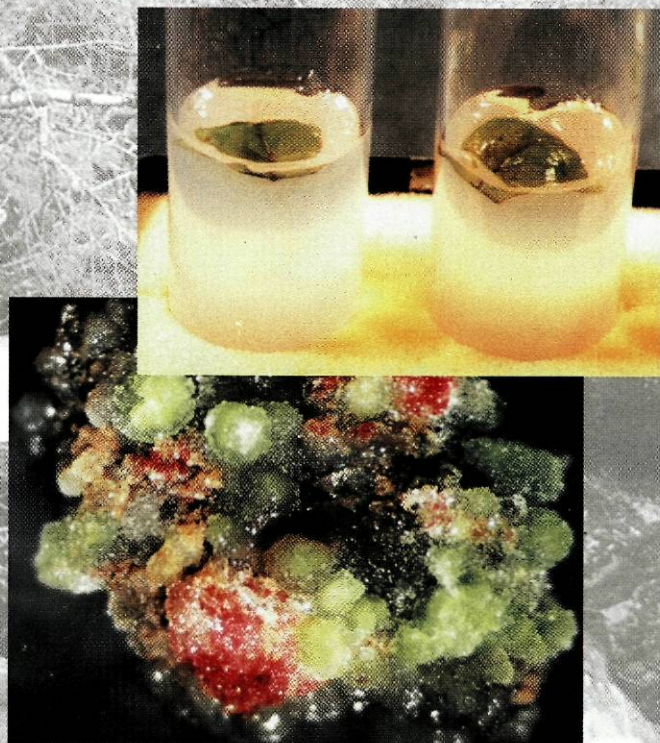


HERCÍLIA OFÉLIA CARDOSO OLIVEIRA MENDES MARQUES



# PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA PLANTA MEDICINAL *HYPERICUM ANDROSAEMUM* L.



Departamento de Botânica  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DO PORTO  
Porto, 2002

HERCILIA OFÉLIA CARDOSO OLIVEIRA MENDES MARQUES

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DA PLANTA MEDICINAL  
*Hypericum Androsaemum* L.

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção  
do grau de Mestre em Biologia de Desenvolvimento e Reprodução Vegetal



Orientador: Professora Doutora Arlete Santos, Faculdade de Ciências,  
Universidade do Porto

PORTO  
2002

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível devido à disponibilidade determinante de todas as pessoas que comigo colaboraram.

Um muito obrigado profundamente reconhecido!

No entanto, não posso deixar de fazer alguns agradecimentos em particular e que passo a citar:

Ao Senhor Professor Doutor Roberto Salema, um agradecimento muito especial não só pelo seu valor a nível científico, objectivo e intelectual, mas também pela sua simpatia e pelo seu apoio moral de que tanto precisei durante algumas fases deste trabalho;

À Senhora Professora Doutora Isabel Santos, um agradecimento também muito especial pela amabilidade, disponibilidade e apoio, pelas suas cedências, pela transmissão da sua energia;

À Professora Doutora Arlete Santos pela sua paciência, preocupação, apoio e disponibilidade constante ao longo deste ano de trabalho um agradecimento também especial;

À professora Doutora Fernanda Fidalgo pela sua ajuda, disponibilidade e simpatia;

A todos os Professores deste mestrado;

A todos os que trabalham no Instituto de Biologia Celular e Molecular, unidade de Stress em Plantas, com um agradecimento particular à Senhora D. Andréa Costa pelo apoio no processamento fotográfico e pela sua boa disposição, e à Senhora D. Isabel Guimarães pelo seu apoio e colaboração laboratorial e pela disponibilidade constante na resolução de problemas; e, ainda, ao Doutor Mestre Júlio pelo apoio informático.

À minha amiga Rosário um agradecimento especial;

Às pessoas amigas que se disponibilizaram quando solicitadas e das quais destaco, Carla, Marília e D. Arlete;

À minha família, marido e filhos, uma gratidão especial pela paciência, compreensão, apoio e colaboração.

A todos que não mencionei, mas que de algum modo comigo colaboraram, um muito obrigada.

Aos  
meus filhos,  
João e Joana.

# INDÍCE

	Página
<b>RESUMO</b>	1
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	3
<b>1. PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i></b>	7
1.1. Requisitos da micropropagação	7
1.1.1. Escolha do explante	7
1.1.2. Meio de cultura	9
1.1.3. Esterilização e desinfecção	12
1.1.4. O ambiente de cultura	13
1.2. Principais fases da micropropagação	14
1.3. Métodos de propagação vegetativa <i>in vitro</i>	17
<b>2. PLANTAS MEDICINAIS</b>	20
2.1. A cura e sinergia das plantas	21
<b>3. CARACTERIZAÇÃO GERAL DO GÉNERO <i>HYPERICUM</i></b>	24
3.1. Sistemática	24
3.2. Caracteres morfológicos	26
3.3. Distribuição geográfica e ecologia do <i>Hypericum androsaemum</i> L.	29
3.4. Constituintes químicos do género <i>Hypericum</i>	30
<b>4. PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>HYPERICUM</i> SP</b>	38
<b>5. OBJECTIVOS</b>	43
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
<b>1. Material vegetal</b>	46
<b>2. Procedimento experimental para a propagação <i>in vitro</i> da espécie <i>H. androsaemum</i> L.</b>	47
2.1. Selecção dos explantes	47
2.1.1. Obtenção e desinfecção de explantes a partir de sementes germinadas <i>ex vitro</i>	47

2.1.2. Obtenção e desinfecção de explantes a partir de sementes germinadas <i>in vitro</i>	48
2.2. Iniciação e manutenção das culturas	48
2.2.1. Excisão e isolamento dos explantes	48
2.2.2. Composição dos meios de cultura	50
2.3. Método para iniciação das culturas	53
2.4. Condições de subcultura de Tecido Caloso	53
<b>3. Condições de cultura para indução de gomos axilares em segmentos nodais</b>	54
3.1. Desenvolvimento dos rebentos axilares e seu enraizamento	55
3.2. Aclimatização	55
<b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	58
<b>Propagação <i>in vitro</i> de <i>Hypericum androsaemum</i> L.</b>	59
<b>1. Cultura <i>in vitro</i> de fragmentos de folha e caule</b>	63
1.1. Indução e proliferação de tecido caloso	63
<b>2. Cultura <i>in vitro</i> de segmentos de caule com nódulos</b>	85
2.1. Proliferação de rebentos axilares	85
2.2. Enraizamento de rebentos caulinares de <i>Hypericum androsaemum</i>	91
2.3. Transplante e aclimatização	94
<b>CONCLUSÃO</b>	97
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	100

## LISTA DE ABREVIATURAS

L-AA – ácido ascórbico  
ABA – Ácido abscísico  
AO – oxidase ascorbato  
BA – 6-Benziladenina  
BPA – benzil-9-(2-tetrahidropiranyl) adenina  
B5 – Meio de Gamborg  
CM – Meio Côrte e Mendonça  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ERO – Espécies reactivas de oxigénio  
FeEDTA – Tetracetato de etilendiaminaferro  
GA<sub>3</sub> – Ácido giberélico 3  
HIV – Vírus da imuno deficiência humana  
IAA – Ácido – 3 – indol acético  
IBA – Ácido 3-Indolbutírico  
IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular  
2iP – N<sup>6</sup>(2-isopentenil)adenina  
KIN – Cinetina  
KOH – Hidróxido de potássio  
LM – meio Lloyd e McCown (1980)  
LS – Linsmaier e Skoog  
μM – Micromolar  
MAO – enzima monoamino oxidase-A  
MS – Meio Murashige e Skoog (1962)  
MS/B5 - Meio de Murashige e Skoog (1962) e vitaminas B5 de Gamborg (1968)  
MSO – Meio de Murashige e Skoog (1962) e vitaminas B5 de Gamborg (1968)  
NAA – Ácido 1-Naftalenoacético  
O<sub>2</sub> – Oxigénio molecular  
PNPG – Parque Nacional Peneda Gêres  
PVP – Polivinilpirrolidona  
RB – Meio Roest e Bockelmann (1973)  
rpm – rotações por minuto  
SIDA – Síndrome da imuno deficiência  
TDZ – fenil-3-(1-,2,3-tiadiazol-5-yl)  
TEN – Teste de esforço em natação  
ureia

## RESUMO

*Hypericum androsaemum* é uma planta medicinal, nativa de Portugal, em via de extinção. Esta planta apresenta propriedades farmacológicas e a sua utilização como planta medicinal deve-se aos compostos com princípios activos, provenientes do metabolismo secundário, principalmente as xantonas. É vulgarmente usada em doenças do foro hepático e renal e é conhecida pelo nome de androsemo ou hipericão do Gerês.

A micropropagação é um método de propagação vegetativa que permite aumentar significativamente a taxa de multiplicação clonal das plantas, em larga escala e em condições controladas. Geneticamente a variação somaclonal é nula. As plantas mostram o mesmo vigor de crescimento, possibilitando a extracção de metabolitos secundários com interesse medicinal, segundo normas de standartização. É uma alternativa aos métodos tradicionais de propagação, cujo aumento clonal das plantas se torna demasiadamente lento, na propagação de cultivares. Nestes cultivares a variação somaclonal é devida a factores que não estão sob controlo. A micropropagação é igualmente utilizada em viveiros comerciais, onde se pretende minimizar o espaço de crescimento geralmente usado para manter o stock das plantas. Este método também é particularmente útil quando usado em conjugação com programas de reprodução vegetal na melhoria genética e aumento rápido de cultivares.

Espécies do género *Hypericum* foram usadas em culturas *in vitro* com o objectivo principal de produzir tecido caloso e culturas em suspensão. Posteriormente, estas culturas serviram para o isolamento e análise química de metabolitos secundários. No entanto, foram já utilizadas algumas espécies deste género com o objectivo principal de micropropagação. Presentemente e relativamente a *Hypericum androsaemum* só são conhecidos métodos de produção de tecido caloso. Assim, o objectivo principal deste trabalho foi estabelecer um método eficiente de propagação *in vitro*. Uma das vantagens deste método é obter plantas em larga escala e, relativamente às plantas medicinais, possibilitar a extracção de produtos secundários.

Na regeneração de *H. androsaemum* os explantes utilizados foram segmentos de caule e de folha ou fragmentos de caule com nódulos individualizados e sem folhas.

O meio de cultura utilizado foi o meio base MS/B5, suplementado com diferentes tipos de reguladores de crescimento em diferentes concentrações. Quando se utilizaram fragmentos de caule ou folha verificou-se na quase totalidade dos meios ensaiados apenas a proliferação de tecido caloso, em maior ou menor quantidade. A regeneração de plantas não foi conseguida embora o tecido caloso tivesse sido transferido para meio fresco MS/B5 com diferentes composições relativamente aos reguladores de crescimento. Apenas foi possível a obtenção de rebentos em dois dos meios testados a partir do tecido caloso, mas com pouco sucesso. Um desses meios foi suplementado com NAA (0,1 mg/L) e BA(1,0 mg/L) e outro meio foi suplementado com 2,4-D (0,1 mg/L) e BA (1,0 mg/L). No entanto, não foi possível continuar o processo da regeneração uma vez que os rebentos acabaram por necrosar.

A proliferação de rebentos axilares, a partir de segmentos de caule com nódulos simples e sem folhas, foi obtida no meio base MS/B5, suplementado só com o regulador de crescimento BA, em diferentes concentrações (1,0, 0,5, 0,2 e 0,1 mg/L). Este regulador de crescimento, independentemente da concentração utilizada, mostrou ser eficiente, quer na indução, quer na multiplicação de rebentos. O enraizamento das estruturas caulinares foi obtido no mesmo meio base, suplementado com IBA a 0,2 mg/L. A aclimatização foi conseguida em câmara de crescimento e na estufa *ex vitro*. As plântulas que mostraram vigor foram colocadas em vasos que continham uma mistura de terra e de turfa. O seu ciclo de crescimento ficou completo no exterior, *ex vitro*, onde se verificou a floração e amadurecimento do fruto.

Com a realização deste trabalho foi possível definir a composição e as condições do meio de cultura na proliferação de múltiplos rebentos axilares. O método de multiplicação *in vitro* de *Hypericum androsaemum* mostrou-se eficiente e rápido na obtenção em larga escala desta planta medicinal.

# INTRODUÇÃO

---

## I. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos que o estudo de diversas espécies vegetais, pelos motivos mais variados, tem suscitado a curiosidade e o interesse por parte do Homem. No entanto, nos últimos anos o interesse pelas plantas, nomeadamente as medicinais, tem vindo a aumentar significativamente na tentativa de encontrar soluções para problemas de saúde. Surge, assim, uma observação mais atenta de um número alargado de variedades e espécies vegetais a par dos avanços tecnológicos e científicos.

A constante competição entre empresas, quer na área industrial, quer na área comercial levou a que aumentasse o interesse no desenvolvimento de técnicas de cultura *in vitro* na tentativa de dar resposta aos desafios cada vez maiores com que as empresas são confrontadas. Estas culturas *in vitro* de tecidos, órgãos e embriões passaram a ser largamente usadas em estudos laboratoriais (Dixon, 1985) de modo a obter soluções em face de problemas levantados pelas empresas.

Cultura de tecidos é um termo usado para indicar o método da cultura asséptica *in vitro* de uma ampla variedade de fragmentos excisados da planta. As áreas abrangidas pelo método da cultura *in vitro* estão todas incluídas no termo biotecnologia (Hartmann et al., 1990).

O termo micropropagação é usado especificamente para referir a aplicação da técnica da cultura de tecidos *na propagação de plantas, a partir de pequenos fragmentos da planta, crescendo asépticamente num tubo de ensaio ou em qualquer outro recipiente* (Hartmann et al., 1990).

A cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência segundo o qual qualquer célula viva vegetal tem potencial genético para reproduzir um organismo completo. Este princípio foi atribuído a Haberlandt que o mencionou pela primeira vez em 1902, prognosticando que os tecidos, células e órgãos, poderiam ser mantidos indefinidamente, em cultura (Vasil e Hildebrandt, 1965; Murashige, 1974; Gautheret, 1985). Contudo, este facto só foi conseguido, em 1934, quando White foi capaz de fazer crescer continuamente, *in vitro*, raízes de tomateiro suplementadas com extracto de levedura (Hartmann et al., 1990). Embora Haberlandt seja considerado um dos pioneiros das culturas de células vegetais *in vitro* e tivesse utilizado meios

nutritivos que permitiam a sobrevivência de vários tipos de células, durante algumas semanas, nunca conseguiu induzir divisões celulares. Conforme citação em Gautheret (1985), só a partir da década de 30, White, Nobécourt e Gautheret, entre outros, conseguiram realizar cultura de tecidos vegetais e proceder à sua manutenção *in vitro*. O controlo dos processos de desenvolvimento das plantas foi designado como competência e determinação (Sussex, 1983; Durzan, 1988; Durzan e Gupta, 1988). Competência é o termo usado para descrever o potencial endógeno da célula ou tecido para desenvolver de um modo particular uma espécie de programa interno celular ou “memória” (Durzan, 1988). Determinação leva a uma diferenciação numa direcção irreversível durante o desenvolvimento de uma dada célula, tecido ou órgão, em presença de um sinal ambiental ou hormonal. Em propagação, competência e determinação ditam se a célula ou o tecido irá sofrer embriogénese ou organogénese e se irá ser iniciada a formação de raízes, rebentos ou flores (Hartmann et al., 1990). O método da cultura *in vitro* começou a ser aplicado na micropropagação por Ball (1946), apelidado pai deste método. A sua aplicação na propagação em larga escala iniciou-se no fim de 1960. Em 1970, a cultura *in vitro* foi alargada à investigação laboratorial, nos Estados Unidos e na Europa (Boxus et al., 1977). Este tipo de cultura, em 1980, sofreu uma expansão significativa. O interesse geral no uso de culturas de tecidos *in vitro*, na propagação das plantas, foi atribuído ao seu sucesso comercial (Murashige, 1974). Assim, todas as plantas que se pretendiam tornar rentáveis passaram a ser produzidas por micropropagação devido à sua capacidade de regeneração. Este método é, então, um meio importante de propagação de diversas espécies vegetais com valor comercial como, por exemplo, plantas ornamentais e espécies lenhosas que são propagadas através da proliferação dos gomos axilares (Mantell et al., 1985; Pierick, 1987; Chu, 1992). Em 1992, Chu elaborou um resumo excelente de considerações económicas e de exigências de mercado para as plantas obtidas por micropropagação. Neste método de propagação o primeiro passo a ter em conta é a análise do mercado potencial (realidade económica) bem como o habitat em que a planta cresce (realidade biológica) (McCown e McCown, 1999). A rentabilidade da micropropagação tem implicações não só económicas, como também ambientais e sociais.

Posteriormente, foram desenvolvidas culturas de células em suspensão (Hartmann et al., 1990). A descoberta de que estas células podiam desenvolver estruturas semelhantes a embriões, denominados embrióides, indica que o processo da

embriogénese, bem como o da organogénese, pode ser induzido sob controlo. A capacidade de crescimento das células em suspensão, numa escala alargada comercialmente, pode requerer o uso de meios conhecidos por biorreactores (Hartmann, 1990; Yu, 2000).

A aquisição de novos conhecimentos nas áreas da investigação científica e o interesse recente pela biotecnologia das plantas permitiu alargar o seu uso à pesquisa laboratorial com desenvolvimento e aplicação do método da cultura de células a diferentes áreas (Murashige, 1974) tais como:

- obtenção de produtos secundários;
- produção industrial, em larga escala, de biomassa de produtos bioquímicos com interesse farmacêutico;
- obtenção de cultivares geneticamente melhorados através de manipulação genética e propagação das plantas;
- recuperação de clones sem doenças e preservação de germoplasma valiosos;
- multiplicação clonal rápida nas variedades seleccionadas, em que é possível a aplicação da cultura de tecidos vegetais, tanto no presente como num futuro próximo;
- utilização de um sistema modelo para estudos da expressão diferencial de genes (Dixon, 1985).

As empresas, a nível mundial, aproveitam os avanços tecnológicos e a cultura de tecidos, como método de propagação vegetativa e controlo de produção, possibilitando assim atingir diversos objectivos propostos pelas empresas. Pode levar ao aparecimento de variedades dentro das espécies, por melhoramento direccionado. Permite procurar uma alternativa aos métodos tradicionais de propagação de cultivares, de um modo rápido, cujo aumento clonal das plantas se torna demasiadamente lento. O método da cultura *in vitro* procura também tornar possível o aumento significativo da taxa de multiplicação clonal das plantas geneticamente iguais e com o mesmo vigor de crescimento. Também é particularmente útil quando usado em conjugação com programas de reprodução vegetal. Outro objectivo é utilizar este método, em viveiros comerciais, onde se pretende minimizar o espaço de crescimento geralmente usado para manter o stock das plantas (Murashige, 1974).

# 1. PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

## 1.1. Requisitos da micropropagação

O início da micropropagação começa com a excisão de pequenos fragmentos das plantas denominados explante. Este corresponde a diferentes estruturas da planta dadora (Figura 1) tais como fragmentos de folhas, de caules, de cotilédones, de hipocótilo, de raízes, de meristemas apicais ou laterais, de segmentos de inflorescência e de escamas de bolbos. O explante também pode corresponder a estruturas reprodutoras, tais como: anteras ou pólen isolado, ovários ou óvulos e embriões zigóticos (do estágio globular a torpedo). O explante é constituído por células totipotentes e competentes. A célula totipotente tem de ser activada e induzida a dividir-se seguindo um padrão diferente de desenvolvimento, que poderá conduzir à regeneração da planta. O explante pode originar directamente novas plantas ou produzir uma massa de tecido caloso (calo), constituído por células mais ou menos desorganizadas que indirectamente levam à regeneração de novas plantas.

### 1.1.1. Escolha de explante

A selecção adequada do explante é um dos factores mais importantes em micropropagação. A escolha correcta do explante também pode reduzir logo à partida a contaminação (Skirvin et al., 1999). Por sua vez, a iniciação de um novo programa, em determinadas espécies ou cultivares, pode requerer uma análise sistemática do potencial do explante (Hartmann et al., 1990).

Segundo vários autores, na escolha do explante apropriado devem ser considerados vários factores sendo de destacar:

- o genótipo (George e Sherrington, 1984; Hartmann et al., 1990);
- a qualidade geral da planta da qual se obtém os explantes. O comportamento inicial da cultura pode variar com a situação fisiológica global da planta original (Murashige, 1974);
- o órgão que serve de fonte, bem como a sua fisiologia (Murashige, 1974);

- a idade ontogénica do órgão (Murashige, 1974);
- a estação do ano em que o explante foi obtido (Murashige, 1974). Este aspecto é, particularmente, importante nas variedades de plantas adaptadas ao clima temperado (Roob, 1957; Fellenberg, 1963);
- o tamanho do explante (Murashige, 1974).

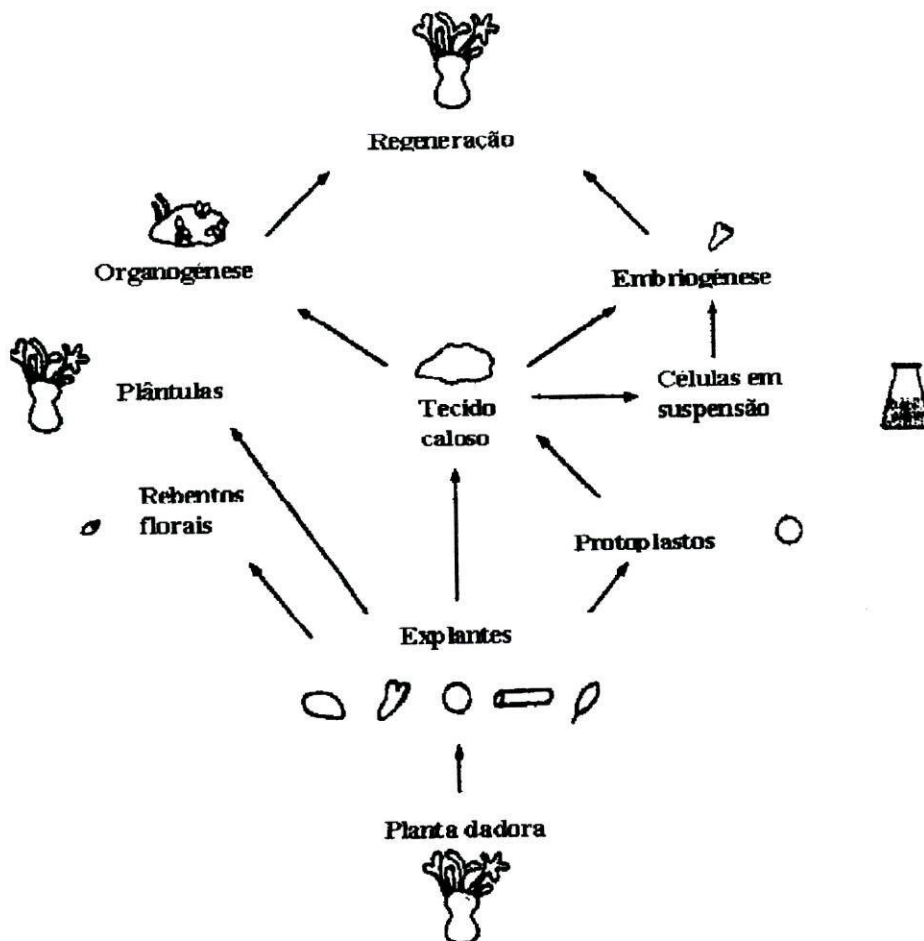


Figura 1- Regeneração de plantas, por obtenção de vários tipos de explantes provenientes de uma planta dadora. Importância da selecção do tipo de explante para que regeneração se efectue de um modo directo ou indirecto (Adaptado de Merkle et al., 1995).

### 1.1.2. Meio de cultura

A composição do meio nutritivo de cultura também é um parâmetro importante que deve ser otimizado de modo a haja sucesso completo na regeneração de plantas. Este meio deve ser apropriado, tanto na sua composição química, como nas suas qualidades físicas, de modo a tornar eficiente a indução de novos tecidos, a sua manutenção e o seu crescimento (Dixon, 1985). Dentro dos meios de cultura de plantas *in vitro*, a fórmula desenvolvida por Murashige e Skoog (MS), em 1962, constitui o meio base mais usado e tem demonstrado ser o mais eficaz para o crescimento, quer de Dicotiledóneas, quer de Monocotiledóneas (Dixon, 1985). A optimização das concentrações inorgânicas também se deve a Murashige (1966) e Skoog (1957) enquanto que a optimização dos suplementos orgânicos se deve a Linsmaier e Skoog (1965). A descoberta de reguladores de crescimento como, por exemplo, de auxinas teve uma importância fundamental no desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* (Went, 1926).

As modificações nos reguladores de crescimento são feitas para encontrar necessidades específicas. As concentrações óptimas, em auxinas e citocininas, podem diferir de espécie para espécie (Dixon, 1985). Existe um grande número de espécies vegetais que podem ser regeneradas usando o meio base MS, com variações nas quantidades dos reguladores de crescimento. As concentrações dos reguladores de crescimento constituem, vulgarmente, o factor mais crítico no sucesso do crescimento diferenciado das células cultivadas nas culturas *in vitro* (Dixon, 1985). O uso do meio de cultura MS modificado no que se refere a quantidades e tipos de reguladores de crescimento pode determinar, muitas vezes, o caminho a seguir pela morfogénese *in vitro* (Tisserat, 1985; Gautheret, 1985). A razão de concentrações entre a auxina e a citocinina constitui um factor importante na organogénese directa. A interacção e razão entre concentrações de auxina e de citocinina, no controlo hormonal da organogénese, foi descoberta por Skoog e Miller (1957). Estes autores utilizaram o tecido caloso de tabaco e conseguiram a iniciação de órgãos através do controlo hormonal. Através deste controlo, a quantidade relativa de auxina e de citocinina no meio de cultura induz na generalidade a regeneração de rebentos caulinares, raízes ou tecido caloso (Gautheret, 1985). A diminuição da concentração de auxina e o aumento da concentração de citocinina é normalmente utilizado na



indução e produção directa de rebentos caulinares provenientes de explantes cultivados (Skoog e Miller, 1957). A citocinina induz a iniciação de rebentos enquanto que a auxina induz a formação de raízes (Gautheret, 1985). O meio contendo níveis elevados de auxina leva à indução e formação de tecido caloso. Para algumas espécies, a inclusão de citocinina e a auxina no meio de cultura, pode ser benéfico para a indução de tecido caloso. Quando se pretende usar a via de embriogénese somática é, normalmente, suficiente transferir o tecido caloso para meio sem reguladores de crescimento (Tisserat, 1985). A cultura de meristemas, ápices caulinares e segmentos nodais é geralmente realizada em meios suplementados com concentrações baixas de auxina e de citocinina, de modo a induzir o crescimento de gomos axilares e impedir a formação de tecido caloso (Tisserat, 1985).

A adição dos reguladores de crescimento no meio de cultura, de ácido abcísico (ABA) ou de ácido giberélico (GA) não é usual, mas pode promover em alguns casos o enraizamento ou o desenvolvimento de plântulas (Tisserat, 1985).

Os componentes do meio de cultura para o crescimento das plantas podem ser divididos nos seguintes grupos (Dixon, 1985):

- macronutrientes;
- micronutrientes;
- fonte de ferro;
- suplementos orgânicos (vitaminas);
- fonte de carbono;
- suplementos orgânicos (reguladores de crescimento).

Todos estes compostos desempenham uma ou mais funções no crescimento *in vitro* das plantas. A divisão em macro e micronutrientes é, geralmente, baseada na quantidade relativa em elementos nutritivos necessários à planta. As vitaminas são essenciais para muitas reacções químicas. Por exemplo, o inositol é muitas vezes mencionado como a vitamina que estimula de um modo significativo o crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, o efeito das vitaminas no desenvolvimento das células *in vitro* difere de espécie para espécie e a sua utilização deve ser cuidadosa.

As necessidades em hidratos de carbono são facilmente ultrapassadas pela incorporação, no meio de cultura, de sacarose na concentração de 2-3% (Murashige, 1974). Os hidratos de carbono são responsáveis por respostas específicas de

morfogénese e aparentemente desempenham um papel tanto biofísico como bioquímico na formação de rebentos caulinares (Brown et al., 1979).

Por vezes são libertados para o meio produtos fenólicos adversos provenientes do explante e que provocam o acastanhamento tanto do explante como do meio de cultura (Tisserat, 1985). É então necessário fazer subculturas frequentes ou incluir um anti-oxidante no meio, de modo a retardar o aparecimento do acastanhamento nos tecidos, a sua degradação (Murashige, 1974) e conseqüente necrose. Geralmente o ácido ascórbico (L-AA, ascorbato, vitamina C), devido às suas propriedades anti-oxidantes, é o mais usado para retardar o acastanhamento e deterioração dos tecidos recentemente excisados, ou seja, dos explantes. Trabalhos recentes sobre as plantas referem que o papel anti-oxidante do AA está bem definido (Miyake e Asada, 1994). Muito do conhecimento sobre o ácido ascórbico tem sido obtido do estudo de plantas completas (Citterio et al., 1994; Noctor e Foyer, 1998).

O AA está implicado numa série de processos físicos e biológicos das plantas (Stasolla e Yeung, 1999). Sabe-se que o ácido ascórbico é necessário em muitos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas (Arrigoni, 1994; Smirnoff, 1996). Embora o AA tenha um papel crucial durante o desenvolvimento e germinação do embrião zigótico (Arrigoni et al., 1992) não se conhece o seu envolvimento durante a embriogénese somática. Relativamente aos embriões tratados com AA, verificou-se um aumento significativo de 47% para 79%, em relação aos embriões controlo (Stasolla e Yeung, 1999). Também se verificou que o tecido caloso de tabaco, quer jovem quer velho, quando tratado com AA, levava à formação de maior quantidade de rebentos (Joy et al., 1988).

A função biológica anti-oxidante do ácido ascórbico também protege as plantas do stress oxidativo. O ácido ascórbico contribui para a eliminação de radicais de oxigénio e seus derivados, denominadas espécies reactivas de oxigénio (ERO). As reacções de defesa anti-oxidante podem ser consideradas necessárias às células aeróbias e a concentração elevada intracelular de ácido ascórbico, é um indicador da importância desta função nos organismos. O ácido ascórbico é um anti-oxidante que actua contra as ERO conjuntamente com outros anti-oxidantes tal como a glutatona e o  $\alpha$ -tocoferol, num sistema denominado como sendo o ciclo do ascorbato-glutatona (Jiménez et al., 1997).

Nas plantas o ácido ascórbico também participa no processo de modulação de lenhificação, de divisão celular e de resposta hipersensível. Na parede celular das

plantas são encontradas extensinas, proteínas ricas em hidroxiprolina, que perante uma injúria formam uma rede de glicoproteínas, e os genes da extensina são induzidos em resposta ao fermento e ao ataque dos agentes patogénicos.

### 1.1.3. Esterilização e desinfecção

Na realização da micropropagação são necessárias condições assépticas para eliminar todos os microrganismos que possam existir no ambiente de trabalho e nos explantes. Os principais agentes contaminantes que afectam as culturas de tecidos são as bactérias e fungos. Estes microrganismos estão vulgarmente presentes nas plantas *in vivo* mas mostram efeitos negativos *in vitro* (Skirvin et al., 1999). A composição do meio de cultura tornam os explantes muito susceptíveis às contaminações (Falkiner, 1990; Leifert e Waites, 1990). As contaminações são significativamente reduzidas ou anuladas através dos procedimentos assépticos resultantes da utilização dos seguintes meios:

- calor;
- radiações;
- filtração;
- desinfectantes químicos.

Geralmente o calor corresponde ao aquecimento em condições controladas de pressão e temperatura. Pode ser utilizado calor húmido ou calor seco, sendo o primeiro considerado mais eficaz. O calor húmido, é utilizado para a esterilização dos meios de cultura realizada em autoclave, enquanto que o calor seco é utilizado para esterilização e desinfecção de utensílios metálicos e material de vidro.

As radiações ultravioletas são utilizadas em câmara de fluxo laminar e salas de cultura devido ao seu efeito bactericida a partir de 330 nm.

A filtração é utilizada em compostos termolábeis como, por exemplo, em alguns reguladores de crescimento (Dixon, 1985).

Os desinfectantes químicos são utilizados para irradiar os microrganismos da superfície do explante e da mesa de trabalho. Os esporos ou outras estruturas reprodutoras, podem estar aderentes ao explante, nomeadamente na página inferior da folha (Skirvin et al., 1999), sendo por isso necessária a sua eliminação. Os principais desinfectantes incluem o álcool (etílico, metílico ou isopropílico,

geralmente a 70-80%) e hipoclorito de sódio ou cálcio, com 5% a 20% de composto activo (Hartmann et al., 1990). O hipoclorito é mais eficiente quando se adiciona, por exemplo 0,01% de Tween 20. Algumas plantas são sensíveis ao hipoclorito de sódio enquanto que outras são sensíveis ao hipoclorito de cálcio (Skirvin et al., 1999).

#### 1.1.4. O ambiente de cultura

O crescimento das culturas de tecidos vegetais depende do ambiente de cultura a que os explantes estão sujeitos. As condições de cultura de tecidos podem ser manipuladas e controladas relativamente a alguns factores como por exemplo:

- intensidade da luz;
- fotoperíodo;
- temperatura;
- O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

A intensidade, o tipo e a duração da luz, a temperatura, as concentrações de oxigénio/dióxido de carbono e a composição física do meio são factores que desempenham um papel importante na morfogénese da cultura *in vitro*. No entanto, os factores ambientais mais importantes na cultura de tecidos são a luz e a temperatura (Murashige, 1974). A proliferação do tecido caloso geralmente ocorre na obscuridade enquanto que a luz promove a embriogénese, a organogénese e o reverdecimento do tecido caloso. Na generalidade, os explantes estabelecem-se numa intensidade luminosa moderada (5-30  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) usando um fotoperíodo de 16 horas (Murashige, 1974). A luz é fornecida, habitualmente, por lâmpadas de luz branca ou por lâmpadas fluorescentes próprias para câmaras de cultura (Gamborg e Phillips, 1995). Posteriormente o desenvolvimento de plântulas é favorecido por um aumento da intensidade luminosa (50  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Este aumento promove o desenvolvimento de folhas fotossinteticamente activas e facilita a aclimatização requerida no estabelecimento das plantas *in vivo*, no exterior (*ex vitro*). A temperatura da câmara de cultura ronda, geralmente, os 25° C embora algumas espécies possam requerer temperaturas variáveis que permitem um crescimento óptimo (Tisserat, 1985).

## 1.2. Principais fases da micropropagação

As fases da propagação *in vitro* dependem do meio nutritivo utilizado bem como do ambiente de cultura, conforme referido anteriormente. O sucesso da propagação, comparativamente com os métodos convencionais, é essencialmente devido à possibilidade que há em separar as fases de cultura que mostram diferentes aspectos de desenvolvimento.

Murashige (1974) considerou três fases mais significativas na propagação *in vitro* das plantas. No estabelecimento destas fases, como um procedimento comercial, atendeu ao estabelecimento da cultura em condições assépticas, à multiplicação dos gomos e à preparação para o estabelecimento das plantas no solo, (Murashige, 1974). Mais recentemente, passaram a ser consideradas quatro fases no crescimento das culturas *in vitro* (Hartmann et al., 1990) (Figura 2) e que são referidas a seguir.

A 1ª fase, estabelecimento e estabilização, tem como objectivos:

- proceder, em primeiro lugar, a uma desinfectação dos explantes;
- manter esses mesmos explantes em condições assépticas;
- estabelecer e estabilizar a cultura;
- obter uma taxa razoável de sobrevivência de explantes e um crescimento rápido desses mesmos explantes;
- promover a formação de múltiplos primórdios.

Geralmente, ao fim de 4-6 semanas de cultura, está completa a 1ª fase de cultura de modo a proceder-se ao transplante.

Na 2ª fase, multiplicação dos primórdios, os objectivos são:

- manter a microcultura estabilizada;
- conseguir uma multiplicação, através de um aumento rápido do número de primórdios, de modo a originar plantas definitivas e completas;
- induzir a formação de órgãos adventícios (organogénese) ou a formação de embriões somáticos (embriogénese) (Murashige, 1974).

Nesta fase cada explante vai originar grupos de primórdios de tamanho muito reduzido, que surgem a partir de uma massa de tecido caloso (Hartmann et al., 1990). Os primórdios de tamanho reduzido são separados para que se efectue o transplante para o novo meio de cultura (Hartmann et al., 1990). O tamanho óptimo dos primórdios e o método de separação varia de espécie para espécie. Geralmente, é necessária uma porção mínima de tecido para produzir uma multiplicação rápida e uniforme (Hartmann et al., 1990). A multiplicação dos primórdios pode ser repetida várias vezes para aumentar a quantidade de material que, posteriormente, irá ser sujeito a enraizamento e transplante (Hartmann et al. 1990).

Na 3ª fase, prétransplante, enraizamento *in vitro*, os objectivos são:

- promover a indução de raízes em meio apropriado;
- aumentar o vigor das plantas.

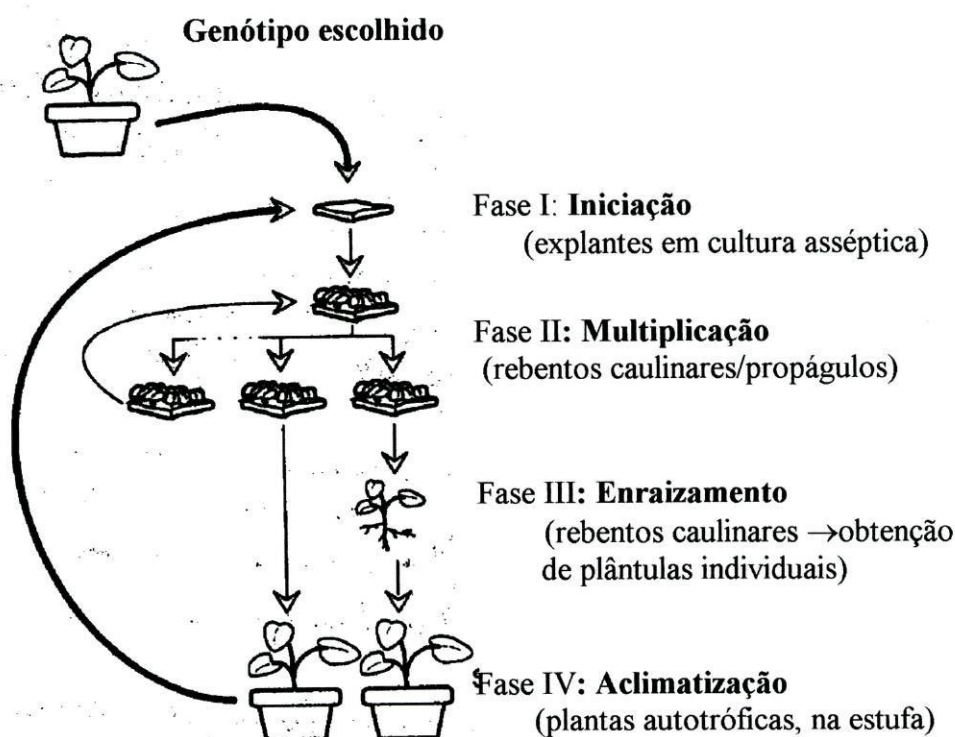
Nesta fase pretende-se preparar, com sucesso, as plântulas para o transplante no solo, aumentando a sua resistência a agentes patogénicos e a tolerância à humidade. Por parte da planta é necessário que haja a conversão das condições heterotróficas em condições autotróficas, aumentando o seu potencial de aclimatização e a sua sobrevivência durante o transplante.

Inicialmente, tem de se proceder ao enraizamento *in vitro* fazendo subculturas num meio esterilizado. Dependendo da espécie, no meio de cultura há redução da quantidade de citocininas ou o meio fica sem reguladores de crescimento. Por outro lado, pode ter de se aumentar a concentração em auxinas. Muitas vezes também se reduz o conteúdo em sais inorgânicos. As condições heterotróficas em que se encontravam as plantas vão sendo alteradas, gradualmente, para que passem a ter condições autotróficas possibilitando-lhes, assim, a sua sobrevivência numa estufa, ou em qualquer outro local (Hartmann, et al. 1990). A selecção de casos aberrantes, anormais ou gomos infectados, é prioritária para que haja uniformidade nas futuras plantas (Hartmann et al. 1990).

Na 4ª. fase, transplante, aclimatização e enraizamento *ex vitro*, os rebentos caulinares, enraizados ou não, são retirados dos recipientes de cultura eliminando por completo o agar, fonte potencial de contaminações, através da lavagem com água corrente. As plântulas são transferidas ou para recipientes contendo meios de enraizamento, com ou sem hormonas, ou para vasos com solo. São necessários vários

dias para que se tornem funcionais as novas raízes. Logo que as plântulas estejam estabelecidas no meio de cultura, por aquisição de raízes, são gradualmente expostas *ex vitro* a uma humidade relativa baixa e a uma intensidade luminosa elevada (Hartmann et al. 1990).

No método da propagação *in vitro*, a possibilidade que há em separar as diferentes fases, de acordo com os diferentes aspectos da regeneração e do desenvolvimento da cultura, é vantajosa relativamente aos métodos convencionais. Assim, pela selecção dos explantes e através do grau elevado de controlo do ambiente de cultura, no que se refere a factores de temperatura, de luz e do meio nutritivo, torna-se possível a manipulação das diferentes fases, para maximizar a produção obtida relativamente ao número, tamanho e qualidade dos propágulos (Hartmann et al., 1990).



**Figura 2** – Micropropagação típica com 4 fases. A fase II, multiplicação, pode ser repetida as vezes que forem necessárias. A fase III, enraizamento, pode ser opcional, dependendo das espécies (adaptado de Gamborg e Phillips, 1995).

### 1.3. Métodos de propagação vegetativa *in vitro*

A micropropagação e a cultura de tecidos iniciam-se sempre com a excisão do explante da planta em estudo, liberto de microrganismos e colocado em condições assépticas (Hartmann et al., 1990).

O explante pode dar origem a massas celulares mais ou menos desorganizadas denominadas tecido caloso (calo), a partir do qual se podem regenerar novas plantas (Murashige, 1974; Hartmann et al., 1990).

Para a iniciação da formação do tecido caloso, os explantes em condições assépticas, devem ser transferidos para um meio de cultura sólido. No explante deve ser exercida uma ligeira pressão para melhorar a superfície de contacto com o meio de cultura (Dixon, 1985).

A regeneração de plantas *in vitro* pode, de acordo com Hartmann e colaboradores, ser obtida segundo as seguintes vias:

- Cultura do meristema apical;
- Proliferação dos gomos axilares;
- Indução dos gomos adventícios;
- Organogénese;
- Embriogénese somática.

Cultura do meristema apical implica a excisão de uma pequena parte do gomo apical e é o processo de regeneração e de alongamento do meristema apical e das folhas rudimentares. Este tipo de cultura é utilizado, principalmente, para a obtenção de plantas sem vírus.

Proliferação dos gomos axilares é o processo que conduz à proliferação de gomos axilares, sendo suprimido o desenvolvimento do gomo apical. Este processo conduz à multiplicação de rebentos caulinares que devem ser excisados e posteriormente enraizados.

Indução dos gomos adventícios é o processo que envolve a iniciação dos gomos adventícios, tanto de um modo directo a partir do explante, como de um modo indirecto a partir do tecido caloso obtido, por sua vez, após a cultura do explante. A indução dos gomos, directa ou indirectamente, resulta dos tratamentos com reguladores de crescimento a que o explante foi sujeito, após ter sido colocado em meio base de cultura. Envolve a produção *de novo* de gomos (Hartmann et al., 1990).

Organogénese é o processo que leva à formação, crescimento e diferenciação de estruturas caulinares (caulogénese) e de estruturas radiculares (rizogénese) e pode ser obtida por duas vias diferentes:

- por organogénese directa. Os primórdios caulinares ou radiculares originam-se, directamente, a partir de células do explante;
- por organogénese indirecta. O explante dá origem a uma massa indiferenciada de células designada de tecido caloso (calo), que constitui uma formação intermédia, a partir do qual se originam os primórdios.

A diminuição da concentração de auxina e o aumento da concentração de citocinina é usada, habitualmente, para induzir a organogénese de estacas caulinares a partir de tecido caloso.

Os primórdios caulinares são estruturas unipolares e encontram-se fisicamente ligados ao tecido vascular de origem (Tisserat, 1985). Para se obter uma plântula, as estruturas caulinares têm de ser sujeitas ao enraizamento.

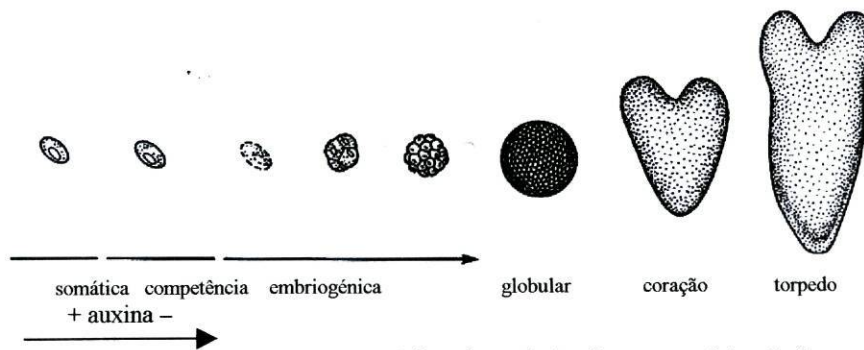
Embriogénese somática é o processo que leva à diferenciação de embriões somáticos, a partir de uma célula ou grupos de células. O embrião somático é uma estrutura bipolar, ou seja, uma planta rudimentar com um eixo raiz/gomo, independente (Brown et al., 1986). Esta forma de embrião não se encontra fisicamente ligado aos tecidos vasculares de origem (Haccius, 1978; Tisserat, 1985). Este método de propagação *in vitro*, por embriogénese somática, pode utilizar duas vias diferentes:

- por embriogénese directa, em que as células somáticas do explante regeneram por completo o embrião somático;
- por embriogénese indirecta (Figura 3), em que as células somáticas do explante dão inicialmente tecido caloso a partir do qual se originam os embriões somáticos.

Geralmente, basta transferir o tecido caloso para um meio de cultura sem reguladores de crescimento que permite o desenvolvimento de estádios embrionários mais tardios e posteriormente o aparecimento de uma nova planta (Tisserat, 1985). Relativamente ao explante utilizado, este pode ter células que estão num intervalo entre o estado de células embriogénicas pré-determinadas e o estado sem células embriogénicas. Tudo depende da idade do explante.

Para além do explante e dos reguladores de crescimento utilizados, existem outros factores que podem influenciar a indução do estado embriogénico. O genótipo da planta é dos factores mais importantes a ter em linha de conta. Numa dada espécie, os diferentes genótipos possuem diferentes capacidades embriogénicas.

A embriogénese somática tem várias vantagens relativamente à macropropagação e a outras vias de micropropagação. Apresenta a possibilidade de propagação em larga escala, cultura em grandes volumes, e potencial distribuição directamente para estufas ou campo como “sementes sintéticas” (Hartmann et al., 1990). Apesar das vantagens mencionadas, existem limitações em vários passos experimentais conducentes à obtenção de embriões somáticos e posterior desenvolvimento.



**Figura 3** – Representação esquemática da embriogénese somática indirecta (Adaptado de Toonen e Vries, 1996).

Esta via de micropropagação, por embriogénese somática, está relacionada com a interrupção de um modelo de expressão de genes nas células do explante e a sua substituição por um programa embriogénico de expressão de genes que irão produzir

embriões somáticos. Para reprogramar as células para um estado embriogénico tem de haver activação de sistemas de transdução de sinais, os quais desencadeiam alterações que conduzem à formação de tecido caloso ou embriões somáticos. Após esta primeira fase de indução embriogénica seguem-se as fases posteriores (globular, coração e torpedo) que são afectadas por diversos factores. Destes factores temos a salientar as fontes de azoto, os hidratos de carbono e os reguladores de crescimento, cujas concentrações devem ser optimizadas relativamente a cada fase. Segundo Canhoto (1994), o azoto, conjuntamente com os outros dois factores já referidos, é dos constituintes do meio que mais condiciona a indução da embriogénese.

A regeneração directa, quer por organogénese quer por embriogénese, apresenta a vantagem de diminuir significativamente potenciais variações somaclonais que podem conduzir a grandes alterações genéticas nos cultivares (McCown e McCown, 1999).

## 2. PLANTAS MEDICINAIS

A falta de plantas medicinais no mercado e o interesse cada vez mais generalizado por parte dos consumidores neste tipo de produtos, levou a que empresas de fármacos tais como a Aditiva, em conjunto com outros organismos e dentro de projectos comunitários, fizessem estudos detalhados de algumas espécies. Um desses exemplos foi o *Hypericum androsaemum* que obedece a critérios de normalização. Estas espécies são utilizadas em culturas *in vitro* para obtenção de tecido caloso, do qual se obtêm produtos metabólicos secundários com princípios activos de interesse e uso farmacológico.

O ressurgimento dos produtos provenientes das plantas medicinais, verificou-se na década passada, com especial relevo na América do Norte (Briskin, 2000). A utilização deste tipo de plantas teve um aumento significativo, de 3% em 1991 para cerca de 37% em 1998 (Brevoort, 1998). Na Europa, as vendas de medicamentos à base de plantas no regime de venda livre estão a aumentar a um ritmo intenso (Chevallier, 1996). As grandes empresas farmacêuticas utilizam as plantas medicinais como fonte de medicamentos e investem na pesquisa de novas

substâncias químicas vegetais que possam ser comercializadas como medicamentos (Brevoort, 1998; Glaser, 1999).

O factor que mais peso teve para o crescimento significativo no uso das plantas medicinais, nos Estados Unidos, foi a aprovação da legislação federal em 1994 (referências em Dietary Supplement Health e Education Act or “DSHEA”) que facilitou a produção e o marketing dos produtos naturais (Brevoort, 1998). Relativamente a muitas plantas medicinais, de interesse comum, a primeira pesquisa efectuada foi nas áreas da fitoquímica, da farmacognosia e da horticultura. Assim, na área da fitoquímica, as plantas são caracterizadas pelos compostos bioactivos que possuem, os quais têm sido separados e submetidos a uma análise estrutural detalhada. Na área da farmacognosia, têm-se realizado experiências de bioactividade, identificação de potenciais modos de acção e locais alvo para a actividade fitomedicinal dos compostos. E, finalmente, na área da horticultura é realçado o desenvolvimento da capacidade óptima do crescimento dos cultivares. Esta última área tem sido desenvolvida, especialmente para algumas plantas medicinais, cuja colheita é feita ainda em condições selvagens e cujas condições de crescimento não são as mais favoráveis. A colheita selvagem de plantas medicinais pode ser problemática em termos de perda de biodiversidade. A potencial variação na qualidade da planta medicinal, a toxicidade potencial (Shulz et al., 1998; Capasso et al., 1999) e, ocasionalmente, a identificação imprópria da planta com possíveis causas trágicas (Briskin, 2000), são factores que devem ser considerados importantes. A toxicidade das plantas medicinais representa um risco potencial para a saúde humana (Capasso et al., 2000).

## **2.1. A cura e sinergia das plantas**

As acções fitomedicinais resultam geralmente dos produtos secundários envolvidos na ecofisiologia das plantas. As acções medicinais são únicas para uma dada espécie particular ou grupos de plantas. Numa determinada planta, as combinações dos produtos secundários permitem muitas vezes fazer a distinção taxonómica (Wink, 1999). Alguns destes produtos secundários podem exercer a sua acção pela semelhança que possuem com os metabolitos endógenos (Kaufman et al., 1999).

As plantas são remédios completos que ocorrem naturalmente e, na fitoterapia europeia, as plantas nativas são muito populares. Os trabalhos de investigação revelam a eficácia dos medicamentos à base de plantas. Por exemplo, a espécie nativa da Europa, o *Hypericum perforatum*, é apreciado pelas suas propriedades curativas. É um bom exemplo de como a investigação moderna pode confirmar aquilo que os fitoterapeutas já sabem desde há séculos. Hoje, entende-se melhor o modo como a planta actua no organismo humano, o que permite fixar dosagens precisas com conhecimento dos efeitos secundários e ter a segurança da forma como a planta deve ser tomada como medicamento.

A fitoterapia é uma forma de medicina energética. É a medicina mais antiga da humanidade e actualmente é objecto de muito interesse científico (Pitman, 1996). Num futuro próximo é de esperar um aumento do número de plantas a ser objecto de investigação para uso medicinal. As investigações efectuadas neste campo têm revelado que as plantas exercem um efeito medicinal benéfico maior do que o esperado. Quando se usa a planta no seu todo, em vez de se lhe extraírem os componentes, as diversas partes interactuam produzindo em muitos casos e, segundo se crê, um maior efeito terapêutico que a dosagem equivalente de componentes activos isolados (Chevallier, 1996). Em certos casos, o valor medicinal da planta, deve-se inteiramente à combinação natural de produtos secundários, presentes nas plantas, pelo que não poderá ser reproduzido apenas por um ou dois componentes activos. A eficiência terapêutica das plantas medicinais resulta muitas vezes da acção sinérgica de vários princípios químicos activos que actuam num só local ou em múltiplos locais associados com o processo fisiológico (Briskin, 2000).

A análise química das plantas medicinais não se limita só a um único produto mas estende-se a vários grupos de constituintes de modo a obter uma caracterização tão completa quanto possível (Capasso et al., 2000). O termo sinérgico ou efeito farmacológico aditivo, foi referido por Tyler (1999) como sendo benéfico devido à eliminação dos problemas surgidos com os efeitos secundários associados com o uso de um único composto xenobiótico no corpo. Este efeito foi documentado por Kaufman et al. (1999) que mostraram as interacções sinérgicas efectivas de um grande número de fitomedicamentos. As múltiplas acções químicas de um modo aditivo ou sinérgico têm a sua origem, provavelmente, no papel funcional dos produtos secundários que contribuem para a sobrevivência das plantas (Briskin, 2000).

A standartização das plantas medicinais significa encontrar o corpo da informação necessária para garantir não só uma composição química constante destas plantas, mas também uma eficácia equivalente (Shulz et al., 1998). A standartização não é apenas uma operação analítica e não deve terminar com a identificação e análise do(s) princípio(s) activo (s). No entanto, a análise química dos constituintes das plantas medicinais é a parte mais importante da standartização.

A aplicação apropriada das plantas medicinais tem grande importância (Anderson e Phillipson, 1986; Tyler, 1999; Capasso et.al.; 2000). O facto das plantas medicinais serem inofensivas, bem como a sua eficácia, depende do tipo de remédio, da sua dosagem e dos parâmetros relacionados com o consumidor, tais como: idade, caracteres genéticos, doenças concomitantes e uso simultâneo com outras drogas (Shulz et al., 1998). As plantas medicinais podem ser potencialmente tóxicas se forem usadas incorrectamente e como suplementos dos remédios convencionais. Por exemplo, o *Hypericum perforatum*, mostra a sua toxicidade através do aparecimento de fotodermatites, sendo o constituinte responsável a hipericina, e não é aconselhado o uso simultâneo com medicamentos anti-depressivos como, por exemplo, o Prozac. Determinadas plantas medicinais podem reduzir ou aumentar a eficácia do uso dos remédios convencionais quando usadas concomitantemente, sendo assim um risco potencial para a saúde humana (De Smet, 1997).

As plantas do género *Hypericum* eram já usadas na antiguidade sendo colocadas sobre as imagens religiosas para afugentarem os espíritos malignos. Possivelmente, foi nesta prática religiosa que teve origem a palavra hipérico que, em grego, significa “em cima de um ícon” (Seabra, 1987).

Na medicina popular, em Portugal, espécies do género *Hypericum* têm sido usadas como plantas medicinais. Assim, o *H. androsaemum* é usado na forma de infusão, de decocto, de ungento, de óleo e de licor, para fins medicinais. Na forma de infusão é usado no tratamento de asma, inflamações da traqueia, digestões difíceis e intoxicações por mau funcionamento do fígado. Na forma de decocto, utiliza-se como vermífugo. Na forma de ungento, trata as distorções e contusões. Na forma de óleo, é usado no tratamento da gota, dor ciática, reumatismo, chagas, queimaduras e ulcerações. Por último, na forma de licor, utiliza-se como digestivo e aperitivo. Apesar das várias utilizações de *Hypericum androsaemum*, ele é principalmente usado como diurético, sob a forma de chá ou tisana, em insuficiências funcionais renais e hepáticas (Costa, 1904; Seabra, 1987; Costa, 1994).

O *H. androsaemum* é conhecido por hipericão do Gêres, erva da pedra ou androsemo (Seabra e Alves, 1989).

O *Hypericum perforatum*, de utilização mais lata, é usado externamente como planta medicinal no tratamento de feridas da pele, eczemas e queimaduras e, internamente, é usado em doenças do trato alimentar e outras (Nikolaeva, 1977; Hobbs, 1989). O extracto desta planta foi estudada clinicamente para o tratamento de depressão e foi registada, na Alemanha, como um antidepressivo (Psychotonin<sup>R</sup>) (Harrer e Sommer, 1994; Ernest, 1995). O *Hypericum perforatum*, é uma planta que actua como um remédio eficaz no tratamento de casos pouco graves de depressão e esgotamento nervoso (Cass, 1999). O *Hypericum perforatum* está incluído nas antigas Farmacopéias da Checoslováquia, da Roménia e da Rússia (Reynolds, 1993). Esta planta mostra também uma actividade anti-tumoral (Anker et al., 1995). Malamas e Marselos (1992) refere que, no uso tradicional das plantas medicinais na Grécia, o *H. perforatum* era usado externamente para tratar o herpes zoster mostrando um bom resultado.

Como conclusão podemos dizer que várias plantas de *Hypericum* sp. são usadas na medicina popular devido às propriedades farmacológicas de alguns dos seus compostos secundários, que possuem princípios activos. A acção destes princípios pode ser como diurético e sedativo, como vulnerário (cicatrização de feridas), como anti-séptico, anti-microbiano, bactericida, anti-inflamatório e anti-depressivo, entre outros (Holzl e Ostrowski, 1987; Yazaki e Okuda, 1990; Fernandez e Alcaraz, 1991; Maisenbacher e Kovar, 1992; Rocha et al., 1994; Rocha et al., 1995; Axarlis et al., 1998; Dias et al., 1998; Ishiguro et al., 1998; Schempp et al., 1999; Butterweck et al., 2000; Pistelli et al., 2000; Poutaraud et al., 2000; Ferraz et al., 2001; Kang et al., 2001; Southwell e Bourke, 2001).

### **3. CARACTERIZAÇÃO GERAL DO GÉNERO *HYPERICUM* L.**

#### **3.1. Sistemática**

Considerando que a identificação e escolha correcta das plantas é de toda a conveniência, perante a diversidade de nomes para a mesma planta e para evitar

possíveis toxicidades, passa-se de seguida a apresentar a classificação de algumas espécies do género *Hypericum*.

De acordo com a NOVA FLORA DE PORTUGAL aparecem, como pertencendo ao género *Hypericum*, 14 espécies. Destas, 12 delas encontram-se distribuídas por 7 secções (Franco, 1971) (Quadro I). Este autor considera mais duas espécies, *Hypericum calycinum* L. e *Hypericum hircimum*, que são cultivadas como plantas ornamentais.

### Quadro I

#### Secções e espécies do género *Hypericum* L.

<i>Androsaemum</i> (Duhamel) Godron	<i>H. foliosum</i> Aiton
	<b><i>H. androsaemum</i> L.</b>
<i>Taeniocarpium</i> Jaub. & Spach	<i>H. pulchrum</i> L.
<i>Adenosepalum</i> Spach	<i>H. montanum</i> L.
	<i>H. tomentosum</i> L.
	<i>H. pubescens</i> Boiss.
<i>Elodes</i> Koch	<i>H. elodes</i> L.
<i>Drosocarpium</i> Spach	<i>H. perforatum</i> L.
<i>Oligostema</i> (Boiss.) Stefanov	<i>H. linarifolium</i> Vahl
	<i>H. humifusum</i> L.
<i>Hypericum</i>	<i>H. undulatum</i> Willd
	<i>H. perforatum</i> L.

As espécies do género *Hypericum* L., quer segundo a Nova Flora de Portugal quer segundo a Flora Europaea, pertencem à:

Divisão: *Angiospermae*

Classe: *Dicotyledoneae*

Subclasse: *Archichlamydeae*

Ordem: GUTTIFERALES

Família: GUTTIFERAE (CLUSIACEAE; HYPERICACEAE)

Subfamília: *Hypericoideae*

A ordem GUTIFERALES está representada na Europa apenas pela família GUTTIFERAE (referência em Seabra, 1987). Este termo que designa a família, é considerado incorrecto segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica de 1972. Mas, embora o uso desta designação se tenha mantido, é substituído muitas vezes pelos termos CLUSIACEAE ou HYPERICACEAE. Alguns autores, como por exemplo, Pereira Coutinho (1939), Gonçalo Sampaio (1947) e mais recentemente Hutchinson (1973) consideram o género *Hypericum* como pertencendo à família HYPERICACEAE. Hutchinson apresenta como justificação básica do seu critério de classificação os caracteres morfológicos. A família CLUSIACEAE possui flores predominantemente unissexuais, sementes quase sempre ariladas e células secretoras vermiformes, enquanto que a família HYPERICACEAE possui flores bissexuais, as sementes não são ariladas e as células secretoras apresentam, normalmente, a forma de pontuações translúcidas ou negras. A subfamília *Hypericoideae* é constituída, principalmente, pelo género *Hypericum* (Castroviejo et al., 1995).

### 3.2. Caracteres morfológicos

As plantas incluídas na família GUTTIFERAE são perenes, raramente anuais e rizomatosas (Castroviejo et al., 1995). Esta família engloba as árvores e arbustos, que são plantas lenhosas, mas podem também englobar plantas herbáceas (Quer, 1962). Apresentam glândulas translúcidas que contêm óleos essenciais e, em alguns casos, glândulas vermelhas ou negras, cujo conteúdo é hipericina. As folhas são simples ou raramente, em verticilos de 3-4 e, geralmente, são persistentes e sem estípulas. As inflorescências são terminais, em cimeira. As flores são hermafroditas ou unissexuais e são actinómórficas. As sépalas são imbricadas e as pétalas são livres, de prefloração contorcida. Os estames apresentam-se polidelfos ou aparentemente indefinidos. O ovário é súpero, com placentação axial ou parietal. Os frutos podem apresentar cápsulas septicidas ou septífragas, bagas ou drupas. As sementes apresentam-se sem endosperma (Tutin e Heywood, 1968; Franco, J. A., 1971).

O género *Hypericum* L. possui características morfológicas próprias em que é de salientar o seu aparelho secretor. Este é constituído por canais secretores, que

aparecem nos caules e nas raízes, e por cavidades ou bolsas secretoras, que aparecem nas folhas e flores (Mathis e Ourisson, 1964a). O trabalho mais antigo sobre o aparelho secretor do género *Hypericum* é da autoria de G. Weill (1903). Este autor reconhece que a repartição dos órgãos secretores na planta é semelhante para a maioria das espécies (Mathis e Ourisson, 1964). No aparelho secretor pode encontrar-se resina de cor âmbar. Também pode ter óleos essenciais, e apresentar-se translúcido e subepidérmico, passando a ter o nome de glândulas translúcidas. As glândulas translúcidas podem ser protuberantes, convexas e de contorno subcircular ou elipsoidal. Estas denominam-se *vesículas*, não contêm hipericina nem pseudo-hipericina e aparecem em *Hypericum androsaemum* L.. Por último, o aparelho secretor pode ter hipericina ou pseudo-hipericina. A cor varia entre o vermelho/roxo e o negro, denominando-se de glândulas negras ou opacas. Estas glândulas aparecem em *Hypericum perforatum* (Tutin e Heywood, 1968; Castroviejo et al., 1995). A cor negra, vermelha ou raramente âmbar, depende da concentração em hipericina. As glândulas secretoras, no geral, podem designar-se *marginais* quando emergem o suficiente para interromper a linha da margem da folha, da sépala ou da pétala. Designam-se *intramarginais* se se encontram na margem, mas não interrompem a sua linha e *superficiais* quando se encontram bem afastadas da margem (Tutin e Heywood, 1968; Franco, 1971).

As flores apresentam-se hermafroditas com (4-) 5 sépalas, (4-) 5 pétalas, estames organizados em 3 ou 5 fascículos, alternando por vezes com fascículos estéreis, ou em 5 grupos irregulares. O tipo de fruto é uma cápsula septicida, raramente carnudo e mais ou menos indeiscente (Tutin e Heywood, 1968).

A secção *Androsaemum* (Duhamel) Godron inclui as plantas de duas espécies, existentes em Portugal, *Hypericum androsaemum* Lin e *Hypericum foliosum* Aiton. Esta secção engloba arbustos glabros sem glândulas negras. As plantas apresentam-se sem glândulas vermelhas ou negras (sem hipericina) nas folhas, nas sépalas, nas pétalas ou nas anteras. Os caules, em geral, mostram-se com 4 linhas longitudinais. As folhas são opostas. As flores terminais aparecem solitárias ou em grupos de 2-3, cimeiras paucifloras, terminais (Franco, 1971). As pétalas e os estames são caducos. Os estames apresentam-se em fascículos e do tipo 5. O fruto é mais ou menos carnudo, com deiscência tardia. A cápsula não possui canais resiníferos translúcidos. As sementes são reticuladas, carenadas ou não (Tutin e Heywood, 1968; Franco, 1971).

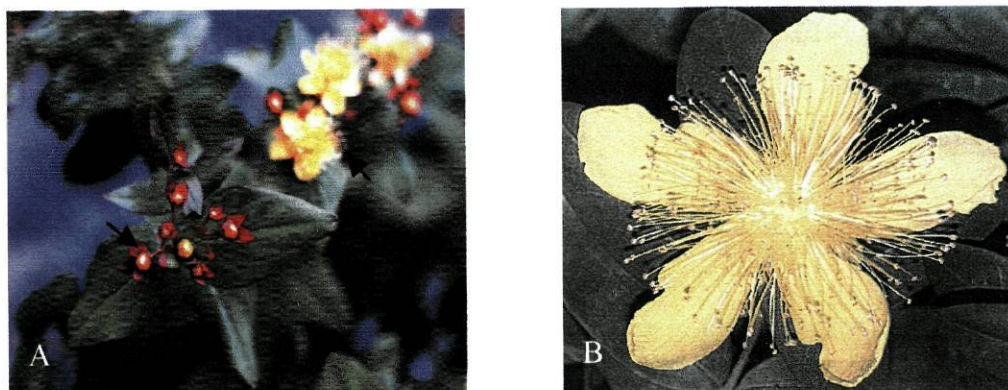
Na secção *Hypericum* está incluída a espécie *H. perforatum*. Esta secção é caracterizada por incluir plantas herbáceas glabras e perenes, geralmente lenhosa na base e com desenvolvimento de rebentos axilares. Estas plantas apresentam-se com glândulas negras presentes nos caules, folhas, anteras e algumas vezes nas sépalas e nas pétalas. Os caules apresentam, geralmente, 2 a 4 linhas longitudinais ou com 4 alas nos entrenós. As folhas apresentam ou glândulas negras intramarginais ou, por vezes, estas glândulas são superficiais mas em número reduzido. As flores mostram-se em subcorimbos ou em cimeiras piramidais (Figura 4). As pétalas e os estames são persistentes e estes apresentam-se fasciculados tipo 3(-4). A cápsula possui canais resiníferos translúcidos em posição longitudinal, ou dorsal e lateral, ou tem vesículas oblíquas. As sementes são reticuladas.



**Figura 4** – Flores de *Hypericum perforatum*

O *Hypericum androsaemum* Lin que foi objecto de estudo neste trabalho (GUTTIFERAE) apresenta as características morfológicas descritas a seguir. Os caules geralmente mostram 4 linhas longitudinais. Os caules floríferos apresentam duas linhas longitudinais salientes, com cor vermelha/roxa ou âmbar, aparecendo esta cor também nas folhas, brácteas, sépalas ou pétalas (Figura 5A). As folhas são opostas, largamente ovadas a ovadas oblongas, sésseis, sem cheiro a cumarina, que é um composto fenólico. Em cortes histológicos, das folhas de *H. androsaemum*, identifica-se um parênquima heterogéneo assimétrico. Próximo da epiderme superior, encontram-se células glandulares, denominadas glândulas translúcidas,

rodeando um reservatório comum. Neste é onde se acumula a secreção resinosa corada de vermelho escuro. As brácteas apresentam glândulas translúcidas puntiformes. As flores aparecem em grupos de 2-3, reunidas em pequenas cimeiras terminais (Figura 5A) ou aparecem solitárias (Figura 5B). A flor é pentâmera e apresenta uma corola de cor amarela intensa. As sépalas são inteiras e tanto as pétalas como os estames polidelfos são caducos. Os estames apresentam-se em fascículos e são do tipo 5. O fruto doliforme a globoso apresenta-se como uma cápsula baciforme, é sempre carnudo, suculento, avermelhado enquanto jovem e negro quando está maduro. É indeiscênte (Castroviejo et al., 1995). As sementes são reticuladas e aladas, pardas escuras (Franco, 1971).



**Figura 5** –Planta da espécie *Hypericum androsaemum*.

A) Cimeira e fruto.

B) Flor solitária, de cor amarela.

### 3.3. Distribuição geográfica e ecologia do *Hypericum androsaemum*

L.

O género *Hypericum* L. engloba cerca de 380 espécies que se encontram distribuídas e bem representadas em zonas temperadas do globo (Hölzl et al., 1994). Na Europa apenas se encontram 61 espécies pertencentes ao género *Hypericum* (Seabra, 1987).

Nove espécies ocorrem na Europa Central e o *Hypericum perforatum* é a espécie mais bem estudada (Schmidt et al., 2000a). Esta espécie é encontrada também por toda a Europa, na Ásia ocidental, no Norte de África e no Norte da América (Axarlis et al., 1998). Dentro das espécies europeias algumas são cultivadas em jardim (Tutin e Heywood, 1968).

As plantas da espécie *Hypericum androsaemum* L. fazem parte da flora da Europa ocidental, meridional, zona leste até à Turquia (Tutin e Heywood, 1968) e do Próximo Oriente até ao Irão (Costa, 1994). O *Hypericum androsaemum* L. é considerado uma espécie nativa de Portugal, aparecendo nas regiões do Minho, Beiras e Estremadura, nas serras de Montejunto, Sintra e Monchique. O seu habitat natural é em lugares sombrios, húmidos e margens dos cursos de água, entre eles, ribeiros (Franco, 1971). No Parque da Peneda Gerês a sua ecologia é o de sub-bosque temperado, em zonas de carvalhais (*Quercus robur*), cuja altitude pode ir aos 800-1000 metros (Gama, 2001).

### 3.4. Constituintes químicos do género *Hypericum*

A família GUTTIFERAE, à qual pertence o género *Hypericum*, é constituída por plantas que contêm vários constituintes com diversas actividades biológicas de interesse medicinal (Verotta, 1999).

O uso empírico de um número elevado de espécies do género *Hypericum*, levou a que surgissem trabalhos de investigação de modo a mostrar a acção farmacológica dos seus extractos alcoólicos e aquosos. Estes extractos mostram possuir uma acção bactericida, diurética, anti-inflamatória e analgésica, entre outros (Seabra, 1987). Nos trabalhos com o género *Hypericum* têm sido identificadas substâncias com princípios activos, das quais há a salientar as hipericinas e pseudohipericinas, os flavonóides, as xantonas (Bennett e Lee, 1989), o floroglucinol (Rocha et al., 1995), os derivados do ácido filicínico (Jayasuriya et al., 1991; Rocha et al., 1995), os óleos essenciais e, com menos frequência, as benzopirinas (Décosterd et al., 1986; Ishiguro et al., 1990). Também foram identificadas outras substâncias tais como: carotenóides, vanilina, vitaminas, taninos, ácidos cafeico e clorogénico (Seabra, 1987).

Brockmann e Sanne, em 1957, realizaram um trabalho em que estudaram a distribuição da hipericina e da pseudo-hipericina, num conjunto de 16 espécies do género *Hypericum* (Seabra, 1987). No entanto, deve-se a Mathis e Ourisson (1963) o trabalho mais completo quanto à distribuição da hipericina e pseudo-hipericina, em 220 espécies. A hipericina e a pseudo hipericina, presentes nas espécies de *Hypericum*, possuem uma acção sobre o sistema nervoso central (Öztürk, 1997; Schimidt et al., 2000a). As substâncias activas hipericina e pseudohipericina, com acção antidepressiva *in vivo*, tanto inibem a captação dos transmissores a nível das sinapses como inibem a enzima monoamino oxidase-A (MAO A) (Leonhard, 1995). Esta enzima é importante na regulação dos níveis de algumas amins fisiológicas que se pensa contribuirem para o controlo da depressão (Rocha et al, 1994; Rocha et al., 1995). À hipericina também é atribuída a propriedade anti-retroviral (Rocha et al., 1995). Esta substância também é responsável por respostas imunitárias e inflamatórias (Bork et al., 1999). No trabalho de Kang et al. (2001) é feita referência às propriedades farmacológicas da hipericina anti-reumática, anti-diurética, anti-depressiva, anti-viral, anti-neoplástica, tratamento da SIDA e desordens inflamatórias.

Os derivados de floroglucinol também têm uma acção inibidora sobre a monoamino oxidase-A (MAO). Este composto e o ácido filicínico possuem uma acção activa, *in vitro*, contra as bactérias Gram+, *Bacillus subtilis* (Rocha et al., 1995).

Muitos dos compostos fenólicos mostram possuírem propriedades anti-oxidantes (Schempp et al., 1999). As xantonas (compostos fenólicos), inibidores selectivos naturais, mostram tal como a hipericina, uma inibição forte e selectiva à monoamina oxidase A (MAO). As xantonas possuem ainda uma actividade de citotoxicidade *in vitro* e uma actividade anti-tumoral *in vivo*, bem como actividades anti-bacterianas e anti-fúngicas (Hostettmann et al., 1989, 1995; Bennett e Lee, 1989; Dias et al., 2000). A primeira xantona descrita em espécies do género *Hypericum* foi a mangiferina (Lebreton e Bouchez, 1967). A esta xantona, objecto de vários estudos, são atribuídas propriedades medicinais, tais como anti-inflamatórias, anti-hepatotoxicidade e anti-viral (herpes) (Bennett e Lee, 1989). Este mesmo composto mostra, *in vitro*, uma activação dos linfócitos quando ocorre uma situação tumoral. A xantona psorospermina, *in vivo*, mostra actividade em situações de leucemia e em situações de tumor, do cólon e mamário. A xantona psorospermina e a furanoxantona

são activas contra linhas celulares da leucemia humana e contra linfomas relacionados com a SIDA. A xantona magostina possui propriedades anti-inflamatórias e actividade anti-ulcerosa (Bennett e Lee, 1989). A rubraxantona, exhibe uma actividade antibiótica eficiente contra a estirpe *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Ilinuma et al., 1996) e existem polidroxi-xantonas que possuem uma declarada actividade anti-malária contra a estirpe *Plasmodium falcipum*, multi-resistente (Ignatushchenko et al., 1997). Às xantonas preniladas, epicatequina, derivado do floroglucinol (paglucinol) com ácido oléico e  $\beta$ -sitosterol são atribuídas propriedades cuja acção se manifesta no tratamento de hepatites e hemorragias nasais. O paglucinol apresenta-se com uma cor amarela (Ishiguro et al., 1998). Bennett e Lee (1989) referem que já foram isoladas e identificadas diversas xantonas. No entanto, a identificação do número de xantonas nas plantas do género *Hypericum* tem vindo a aumentar. Algumas destas xantonas têm substituintes simples (hidroxil, metoxil, prenil) enquanto outras apresentam uma estrutura mais complexa, como a toxiloxantona B, a maculatoxantona e a kielcorina (Seabra, 1987).

Relativamente à presença dos flavonóides nas espécies de *Hypericum* é feita a identificação do flavonol quercetina e dos seus 3-0-heterósidos hiperósido, quercetrina, isoquercetrina e rutina (Seabra, 1987). Apesar da grande uniformidade de composição relativa aos flavonóides, existem excepções nas espécies *H. hirsutum*, *H. rumeliacum* e *H. ericoides* (Seabra, 1987). Os flavonóides possuem acção anti-viral (Lin et al., 1999).

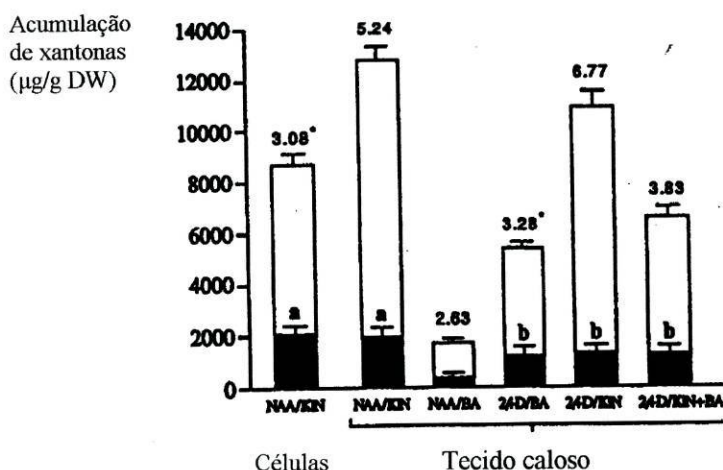
No que se refere ao óleo essencial, a sua quantidade é sempre reduzida, geralmente 0,1% do peso fresco da planta. A variação da quantidade de óleo essencial está relacionada com diversos factores como, por exemplo, ecológicos e geográficos (Mathis e Ourisson, 1964 a, b e c). O óleo essencial de *Hypericum* contém como componentes principais o 2-metiloctano, n-undecano,  $\alpha$  e  $\beta$ -pinenos, n-nonano, limoneno, 2-metildecano, mirceno, cariofileno,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, aldeído caprílico e aldeído cáprico (Seabra, 1987).

As partes aéreas da planta selvagem de *Hypericum androsaemum* tem, entre nós, largo uso. Seabra e Alves (1989) procederam ao estudar dos constituintes mais polares, solúveis em metanol e misturas hidrometanólicas, de *H. androsaemum*. Os extractos obtidos desta planta revelaram a presença de diversos compostos, flavonóides e hiperósido. A presença deste último composto já tinha sido referida

nesta espécie por Hargreaves (1966). Também foi detectada a presença de ácido clorogénico, de mangiferina e de diversos heterósidos da quercetina. A partir dos extractos desta espécie foi efectuado o isolamento e a caracterização do 3-sulfato de quercetina e potássio, o mais polar dos derivados da quercetina presente (Seabra e Alves, 1989). Este composto é uma substância sulfatada, com um radical sulfatado ligado ao carbono 3, ao qual se encontra associado o catião de potássio. O composto 3-sulfato de quercetina e potássio já tinha sido descrito anteriormente, em 1976, nas espécies *Amni visnaga* e *Oenanthe crocata* (Harborne e King, 1976). Peters et al. (1998) relataram, também, no seu trabalho que as culturas de células em suspensão de *H. androsaemum* acumulam várias xantonas não identificadas. No trabalho de Dias et al. (2000) é referido que as propriedades farmacológicas, de *Hypericum androsaemum*, têm sido atribuídas aos compostos fenólicos também produzidos em culturas *in vitro*. Estes autores verificaram que o tecido caloso e as células em suspensão de *Hypericum androsaemum* acumulavam níveis elevados de 1,3,5,6 e 1,3,6,7 de xantonas oxigenadas. Os compostos mais importantes incluem xantonas simples oxigenadas ou derivados que possuem grupos prenil, pirano, ou metoxil. Dias et al. (2000) isolaram 12 xantonas, nos extractos metanólicos, a partir de biomassa obtida *in vitro*, de *Hypericum androsaemum*. Destas xantonas, 11 foram completamente identificadas. Na biomassa produzida *in vitro* não foi detectada a xantona mangiferina, produzida em grande quantidade e outras não identificadas produzidas em pequenas quantidades, pelas partes aéreas das plantas selvagens de *H. androsaemum* (Dias et al., 2000). Também foi isolada, nesta espécie, uma diidroxixantona. Em culturas *in vitro* da espécie *Hypericum androsaemum* foram também identificadas xantonas com actividade farmacológica que possuem o grupo 6-hidroxi (Schmidt et al., 2000b). Destas há a salientar a presença de rubraxantona (Iinuma et al., 1996) e de algumas polidroxixantonas (Ignatushchenko et al., 1997).

A biossíntese de xantonas foi estudada por Schmidt e Beerhues (1997) nas culturas de células de *H. androsaemum*. A informação de como as xantonas se acumulam nos sistemas *in vitro* é ainda escassa, mas sabe-se que acumulação de xantonas é influenciada, em grande parte, pelos factores do meio de cultura, nomeadamente a suplementação hormonal (Dias et al., 2000). A produção mais elevada de xantonas verifica-se quando o tecido caloso cresce num meio suplementado com NAA (4,5  $\mu\text{M}$ ) e KIN (2,3  $\mu\text{M}$ ) enquanto a acumulação de xantonas é mais baixa nas células em suspensão, em meio idêntico ao do tecido caloso. No entanto, há uma diminuição

da acumulação de xantonas no tecido caloso quando se faz a substituição de NAA, no meio de cultura, pela mesma concentração molar de 2,4-D, na presença de KIN (2,3  $\mu$ M). Também se verifica uma redução na produção de xantonas quando se usa BA em substituição de KIN, independentemente da auxina suplementada. Este efeito é atenuado quando ambas as hormonas estão presentes (Dias et al., 2000). A manipulação das condições de cultura, particularmente na composição dos reguladores de crescimento, é uma ferramenta valiosa nos níveis dos metabolitos bioactivos (Figura 6) (Dias et al., 2000). Schmidt et al. (2000a) realizaram culturas de células de *H. androsaemum* e verificaram que os produtos secundários acumulados eram xantonas e seus derivados. Culturas de células de *Hypericum androsaemum*, em meio B5 modificado, na obscuridade, contêm uma variedade de xantonas aglicosídicas, com grupos prenil, e xantonas glicosídicas. A acumulação das xantonas acompanha o crescimento das células e é reprimida pela luz e fortemente influenciada pelo meio de cultura usado.



**Figura 6** – Acumulação de xantonas no tecido caloso (Adaptado de Dias et al., 2000).

Ahmed et al. (2001) verificaram em culturas de células, quer de *Hypericum androsaemum*, quer de *Centaurium erythraea* (GENTIANACEAE), que os precursores da biossíntese das xantonas são os ácidos benzóicos. Em *H. androsaemum*, o tratamento do meio de cultura com metil jasmonato, leva a um aumento apreciável na actividade da fenilalanina amónia-liase, formando-se assim, o ácido benzóico proveniente do ácido cinâmico. Os ácidos benzóicos apresentam funções importantes nas plantas e são os precursores de alguns produtos naturais tal

como a cocaína que contém um resíduo benzóico e o ácido gálico, componente das galotaninos e elagitaninos (Dewick, 1997). O ácido 4-hidroxibenzóico é o precursor das ubiquinonas.

Biogeneticamente, sabe-se que os ácidos benzóicos são considerados aldeídos aromáticos e álcoois. A vanilina, por exemplo, é o composto aromatizante principal da baunilha e o glucosídeo saligenina ocorre na casca de salgueiro e é conhecido pelos seus efeitos analgésicos e antipiréticos (Dewick, 1997). Os ácidos benzóicos estão também envolvidos na biossíntese de benzofenonas e xantonas. Estas classes de produtos naturais incluem numerosos compostos bioactivos. Um grupo de benzofenonas, polipreniladas denominadas gutiferonas exibem actividades antimicrobianas e anti-HIV (Hussain et al., 1982; Fuller et al., 1999). Algumas xantonas preniladas possuem forte actividade anti-bacteriana contra o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e inibem as enzimas DNA topoisomerasas I e II (Inuma et al., 1996; Tosa et al., 1997).

A espécie *H. perforatum* é utilizada sobretudo pelas suas actividades antidepressivas e antivirais, devido à presença de compostos de hipericina e pseudohipericina, diantrona (Butterweck et al., 1998; Vlietinck et al., 1998; Nahrstedt et al., 1997), floriglucinol (Nahrstedt et al., 1997; Chatterjee et al., 1998) e flavonóides (Lin et al., 1999; Butterweck et al., 2000). A acção antidepressiva poderá também ser devida à amentoflavona que aparece no *H. perforatum* (Umek et al., 1999).

O trabalho de Axarlis et al. (1998) relata que o *Hypericum perforatum* L., devido aos seus constituintes hipericina e pseudo-hipericina, possui uma actividade antiviral (Takahashi et al., 1989; Serkedjieva et al., 1990; Tang et al., 1990; Andersen et al., 1991) e também uma acção considerável contra o citomegalovirus humano (HCMV) e HIV (Meruelo et al., 1988; Sandstrom, 1989; Thiers, 1989; Schinazi et al., 1990; Hudson et al., 1991; Hudson, 1992; Barnard et al., 1992). O HCMV pertence aos herpes viróticos e é a causa frequente de infecção em pessoas que adquiriram o síndrome de imunodeficiência (SIDA) e em outras pessoas com cancro, imunossensíveis, tais como recebedores de órgãos transplantados, e crianças com infecções congénitas (Alford e Britt, 1990). Os pacientes portadores do HCMV apresentam algumas doenças causadas por este vírus tais como retinites, encefalites, doenças gastrointestinais e pneumonia. A acção anti-viral da hipericina e da pseudo-hipericina, foi estudada em DNA e RNA de vírus (Lavie et al., 1989, 1995; Tang et

al., 1990; Lenard et al., 1993; Yip et al., 1996) e foram feitos estudos clínicos em pacientes infectados com HIV (Bone, 1994). A acção antiviral aumenta na presença da luz ultravioleta (Hudson et al., 1991). As quinonas policíclicas foram isoladas no *Hypericum perforatum*, a espécie mais conhecida, vulgarmente empregue como um antidepressivo (Sommer e Harrer, 1994; Vorbach et al., 1994). Os compostos mais comuns, isolados nas plantas de *Hypericum perforatum*, são as xantonas (Bennett e Lee, 1989), os flavonóides (Rocha et al., 1995), o floroglucinol e derivados do ácido filicínico (Jayasuriya et al., 1991; Rocha et al., 1995) e, com menos frequência, benzopirinas (Décosterd et al., 1986; Ishiguro et al., 1990). Pathak et al. (1991) referem que substâncias tais como os flavonóides têm mostrado actividade antiviral. A análise química mostrou que o *Hypericum perforatum* contém taninos, flavonóides, cumarinas, óleos essenciais, antroquinonas, hipericina e pseudohipericina. Estas duas últimas substâncias acrescentam, à planta, propriedades fotosensibilizadoras (Duke, 1992; Southwell e Bourke, 2001). Animais de pele clara, não pigmentada, depois de terem comido a planta desenvolvem um fenómeno tóxico, hipericismo, que pode levar à morte depois da exposição à luz solar (Seabra, 1987; Southwell e Bourke, 2001). Estas reacções foram testadas em ratos (Paris e Moyses, 1981). No trabalho de Poutaraud et al. (2000) são referidos mais três compostos secundários, protohipericina, protopseudohypericina e cicloprotopseudohypericina que se localizam nas glândulas negras, existentes principalmente nos gomos e flores do *Hypericum perforatum*. Butterweck et al. (2000) referem que a fracção de flavonóides, do extracto de *Hypericum perforatum*, mostra uma actividade notável no teste forçado de natação (FST). Esta fracção é composta por hiperósido, isoquercetina, miquelianina, quercetrina, quercetina aglicosídica. Destes, com excepção da quercetrina, todos os compostos são activos. A planta em bruto contém uma larga variedade de compostos tais como fenilpropanos, derivados de flavonol, biflavonas, proantocianidinas, xantonas, floroglucínóis, alguns aminoácidos, naftodiantronas (hipericina e pseudohypericina) e óleos essenciais (Butterweck et al., 2000).

Plantas intactas de *Hypericum erectum* Thunb. têm sido tradicionalmente usadas, no Japão (Okuda et al., 1987) e na China (Akamatsu, 1966), como hemostático e adstringente no tratamento de feridas e de hematomas sendo os taninos, metabolitos secundários que se complexam fortemente com hidratos de carbono e proteínas, os constituintes activos efectivos. Nas culturas de tecido caloso e de rebentos de *H.*

*erectum* há a produção de taninos condensados e de compostos relacionados com eles, como por exemplo, a epicatequina em conjunto com duas flavonas glucosídicas, hipericina e quercetrina (Yasaki e Okuda, 1990).

No *Hypericum maculatum* a análise química dos seus constituintes secundários revelou a presença de hipericina, flavonóides, prociadininas e taninos. Estes compostos foram obtidos a partir de culturas celulares e a sua quantidade relativa variou de subcultura para subcultura (Kartnig e Brantner, 1990).

Na espécie *Hypericum brasiliense* foram isolados polifenóis, incluindo xantonas e outros constituintes com diversas actividades biológicas, como por exemplo, derivados de floroglucinol e ácido filicínico e flavonóides (Rocha et al., 1994). Dentro dos flavonóides são mencionados: o campeferol, luteína, quercetina, quercetrina, isoquercetrina, hiperósido (Rocha et al., 1995). Estes autores referem que os derivados floroglucinol e ácido filicínico mostram a cor amarela aparecendo em manchas avermelhadas nos cromatogramas.

A espécie *Hypericum japonicum*, é uma planta medicinal usada pelos chineses e a sua acção é devida aos derivados de floroglucinol (Ishiguro et al., 1990).

A espécie *Hypericum ericoides*, planta medicinal, tem como compostos activos xantonolinóides, kielcorina e quercetina e flavonóides, sendo a C-metilflavona a primeira a ser encontrada na família GUTTIFERAE (Cardona e Seoan, 1982).

O trabalho de Ishiguro et al. (1998) faz referência ao *Hypericum patulum* a partir do qual se procedeu ao isolamento e determinação estrutural de alguns compostos. Destes há a salientar 13 xantonas prelinadas, epicatequina, paglucinol com ácido oleanólico e  $\beta$ -sitosterol (Ishiguro et al., 1998).

Em *Hypericum annulatum* a sua acção medicinal deve-se à presença de vários flavonóides, biapigenina, catequinas, duas hipericinas, quatro xantonas e duas novas benzofenonas (Kitanov e Nedialkov, 2001).

No trabalho de Ferraz et al. (2001), relativo ao *Hypericum plectranthemum*, foram isolados três novos benzopiranos que derivam do floroglucinol e estão relacionados com a hiperforina. A contribuição dos benzopiranos para a actividade farmacológica ou toxicidade dos extractos de *Hypericum* são ainda desconhecidos (Ferraz et al., 2001).

No trabalho de Umek et al. (1999) foram estudadas seis espécies de *Hypericum*. É referido que existe uma correlação entre a quantidade de um dado composto activo e a altitude em que a planta cresce naturalmente. Essa correlação pode ser positiva ou

negativa. Por exemplo, o conteúdo em hipericinas e flavonóides varia significativamente de local para local, dentro da mesma espécie (Umek et al., 1999). Existem variações, relativamente às quantidades dos metabolitos secundários, nas culturas de células e nas plantas provenientes do mesmo clone e que crescem em situações semelhantes (Umek et al., 1999). Denke et al. (1999) referem que a qualidade das plantas medicinais é muitas vezes influenciada pelo meio ambiente, clima e localização. É necessário cultivar as plantas sob condições de controlo, de modo a obter homogeneidade nos seus constituintes activos. Existe influência dos diferentes métodos de cultivo durante o período vegetativo das plantas levando a que existam diferenças significativas (Denke et al. (1999). Murch et al. (2000b) referem que recentemente no Consumer Safety Symposium on Dietary Supplements and Herbs, 1998, houve a informação de que a concentração do composto hipericina mostrava um grau elevado de variabilidade na qualidade das preparações comerciais da erva de São João (St. John's Wort). Em espécies do género *Hypericum* foi observada a adulteração das plantas crescidas no campo por insectos, fungos, bactérias e outros agentes (St. John's Wort Monograph, 1997; Hobbs, 1998) (Murch et al., 2000b). A quantidade relativa dos produtos secundários é determinada não só pelos factores genéticos como também pelos factores ambientais (Umek et al, 1999). Poutaraud et al. (2000) referem a influência da luz na fototransformação dos protopigmentos em pigmentos (hipericina e pseudohypericina). As partes aéreas das plantas do género *Hypericum*, nomeadamente os rebentos e as flores, são as que acumulam a percentagem mais elevada dos produtos secundários (Poutaraud et al., 2000). Existe também uma variação sazonal relativamente ao conteúdo hipericina (Southwell e Bourke, 2001).

#### **4. PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *HYPERICUM SP***

Ainda há poucas dezenas de anos se utilizavam, quase exclusivamente, as plantas medicinais da flora espontânea, das quais se dizia possuírem grande valor terapêutico (Costa, 1994). Dado que, actualmente, o volume de vendas de espécies usadas em fitoterapia tem tido tendência a aumentar, quer em Portugal, quer nos países da Europa ocidental, certas indústrias passaram a criar exigências que não eram satisfeitas pelas plantas espontâneas, ou seja, no estado selvagem. Então, surge a

necessidade de se ter passado à realização da cultura *in vitro* para a propagação destas plantas. Este método de propagação tem sido utilizado como um auxiliar de conservação das plantas *ex situ* e como complemento à reprodução vegetativa feita *in situ*. Nas culturas de células *in vitro* obtém-se uma propagação rápida e em larga escala de plantas o que é útil (Costa, 1994).

No que se refere à flora portuguesa, a biodiversidade vegetal tem sido, progressivamente, ameaçada devido à actividade humana, responsável por impactos ambientais por vezes irreversíveis. Os factores de pressão humana tal como a caça, o melhoramento de acessos, o turismo, a imobiliária, os fogos e a pastorícia tendem a empobrecer a vegetação primitiva de muitas regiões, subalternizando a conservação da natureza (Gama, 2001). Todos estes factores referidos assim como as colheitas sazonais incontrolláveis, o clima, as restrições geográficas das plantas silvestres e a desflorestação têm destruído os habitats naturais destas plantas colocando-as, assim, em perigo. A colheita exagerada de certas plantas espontâneas pode levar ao seu desaparecimento, o que levou ao aparecimento de legislação relativa à colheita das espécies em vias de extinção (Costa, 1994). Para tentar evitar o perigo de extinção são, então, necessárias medidas locais de protecção e estratégias de conservação no laboratório que passam pela propagação *in vitro*.

O estabelecimento de cultura *in vitro* determina primeiro o estudo dos problemas ecológicos relativos a cada táxon, depois a selecção das variedades bem adaptadas ao meio e ricas em princípios activos. O método da cultura *in vitro* tem sido aplicado, na última década, às espécies nativas com interesse medicinal, oferecendo a vantagem de produzir um tipo uniforme de fármaco nos seus caracteres externos e na sua composição química (Costa, 1994). A cultura de tecidos *in vitro* tem sido usada, com frequência, no aumento da taxa de propagação de plantas medicinais com interesse, quer a nível agrícola, quer a nível hortícola. Segundo o projecto de investigação “Plantamedi-Tecnologias para a valorização das plantas Medicinais”, estas plantas podem ser uma boa alternativa para a produção agrícola, principalmente no norte do nosso país.

A propagação *in vitro* de *Hypericum* sp difere no método utilizado de acordo com a espécie em questão. Na literatura da especialidade os métodos de micropropagação descritos dizem respeito a algumas espécies de *Hypericum*. Assim, os trabalhos relativos às espécies *H. canariense* (Mederos, 1991), *H. linarifolium* (Santos et al., 1993), *H. brasiliense* (Cardoso e Oliveira, 1996), *H. foliosum* (Moura, 1998) e *H.*

*perforatum* (Roest e Bockelmann, 1973; Cellárová et al., 1992a,b; Pretto e Santarém, 2000; Murch et al., 2000a) referem a propagação *in vitro* por processos de organogénese, directa e indirecta. Os explantes utilizados, durante a regeneração destas espécies, foram diferentes de espécie para espécie, bem como a composição do meio de cultura e dos reguladores de crescimento adicionados.

Mederos (1991) iniciou a cultura *in vitro* da espécie *Hypericum canariense* a partir de gomos apicais e axilares, provenientes de plantas adultas, em meio Almacigo (Mederos e Rodríguez, 1990). No entanto, este autor considerou que o meio base melhor para a propagação desta espécie é a solução de macronutrientes MS (Murashige e Skoog, 1962.), adicionada de BA e de NAA. Os rebentos obtidos em meio MS foram enraizados no mesmo meio base, mas a meia força, adicionado com os reguladores de crescimento IBA ou NAA e os restantes aditivos do meio Almacigo. Segundo Mederos (1991), para tornar possível o desenvolvimento dos rebentos, foi necessário impedir o acastanhamento dos explantes e do meio durante a fase iniciação de cultura, devido aos compostos exsudados. Para isso foram adicionados ao meio de cultura os anti-oxidantes rosmanol e ácido carnósico, o que melhorou a micropropagação de *H. canariense* (Mederos, 1991).

Para a espécie *Hypericum linarifolium* Vahl, Santos e colaboradores (1993) estabeleceram a regeneração das plantas desta espécie, através de organogénese directa e indirecta, a partir de pequenos fragmentos de folhas e de caules. Estes explantes foram cultivados em meio com macronutrientes e micronutrientes de Murashige e Skoog (1962) (MS), suplementado com 2,4-D (1 mg/L) e KIN (1 mg/L ou 2 mg/L). Este meio não levou ao aparecimento de organogénese mas sim de tecido caloso. No entanto, quando se transferiu este tecido caloso para meio MS e vitaminas do meio B5 (Gamborg et al., 1976) (MS/B5), suplementado com NAA (0,1 mg/L) e BA (1,0 mg/L), observou-se o aparecimento de numerosos rebentos caulinares, ou seja, houve organogénese indirecta. Se os explantes fossem colocados logo neste meio MS/B5, com NAA e BA, registava-se um desenvolvimento directo de rebentos caulinares, isto é, organogénese directa. Se a BA fosse substituída por KIN verificava-se um efeito inibidor desta citocinina no processo de resposta organogénica. A indução de raízes foi bem sucedida no mesmo meio base, sem sacarose e sem reguladores de crescimento. As plântulas foram, de seguida, transferidas para meio líquido com composição idêntica à do meio de enraizamento. Permaneceram neste meio até se observar o desenvolvimento de um sistema

radicular bem desenvolvido, de modo a possibilitar a sobrevivência das plântulas aquando da sua transferência para o solo (Santos e colaboradores, 1993).

Na espécie *Hypericum brasiliense*, Cardoso e Oliveira (1996) estabeleceram um método de propagação desenvolvido a partir da multiplicação de gomos nodais. Os explantes utilizados foram segmentos de caule, com nódulos individualizados e com folhas. Os nódulos dos explantes foram obtidos em diversas posições com excepção do nódulo apical. Os explantes foram inoculados em meio com sais e vitaminas MS, sem reguladores de crescimento e observou-se o aparecimento de rebentos. A multiplicação e o enraizamento dos rebentos verificou-se no mesmo meio base sem reguladores de crescimento (Cardoso e Oliveira, 1996).

Para a espécie *Hypericum foliosum*, Moura (1998) estabeleceu a micropropagação a partir de segmentos de caule com nódulos individualizados, sem folhas e sem a parte apical. Os explantes foram obtidos de plântulas crescidas *in vitro* ou de plantas estabelecidas no campo. Os meios de cultura testados para esta espécie foram os seguintes: Murashige e Skoog (MS) (1962), Roest e Bockelmann (RB) (1973), Lloyd e McCown (LM) (1980), Côrte e Mendonça (CM) (1985) e Cellárová et al. (1992a). Embora anteriormente os meios Lloyd e McCown (1980) e Côrte e Mendonça (1985) não tenham sido usados na propagação do género específico *Hypericum*, foram incluídos na micropropagação do *H. foliosum*, porque são conhecidos os bons resultados obtidos com outras plantas lenhosas (Côrte e Mendonça, 1985; George et al., 1987; Matos, 1992). Os reguladores de crescimento utilizados na fase de iniciação dos rebentos e no enraizamento foram: NAA, BA, 2iP e KIN, em diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1,0 mg/L) e combinações. Na fase de indução de raízes foram usadas duas auxinas, adicionadas ao meio base: NAA (0,1 e 1,0 mg/L) e IBA (0,5 mg/L).

Para a espécie *Hypericum perforatum*, investigações sobre micropropagação foram apresentadas por Cellárová et al. (1992a,b) e Bütter et al. (1994). Foi possível obter vários rebentos adventícios, na espécie *H. perforatum*, a partir de fragmentos de folhas, de rebentos e de raízes usando os sais minerais MS, vitaminas de Gamborg (Gamborg et al., 1968) e os aminoácidos de Skoog (Moura, 1998). O meio foi suplementado com BA (0, 5 ou 0, 91 mg/l). Os rebentos foram individualizados e enraizados no mesmo meio sem reguladores de crescimento (Cardoso e Oliveira, 1996; Moura, 1998). Pretto e Santarém (2000) utilizaram como explante inicial folhas de *H. perforatum* e obtiveram organogénese indirecta. A iniciação do tecido

caloso ocorreu no meio de cultura com sais minerais e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), adicionado dos seguintes reguladores de crescimento: 2,4-D (0,1 ou 1,0 mg/L), associada com BA (0,1 ou 1,0 mg/L) ou KIN (0,1 ou 1,0 mg/L). Em todos os meios foi induzida a formação de tecido caloso, quer na obscuridade, quer na presença de luz. A regeneração de um maior número de rebentos caulinares foi conseguida após transferência de tecido caloso induzido na presença de 2,4-D (0,1 mg/L) e KIN (1,0 mg/L) para meio apenas suplementado com BA (1,0 mg/L). O enraizamento das estruturas caulinares foi conseguido em meio MS, total ou a meia força, sem ou com IBA (4,9  $\mu$ M). Os melhores resultados foram os obtidos no meio MS, a meia força, na presença de IBA (Pretto e Santarém, 2000). Murch et al. (2000a) utilizaram o TDZ para testar a indução de rebentos *de novo* no método de regeneração *in vitro* de *H. perforatum*. Para tal, excisaram secções estioladas de hipocótilos de plântulas obtidas pela germinação de sementes desinfectadas. Os explantes de hipocótilo foram cultivados em meio de cultura, referido como meio MSO, que contém sais minerais MS (Murashige e Skoog, 1962) e vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968). Foram, também, suplementados ao meio MSO os reguladores de crescimento TDZ, BAP, NAA, IAA e 2,4-D, em várias concentrações (0, 5, 10, 15 e 20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>). Os melhores resultados de organogénese directa, no entanto, foram obtidos em meio base suplementado com TDZ (5  $\mu$ mol/L). Na indução de raízes, os rebentos obtidos foram individualizados e posteriormente foram subcultivados em meio semi-sólido MSO, ou em meio líquido MSO, a meia força e sem reguladores de crescimento. As plântulas regeneradas foram transplantadas para o solo e foram aclimatizadas directamente numa estufa (Murch et al., 2000a).

De um modo geral podemos dizer que, na maioria dos trabalhos das espécies do género *Hypericum*, as culturas *in vitro* foram realizadas com o objectivo principal de obter a produção de tecido caloso ou o estabelecimento de suspensões celulares e, posteriormente, produtos secundários com princípios activos e não com o objectivo de micropropagação destas espécies. Para estas espécies do género *Hypericum* foram efectuadas culturas *in vitro* a partir de vários explantes (Zdunek et al., 1992, Kirakosyan et al., 2000 e Dias et al., 2000). Para algumas espécies, também foram já definidas as condições óptimas relativas à composição do meio de cultura e estudo das vias de biossíntese de metabolitos secundários (Dias et al., 2000). Também para algumas espécies do género *Hypericum* foi possível estabelecer a composição

adequada do meio de cultura para obtenção de tecido caloso, em larga escala, de modo a aumentar a quantidade de produtos sintetizados.

Relativamente à espécie deste trabalho, *Hypericum androsaemum* L., Dias et al. (2000) utilizaram como explantes segmentos de caule. As culturas *in vitro*, para iniciação e manutenção de tecido caloso, foram efectuadas em meio sólido MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo sacarose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ), suplementado com os reguladores de crescimento IAA ( $4,5 \text{ } \mu\text{M}$ ) e KIN ( $2,3 \text{ } \mu\text{M}$ ). No tecido caloso foram identificadas xantonas, compostos fenólicos sintetizados no metabolismo secundário. Estes compostos conforme já foi referido são os responsáveis pelas propriedades farmacológicas desta planta medicinal.

No entanto foram realizadas culturas *in vitro* em espécies deste género (*Hypericum canariense*, *Hypericum linarifolium*, *Hypericum brasiliense*, *Hypericum foliosum* e *Hypericum perforatum*) com o objectivo principal de micropropagação.

De realçar que, relativamente à espécie objecto do nosso estudo *Hypericum androsaemum*, não estão estabelecidas, tanto quanto é do nosso conhecimento, as condições para a sua propagação *in vitro*.

## 5. OBJECTIVOS

Para o nosso trabalho utilizou-se como objecto de estudo a espécie *Hypericum androsaemum* L., planta de relativa importância na aplicação terapêutica. Tal como referido anteriormente, foi possível extrair desta espécie compostos secundários com propriedades farmacológicas. O conhecimento da natureza química destes compostos e dos seus princípios activos foi possível através de culturas *in vitro* em que se obteve tecido caloso e células em suspensão. No entanto, não há estudos relativos a qualquer via de micropropagação desta espécie. Há referências relativas às culturas *in vitro* de micropropagação de *Hypericum* sp por organogénese directa ou indirecta, mas não há qualquer referência a micropropagação por embriogénese somática. A investigação e desenvolvimento de procedimentos de propagação *in vitro* são importantes na conservação de plantas medicinais como é o caso de *H. androsaemum* L. Assim, tornou-se necessário estudar, como objectivo principal, algumas vias de micropropagação que possibilitassem obter de um modo rápido e em larga escala

plantas desta espécie. Pretendeu-se ainda conhecer a adequação de meios de cultura para *H. androsaemum* L. e definir-se outros meios que proporcionassem melhores resultados. Estes dois objectivos tiveram como base estudos anteriores que permitiram definir as condições e meio de cultura próprios para a micropropagação de outras espécies do mesmo género *Hypericum*.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

## II. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as condições necessárias à realização do trabalho experimental, para a propagação *in vitro* da espécie em estudo *Hypericum androsaemum* L., foram disponibilizadas pela Unidade de Stress em Plantas do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC).

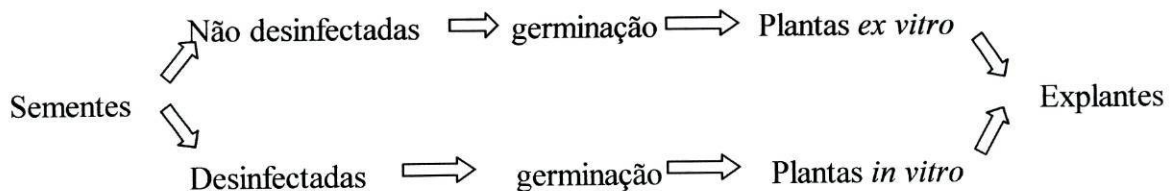
### 1. Material vegetal

O material vegetal foi obtido a partir de plantas resultantes da germinação de sementes de plantas adultas selvagens de *H. androsaemum*. A recolha das sementes foi feita no campo, em Setembro de 1999, na área do Parque Nacional da Peneda Gêres (PNPG), situado no Noroeste de Portugal e foi da responsabilidade dos serviços do Parque que, gentilmente, as enviou para o IBMC.

Para a obtenção de explantes, em condições assépticas, seguiram-se duas metodologias diferentes, como adiante se especificará.

De um modo resumido podemos dizer que:

- a germinação não foi precedida de qualquer desinfecção tendo-se, assim, obtido plantas *ex vitro*, das quais se faria mais tarde a selecção dos explantes de folhas e caules;
- a germinação foi precedida de uma desinfecção das sementes e as plantas que foram obtidas *in vitro* serviram, também, para seleccionar explantes de folhas e caules.



## **2. Procedimento experimental para a propagação *in vitro* da espécie *H. androsaemum* L.**

O método seguido no procedimento experimental para a cultura *in vitro* da espécie em estudo teve como base trabalhos anteriormente realizados e publicados para as espécies: *Hypericum canariense*, *Hypericum linarifolium*, *Hypericum brasiliense*, *Hypericum foliosum* e *Hypericum perforatum*.

### **2.1. Selecção de explantes**

#### **2.1.1. Obtenção e desinfecção de explantes a partir de sementes germinadas *ex vitro***

As sementes provenientes de plantas selvagens foram colocadas a germinar, em estufa, numa mistura de terra e húmus.

A partir de plantas jovens obtidas pela germinação de sementes seleccionaram-se explantes de caule e folha, de zonas mais jovens, ou seja, mais próximas do ápice.

O método utilizado na desinfecção da superfície do material vegetal foi o mencionado a seguir:

- imersão dos explantes, em etanol a 70% (v/v), durante 5 minutos com agitação;
- imersão, em hipoclorito de sódio a 20% (v/v), adicionado de 2 gotas de TritonX-100, durante aproximadamente 20 minutos e, igualmente, com agitação.

As etapas que se seguiram foram todas realizadas no interior da câmara de fluxo laminar e constaram de:

- retirar o hipoclorito de sódio dos frascos onde se tinham colocado os fragmentos de folha e caule, tendo o cuidado de tirar o excesso com uma pipeta de Pasteur;
- realizar lavagens em água destilada e desionizada, esterilizada, 4-5 vezes.

### **2.1.2. Obtenção de explantes a partir de sementes desinfectadas e germinadas *in vitro***

As sementes provenientes do PNPG foram também utilizadas para a obtenção de plantas *in vitro*. Estas plantas foram usadas, mais tarde, como fonte de explantes.

Para que se pudessem obter plantas livres de microrganismos, procedeu-se primeiro à desinfecção das sementes pela metodologia já referida anteriormente para a desinfecção de explantes.

Após a desinfecção das sementes, estas foram colocadas em meio de germinação. O meio de cultura usado teve como composição macronutrientes e micronutrientes do meio Murashige e Skoog (1962), abreviadamente designado por meio base MS. Este meio de cultura foi usado a meia força, suplementado com 1% de sacarose e com o regulador de crescimento, o ácido giberélico (GA) a 1 mg/L. Este ácido possibilitou a quebra da dormência das sementes. O pH do meio foi ajustado a 5,7-5,8, com uma solução de KOH 1M. O meio foi solidificado com 0,6 % de agar e distribuído por frascos de cultura e autoclavado a 121°C, durante 22 minutos.

Seguidamente, os frascos foram levados para a câmara de fluxo laminar tendo-se procedido, então, à inoculação das sementes desinfectadas.

Os frascos, já com as sementes, foram transferidos e colocados na câmara de crescimento nas condições de 25°C, um fotoperíodo de 16 horas e um fluxo fotónico de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , onde foram mantidos até as plântulas se desenvolverem e atingirem tamanho suficiente para se excisarem os explantes.

## **2.2. Iniciação e manutenção das culturas**

### **2.2.1. Excisão e isolamento dos explantes**

Para a iniciação das culturas foram utilizados explantes de folha e caule, inoculados em meio base de cultura MS/B5.

No primeiro caso, o limbo da folha, após a remoção da margem, foi seccionado em fragmentos com aproximadamente  $1-1,5 \text{ cm}^2$ .

No segundo caso, foram utilizados também como explantes segmentos de caule, das regiões internodais, com aproximadamente 1-1,5 cm de comprimento.

Os primeiros ensaios efectuados mostraram que, poucos dias após o início das culturas, os tecidos do explante apresentavam um tom acastanhado e sinais de necrose. Esta cor era devida à difusão de compostos fenólicos para o meio de cultura. Estes compostos que foram exsudados para o meio pelas células do explante, em quantidade elevada, fizeram com que os próprios explantes e o meio de cultura se tornassem escuros.

Para ultrapassar este problema procedeu-se, antes da inoculação, ao tratamento dos explantes com uma solução de anti-oxidantes constituída por cisteína, ácido ascórbico e PVP (Polivinilpirrolidona) (Tabela I).

**Tabela I – Constituição da solução de antioxidantes**

Constituinte químico	Quantidade
Cisteína	0,492 g/L
Ácido ascórbico	0,488 g/L
PVP	0,500 g/L

Os explantes em imersão na solução anti-oxidante foram colocados num agitador durante um período de tempo de 3 horas. De seguida retirou-se a solução anti-oxidante e os explantes foram cultivados em meio de cultura estéril. Nos explantes, obtidos a partir de folhas, houve o cuidado de manter a parte abaxial da folha em contacto com o meio. Em ambos os explantes, de folha e caule, quando se colocaram no meio de cultura foi exercida uma ligeira pressão para melhorar o contacto com o meio.

Posteriormente, este pré-tratamento dos explantes foi substituído pela incorporação no próprio meio de cultura de um anti-oxidante, o ácido ascórbico na concentração de 5,0 mg/L.

## 2.2.2. Composição dos meios de cultura

Para dar início às culturas *in vitro* foi seleccionado, como meio base, o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), relativamente aos macro e micronutrientes e o meio B5 de Gamborg (1968), relativamente às vitaminas, passando a designar o meio de cultura, por meio MS/B5 (Tabela II). Este meio base foi suplementado com sacarose a 3%.

**Tabela II – Composição básica do meio nutritivo**

### 1. Meio de Murashige e Skoog, 1962 (meio MS), modificado

<b>Macronutrientes</b>	<b>(mg/dm<sup>3</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000
KNO <sub>3</sub>	1900,000
CaCl <sub>2</sub>	332,000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000
<b>Micronutrientes</b>	<b>(mg/dm<sup>3</sup>)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,600
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Fe-EDTA	40,000
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,025
KI	0,830

### 2. Meio de Gamborg, 1968 (B5)

<b>Hidrato de carbono</b>	<b>(mg/dm<sup>3</sup>)</b>
Mio-inositol	100,000
<b>Vitaminas</b>	<b>(mg/dm<sup>3</sup>)</b>
Ácido nicotínico	1,000
Piridoxina-HCL	1,000
Tiamina-HCL	10,000

Para a iniciação das culturas, manutenção e para a regeneração de plântulas foram ensaiados diferentes meios de cultura que diferiram no tipo e na concentração dos reguladores de crescimento.

Inicialmente começaram por ser testados seis meios de cultura (H1 a H6) (Tabela III).

**Tabela III – Reguladores de crescimento usados inicialmente**

Meios	Regulador de crescimento (mg/L)			
	Auxina		Citocinina	
	2,4-D	NAA	BA	KIN
<b>H1</b>		0,5	1,0	
<b>H2</b>		0,1	1,0	
<b>H3</b>	1,0			
<b>H4</b>	2,0			
<b>H5</b>	1,0			1,0
<b>H6</b>	1,0		1,0	

Posteriormente, foram testados outros meios de cultura com os mesmos reguladores utilizados anteriormente, mas em diferentes concentrações. A tabela IV inclui os seis primeiros meios testados bem como os restantes meios testados.

**Tabela IV – Reguladores de crescimento em todas as concentrações usadas**

Meio	Regulador de crescimento			
	Auxina		Citocinina	
	2,4-D	NAA	BA	KIN
H3	1,0			
H4	2,0			
H9	3,0			
H20	1,0			0,1
H24	0,1			1,0
H21	0,5			1,0
H5	1,0			1,0
H27	2,0			1,0
H23	0,1		1,0	
H26	0,5		1,0	
H6	1,0		1,0	
H25	2,0		1,0	
H2		0,1	1,0	
H1		0,5	1,0	
H7		1,0	1,0	
H8		2,0	1,0	
H16		0,2	0,5	
H15		0,3	0,5	
H17		0,5	0,5	
H19		0,1		1,0
H22		0,3		1,0
H10		0,5		1,0
H18		1,0		0,5

Depois de efectuada a preparação dos meios o pH foi ajustado entre os 5,7-5,8 com uma solução de KOH. Os meios foram solidificados com 0,6% (p/v) de agar. Procedeu-se à distribuição dos meios de cultura por tubos de vidro Sigma, com 20

mL de meio por tubo, tapados com rolhas plásticas próprias. Procedeu-se, então, à autoclavagem dos meios a 121°C, para esterilização, durante 22 minutos.

### 2.3. Método para iniciação das culturas

No interior da câmara de fluxo laminar, procedeu-se à inoculação dos explantes, nos meios de cultura, anteriormente preparados. As culturas foram mantidas à temperatura de 25° C, fotoperíodo de 16 horas e um fluxo fotónico de densidade 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Periodicamente, as culturas foram observadas à lupa e foram registadas as modificações nas culturas e a sua evolução.

Os explantes que:

- começaram a apresentar zonas de contaminação ou de necrose foram rejeitados;
- deram origem a tecido caloso foram posteriormente subcultivados, com intervalos de 4-5 semanas.

### 2.4. Condições de subcultura de Tecido Caloso

O tecido caloso desenvolvido a partir dos explantes iniciais, encontrava-se já em fase de multiplicação e foi subcultivado em meio fresco, com composição idêntica à do meio base de indução, para possibilitar a multiplicação.

Depois da 2ª subcultura, as inoculações passaram a ser realizadas em frascos de vidro, com 40 mL de meio de cultura, tapados com um filme transparente, com um disco filtro de 0,02  $\mu\text{m}$  (Sigma).

As subculturas tiveram como objectivos:

- manter o tecido caloso, obtido por multiplicação, em meio de composição idêntica à do meio de indução, ou seja, meio base MS/B5 suplementado com reguladores de crescimento, nas mesmas condições iniciais;
- obter regeneração de plântulas, por organogénese ou embriogénese. O tecido caloso foi transferido para o meio base MS/B5 e suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento iniciais e diferentes tipos de reguladores.

Estas culturas foram mantidas, na câmara de crescimento, nas mesmas condições iniciais de luz, fotoperíodo de 16 horas, enquanto que outras foram colocadas em condições de obscuridade, para avaliar o efeito de fotoperíodo no processo de propagação.

Foram, também, efectuadas culturas em meio líquido utilizando tecido caloso já estabilizado e com aspecto friável, proveniente de culturas anteriores. As culturas em meio líquido foram mantidas num agitador, a 120 rpm, na câmara de crescimento nas condições anteriormente referidas. O meio de cultura foi o meio MS/B5, líquido, suplementado com diferentes reguladores de crescimento ou sem qualquer regulador de crescimento.

Em alguns dos meios testados, desenvolveu-se tecido caloso onde se distinguiram formações globulares com aspecto morfológico semelhante ao de embriões somáticos. Na tentativa de conseguir a maturação destas estruturas, estas foram transferidas para o mesmo meio mas suplementado com ácido absicico (ABA), ou para meio idêntico, mas com macro e micronutrientes a meia força e sacarose a 1% (10 g/L). Este regulador de crescimento é termolábil pelo que a sua adição ao meio só se pode efectuar depois deste se encontrar já esterilizado, por autoclavagem, e após o seu arrefecimento. O ABA foi adicionado ao meio esterilizado, por microfiltração, usando um filtro esterilizado Millipore, com poros de 0,45 µm de diâmetro.

### **3. Condições de cultura para indução de gomos axilares em segmentos nodais**

Os explantes foram excisados de plantas obtidas *in vitro* por germinação de sementes. Na câmara de fluxo laminar foram, assim, excisados segmentos nodais com 20 mm de comprimento e com 2 gomos axilares, junto dos quais se cortaram as folhas ficando apenas uma pequena parte do limbo ligado ao pecíolo.

O meio de cultura utilizado foi o MS/B5 suplementado com sacarose a 3% (30 g/l) e com o regulador de crescimento BA, em diferentes concentrações (Tabela V). O pH do meio foi ajustado a 5,7-5,8. O meio foi solidificado com 0,6% de agar e autoclavado a 121°C.

**Tabela V – Diferentes concentrações do BA**

Concentrações (mg/L)				
BA	1,0	0,5	0,2	0,1

Os segmentos nodais foram inoculados nos meios atrás referidos, em frascos, com 40 mL de meio, tapados com um filme transparente, com um filtro de 0,02  $\mu\text{m}$ . De seguida os frascos foram levados para a câmara de crescimento e foram mantidos nas condições já mencionadas.

### 3.1. Desenvolvimento dos rebentos axilares e seu enraizamento

O aparecimento de gomos axilares que se desenvolveram originando estruturas caulinares, nos quatro meios testados com BA (0,1, 0,2, 0,5 e 1,0 mg/L), verificou-se passadas 2-3 semanas de cultura. A seguir às 4-5 semanas, os rebentos caulinares, já com folhas, foram transferidos para meio de enraizamento constituído pelo mesmo meio base e suplementado com IBA, 0,2 mg/L. Após a indução das raízes, as plântulas foram retiradas do meio sólido e lavadas em água corrente para retirar restos de agar que ainda pudessem estar agarrados. As plântulas foram colocadas em “flutuadores” e mantidas em meio líquido MS/B5, suplementado com IBA, a 0,2 mg/L distribuído por frascos de vidro tapados com filme transparente e mantidos na câmara de crescimento, de modo a possibilitar o desenvolvimento de raízes e um maior crescimento das plântulas. Quando estas apresentavam um desenvolvimento razoável, foram retiradas do meio líquido e transferidas para vasos com uma mistura de terra e húmus e com lã de vidro.

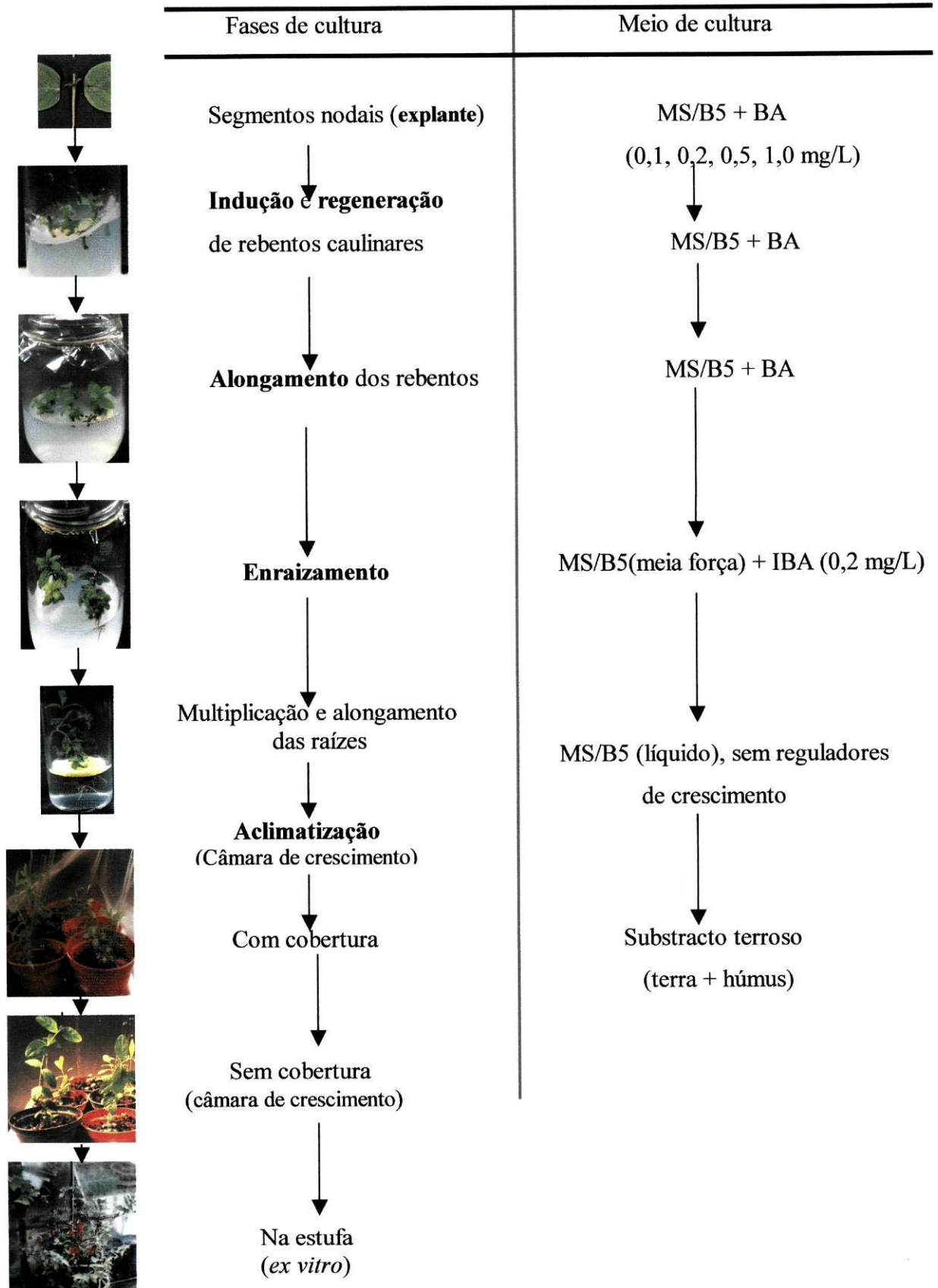
### 3.2. Aclimatização

As plântulas formadas e já com raízes foram, então, transferidas para vasos com terra adicionada de húmus e com tiras de lã de vidro que partem das raízes e

ultrapassam os furos dos vasos situados na parte inferior destes. Este procedimento possibilita uma melhor absorção da água. Procedeu-se à colocação dos vasos num tabuleiro que se tapou com plástico transparente, grosso, para diminuir a desidratação por transpiração. Os tabuleiros com os vasos foram colocados na câmara de crescimento, nas condições referidas inicialmente e eram, diariamente, mantidos com água para evitar a rega directa da terra dos vasos. O plástico dos tabuleiros foi sendo levantado progressivamente até acabar por ser retirado totalmente. Quando as plantas já apresentavam um tamanho razoável foram transferidas para uma estufa até mostrarem um certo vigor e poderem ser colocadas em condições *ex vitro*.

De seguida é apresentada uma representação esquemática (Figura 7) que resume o procedimento usado em *Hypericum androsaemum* L., quando foram usados os explantes de segmentos de caule com nódulos individualizados e sem folhas.

**Figura 7** – Representação esquemática do procedimento executado em *Hypericum androsaemum* L., na indução e regeneração de rebentos caulinares. Explantes: segmentos de caule com nódulos e sem folhas



# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Propagação *in vitro* de *Hypericum androsaemum*

O objectivo inicial do trabalho foi a micropropagação da planta medicinal *Hypericum androsaemum*, quer por organogénese, quer por embriogénese, directa ou indirecta, como já foi referido. Assim, numa primeira fase deste trabalho, procedeu-se à realização de vários ensaios e os resultados não foram satisfatórios. Nos trinta e dois meios testados só foi possível a obtenção de tecido caloso ou de tecido caloso em quantidade a desprezar, com excepção de dois meios. No entanto, os resultados da organogénese indirecta possíveis de observar em dois dos meios testados, H2 (0,1 mg/L NAA + 1,0 mg/L BA) (Figura 8) e H23 (0,1 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BA) (Figura 9), foram pouco significativos. Os meios de cultura cuja obtenção de tecido caloso foi muito baixa foram logo colocados de lado. Dentro da primeira fase do trabalho foram consideradas duas subdivisões. Numa subfase inicial foram testados os primeiros seis meios de cultura (H1 a H6), de acordo com o referido em material e métodos. Foram utilizados explantes de folha (Figura 10) e de caule, provenientes de plantas crescidas no campo. Posteriormente, numa segunda subfase foram utilizados e testados quer os seis primeiros meios, quer os restantes meios de cultura. Nesta segunda subfase, foram também usados explantes de folha e de caule (Figura 11), mas agora de plântulas obtidas por germinação de sementes *in vitro* (Figura 12). Os resultados desta primeira fase, que englobam todos os meios testados, com explantes de plantas crescidas no campo e de plântulas crescidas *in vitro*, são aqui apresentados e sintetizados em duas tabelas (tabela III e IV).

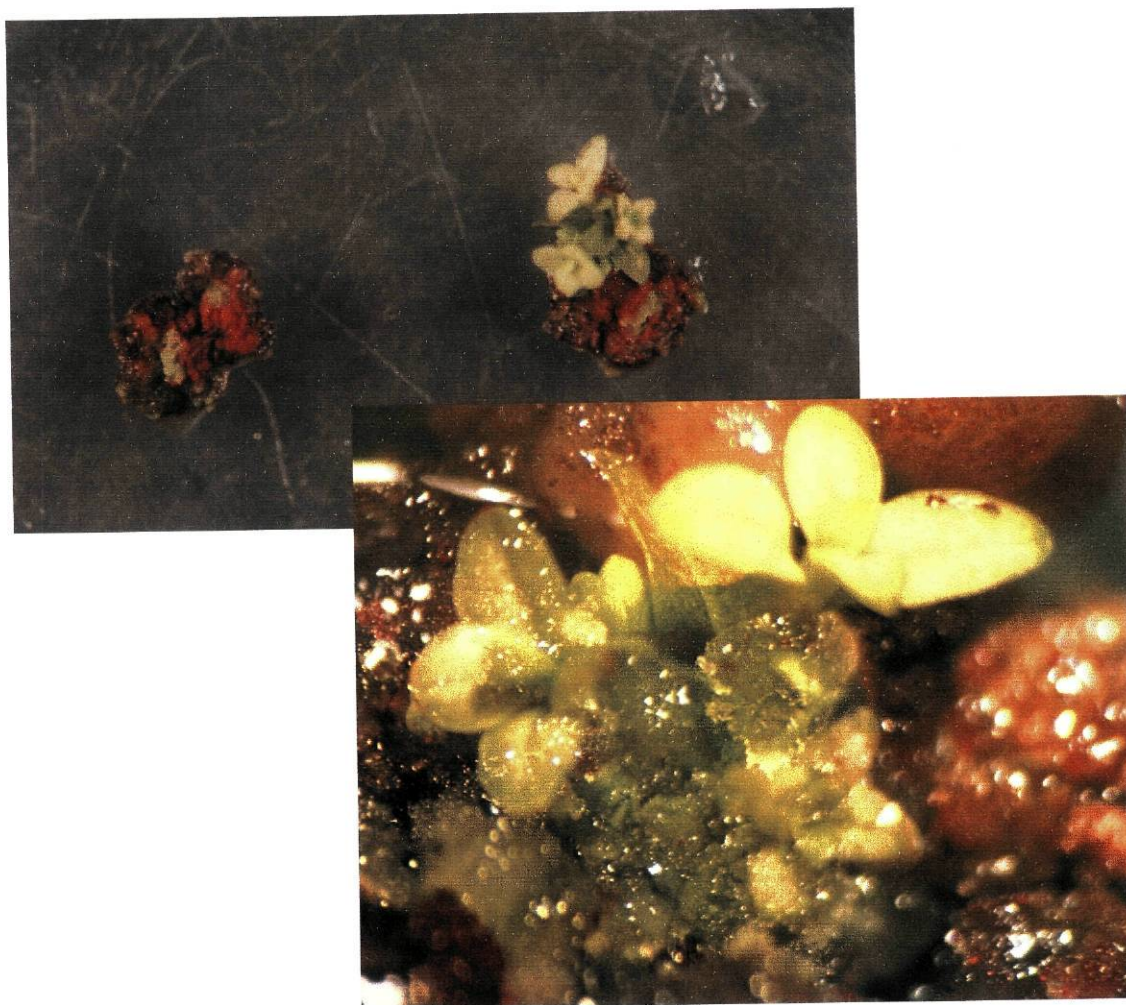
Numa segunda fase deste mesmo trabalho, os resultados referem-se aos ensaios realizados com o meio base MS/B5, suplementado só com uma citocinina. Os explantes utilizados foram segmentos de caule com nódulos individualizados, sem folhas, obtidos a partir de plântulas crescidas *in vitro*. Os resultados apresentaram-se positivos uma vez que foi possível observar não só a regeneração de rebentos caulinares, como também constatar que o período de tempo, em que ocorreu a regeneração, foi curto.

Em *Hypericum androsaemum*, os resultados obtidos, por germinação de sementes desinfectadas, mostraram que a viabilidade das sementes foi elevada, pelo menos durante o primeiro ano de utilização.

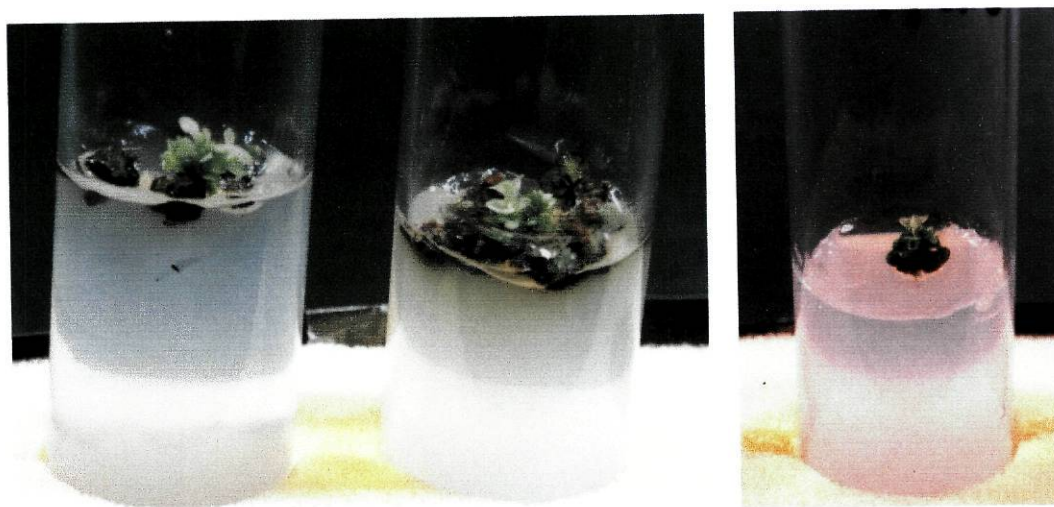
Os resultados com explantes, de folha e de caule, obtidos a partir de plantas de *Hypericum androsaemum* provenientes do campo mostraram algum insucesso. O método utilizado na desinfeção dos explantes foi a esterilização superficial e a contaminação observada foi elevada, principalmente por fungos, apresentando também necroses frequentes. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos em *Hypericum foliosum* (Moura, 1998). Por outro lado, nos explantes de plantas do campo de *Hypericum androsaemum*, que foram mergulhados numa solução aquosa de anti-oxidantes, antes da sua inoculação *in vitro*, foi possível observar alguma contaminação tal como o verificado por Mederos (1991), em *Hypericum canariense*. Este autor refere que os pré-tratamentos dos explantes, em condições anaeróbias por imersão em solução de anti-oxidantes, foram prejudiciais para a cultura *in vitro* desses mesmos explantes. Em contrapartida, os explantes de plântulas obtidas de *Hypericum androsaemum*, por germinação de sementes desinfectadas e que não foram sujeitos a pré-tratamentos em solução de anti-oxidantes, mostraram uma contaminação nula ou muito reduzida. Os resultados negativos observados nos explantes cultivados em meio MS/B5, suplementado com os reguladores de crescimento e sem a adição ao meio do ácido ascórbico, usado como anti-oxidante, foram devidos ao acastanhamento não só do meio como também dos explantes, provocado pela libertação de compostos fenólicos. No entanto, os resultados passaram a ser positivos quando foi adicionado o ácido ascórbico ao meio de cultura. O acastanhamento anteriormente observado deixou assim, de ser visível devido à eliminação de compostos exsudados que se difundiam no próprio meio de cultura contribuindo também para o aparecimento de necroses nos explantes. Mederos (1991) tinha já referido no seu trabalho que, em *Hypericum canariense* e noutras espécies, o acastanhamento do meio de cultura era prejudicial para o estabelecimento e desenvolvimento do material vegetal.

Em face dos resultados anteriormente obtidos, optamos então, por utilizar apenas explantes de plântulas desenvolvidas *in vitro* (figura 11) e as culturas dos explantes bem como as do tecido caloso passaram a ser efectuadas sempre em meio suplementado com ácido ascórbico. Os resultados, daqui em diante, passaram a ser significativamente melhores do que os anteriores no que se refere a infecções e ao

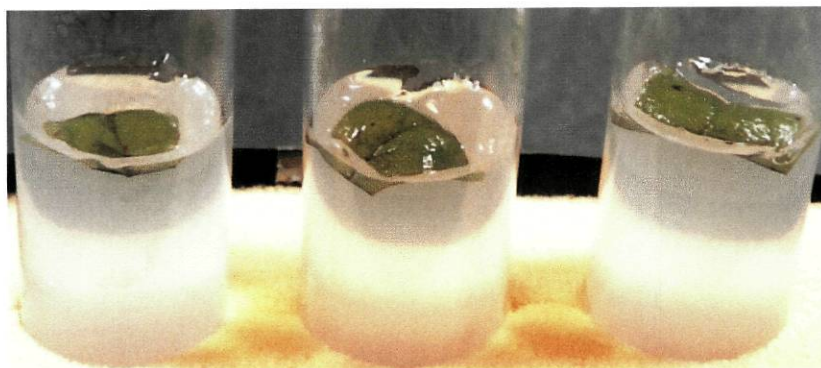
mecanismo de oxidação que passaram a valores baixos ou praticamente nulos. Foram assim atingidos os objectivos de melhorar as condições de cultura.



**Figura 8** – Aspecto do tecido caloso com pequenos rebentos em meio H2 (x12; x24).



**Figura 9** –Aspecto dos rebentos regenerados indirectamente em meio H23.



**Figura 10** – Explantes de folhas de plantas do campo inoculados em meio de cultura MS/B5, com diferentes reguladores de crescimento em diferentes concentrações.



**Figura 11** – Explantes, de folha e caule, obtidos de plântulas *in vitro*.



**Figura 12** – Plântulas obtidas por germinação de sementes *in vitro*.

## 1. Culturas *in vitro* de fragmentos de folha e caule

O uso de explantes livres de agentes patogénicos é essencial na cultura *in vitro*.

Os resultados já antes referidos mostraram que, nas culturas *in vitro*, é possível a eliminação de contaminações dos explantes, provocadas por fungos e/ou bactérias bem como do irradiar do acastanhamento do meio de cultura e dos explantes, provocado pelos exsudados fenólicos que se tornam oxidantes.

### 1.1. Indução e proliferação de tecido caloso

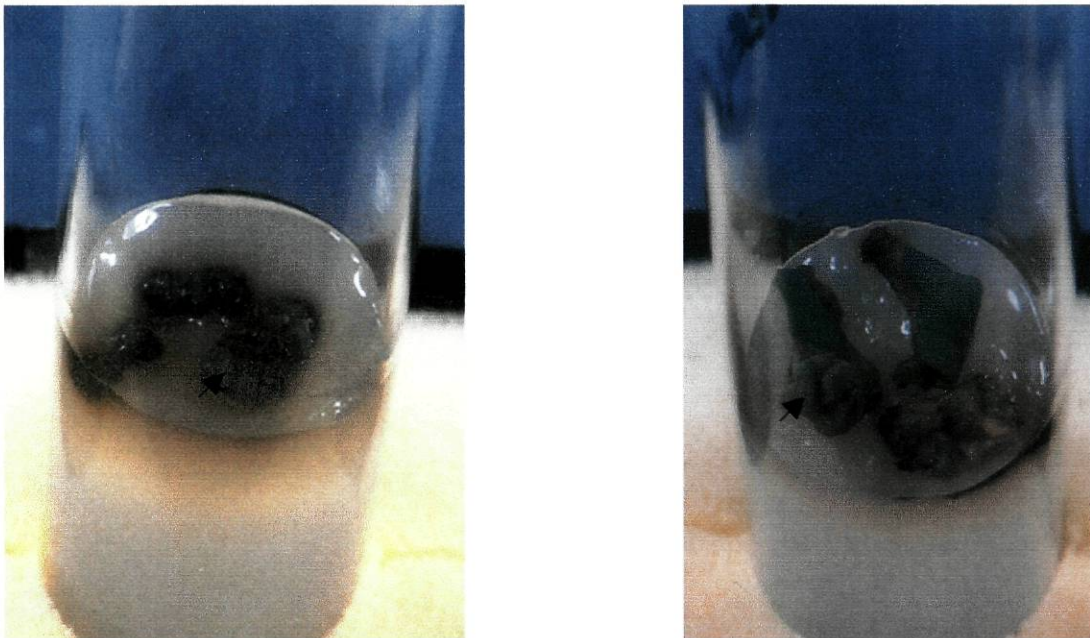
Poucas espécies, dentro do género *Hypericum*, têm sido usadas para produzir tecido caloso. A produção deste tecido tem a vantagem de permitir a entrada num ciclo de vida com potencial virtualmente ilimitado tendo, no entanto, a desvantagem de aumentar a probabilidade do aparecimento de variações somaclonais (Rani e Raina, 2000).

A indução de tecido caloso verificou-se após a inoculação de explantes de caules e de folhas cultivadas assépticamente em diferentes meios de cultura. Esta indução realizou-se, inicialmente e preferencialmente, nas zonas de corte (figura 13), mas ao longo das subculturas houve proliferação de tecido caloso em todo o explante (figura 14) principalmente nas zonas que se encontravam em contacto com o meio de cultura. Em *Hypericum androsaemum*, comparando o tempo necessário à indução de tecido caloso verificou-se que esta foi mais rápida nos explantes de caule do que nos explantes de folha.

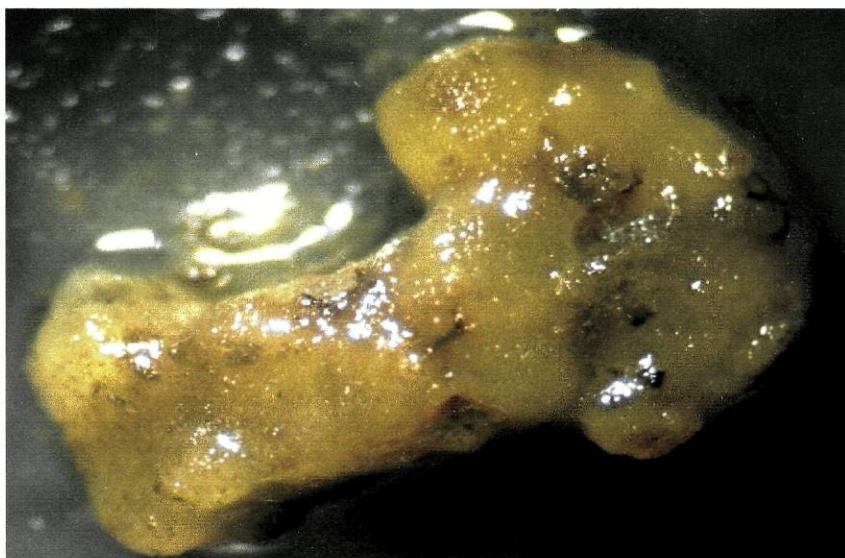
Os resultados relativos à cor, bem como a qualidade e a quantidade de tecido caloso, variaram em função do tipo e da concentração relativa dos reguladores de crescimento suplementados ao meio MS/B5, com o estado físico do meio e com as condições de luz/obscuridade. Esta variação nos resultados foram também referidos por outros autores relativamente à espécie *Hypericum androsaemum* (Peters et al., 1998; Schmidt et al., 2000a,b; Dias et al., 2000; Ahmed et al., 2001) e relativamente a outras espécies do género *Hypericum* (Santos et al., 1993; Cardoso e Oliveira, 1996; Dias et al., 1998; Dias et al., 1999; Preto e Santarém, 2000).

A indução de tecido caloso, em *Hypericum androsaemum*, ocorreu três semanas após a inoculação dos explantes em todos os meios de cultura referidos na tabela III

e IV. Nos meios H2 (0,1 mg/L de NAA+1,0 mg/L de BA), H3 (1,0 mg/L 2,4-D) e H4 (2,0 mg/L de 2,4-D) a produção de tecido caloso foi mais tardia verificando-se o seu aparecimento 4-5 semanas após a iniciação da cultura. Os resultados mostraram ter havido também manifestação de algumas necroses no meio H2 (0,1 mg/L de NAA+1,0 mg/L de BA) tendo sido observadas, estas necroses, também no meio H16 (0,2 mg/L de NAA + 0,5 mg/L de BA) e no meio H23 (0,1 mg/L de 2,4-D + 1,0 mg/L de BA). Podemos dizer, nesta altura, que a resposta, a qualidade e a quantidade de tecido caloso resultante depende do tipo de regulador(es) usado(s) bem como da sua concentração.



**Figura 13** – Explantes de caule e de folha. Indução de tecido caloso em zonas de corte ( ➤ )



**Figura 14** - Proliferação de tecido caloso em todo o explante (x16,8).

**Tabela VI** – Síntese dos resultados obtidos, na produção *in vitro* de tecido caloso, em *Hypericum androsaemum*, no meio base testado MS/B5, suplementado com NAA e BA ou NAA e KIN.

Meios	Reguladores de crescimento (mg/L)			Resultados
	NAA	BA	KIN	
<b>H2</b>	0,1	1,0		<ul style="list-style-type: none"> <li>- folhas oxidadas e volumosas</li> <li>- desenvolvimento de pouco tecido caloso</li> <li>- tecido acastanhado com algumas zonas de necrose</li> <li>- aparecimento de pequenos rebentos</li> <li>- tecido caloso verde e translúcido globular</li> </ul>
<b>H1</b>	0,5	1,0		<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso verde e transparente</li> <li>- algum tecido caloso com pigmentos vermelhos</li> <li>- tecido caloso esbranquiçado</li> <li>- tecido caloso com redução da cor verde</li> <li>- tecido caloso amarelo e globular</li> <li>- tecido caloso mais friável, na obscuridade</li> <li>- formações globulares</li> </ul>
<b>H7</b>	1,0	1,0		<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso verde</li> <li>- formações globulares verdes</li> <li>- aparecimento de células vermelhas</li> </ul>
<b>H8</b>	2,0	1,0		<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso verde</li> <li>- aparecimento de células vermelhas</li> <li>- proliferação de tecido caloso branco, amarelo e vermelho</li> <li>- aparecimento de massas brancas</li> <li>- aparecimento de formações globulares pequenas e translúcidas</li> </ul>
<b>H16</b>	0,2	0,5		<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso verde e translúcido</li> <li>- algumas necroses</li> </ul>
<b>H15</b>	0,3	0,5		<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso verde e translúcido</li> <li>- tecido caloso com pigmentos vermelhos</li> </ul>
<b>H17</b>	0,5	0,5		<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso verde e translúcido</li> </ul>
<b>H19</b>	0,1		1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso verde</li> <li>- proliferação de raízes com pêlos</li> </ul>
<b>H22</b>	0,3		1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso verde e vermelho</li> <li>- proliferação de raízes</li> </ul>
<b>H10</b>	0,5		1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso verde, acastanhado e avermelhado</li> <li>- proliferação raízes com pêlos</li> <li>- aparecimento de formações globulares pequenas e translúcidas</li> </ul>
<b>H18</b>	1,0		0,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso verde</li> <li>- proliferação de raízes com pêlos</li> <li>- aparecimento de formações globulares de cor vermelha</li> </ul>

**Tabela VII** – Síntese dos resultados obtidos nos meios testados com 2,4-D, isoladamente ou adicionado a BA ou a KIN

Meios	Reguladores de crescimento (mg/L)			Resultados
	2,4-D	BA	KIN	
H3	1,0			<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso verde</li> <li>- tecido caloso amarelado globular</li> <li>- algum tecido caloso avermelhado</li> <li>- indícios de nódulos com pêlos radiculares</li> <li>- na obscuridade, aspecto globular (sem tecido verde)</li> </ul>
H4	2,0			<ul style="list-style-type: none"> <li>- baixa produção de tecido caloso</li> <li>- algumas necroses</li> <li>- tecido caloso amarelado</li> <li>- tecido caloso globular e gelatinoso, na obscuridade</li> <li>- tecido caloso globular, pouco gelatinoso, à luz</li> </ul>
H9	3,0			<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso amarelado</li> <li>- tecido caloso avermelhado</li> <li>- tecido caloso friável (na obscuridade)</li> </ul>
H23	0,1	1,0		<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso verde</li> <li>- algumas zonas necrosadas</li> <li>- aparecimento de rebentos com pequenas folhas</li> </ul>
H26	0,5	1,0		<ul style="list-style-type: none"> <li>- meio com muitas necroses</li> </ul>
H6	1,0	1,0		<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso translúcido</li> <li>- algum tecido vermelho</li> <li>- formações de pequenas formações globulares</li> </ul>
H21	0,5		1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação elevada de tecido caloso verde</li> <li>- tecido caloso vermelho, globular</li> </ul>
H20	1,0		0,1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pouco tecido caloso, só nas extremidades dos caules</li> <li>- tecido caloso verde</li> </ul>
H5	1,0		1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido caloso verde</li> <li>- tecido caloso translúcido</li> <li>- formações globulares vermelhas, com pêlos radiculares</li> </ul>
H27	2,0		1,0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- proliferação de tecido caloso vermelho e friável, na parte superior do tecido</li> <li>- tecido caloso leitoso, na zona de contacto com o meio</li> <li>- tecido caloso amarelado</li> </ul>

Da observação da tabela VI podemos dizer que, nos meios que foram suplementados com NAA e BA, em diferentes concentrações, os resultados apresentaram algumas diferenças. Os resultados no meio H2 (0,1 mg/L de NAA + 1,0 mg/L de BA) mostraram o aparecimento de tecido caloso acastanhado evidenciando algumas necroses mas posteriormente, nas subculturas, passou a apresentar uma tonalidade verde, com formações globulares (Figura 15). Ocasionalmente, no tecido caloso desenvolvido em meio com 0,1 mg/L de NAA conjuntamente com 1,0 mg/L de BA (H2) observou-se a indução de pequenos rebentos, já anteriormente referido. No entanto, em *Hypericum linarifolium*, no meio com a mesma composição de H2, Santos e colaboradores (1993) mostraram que os explantes de caule e de folha, levavam ao aparecimento de organogênese directa. No meio H1, o tecido caloso obtido apresentou uma proliferação significativa de tecido caloso com aspecto verde e porções com aspecto translúcido (Figura 16). Nas subculturas efectuadas em meio fresco, com a mesma composição inicial, observaram-se modificações que levaram ao aparecimento de tecido caloso de cor vermelha, com formações globulares. Em meio H7, o tecido caloso formado apresentou um aspecto verde (Figura 17) e no meio H8, o tecido caloso apresentou também a cor verde, mas a quantidade deste tecido formado foi mais elevada e mostrou um aspecto leitoso em algumas porções (Figura 18). Após a realização das subculturas neste meio o tecido caloso passou a apresentar diversas tonalidades desde o vermelho, verde, branco e amarelado.

No meio H16, os resultados mostraram um tecido caloso de cor verde e translúcido, com algumas necroses enquanto que no meio H15 verificou-se uma proliferação elevada de tecido caloso de cor acentuadamente verde, com porções translúcidas e vermelhas (Figura 19). No meio H17 (Figura 20), o tecido caloso produzido foi quantitativamente e qualitativamente semelhante ao do meio H16. Perante estes resultados, na generalidade dos meios suplementados com NAA e com BA, a quantidade de tecido caloso foi sempre significativa mostrando também, pelo menos inicialmente, uma tonalidade verde (tabela III). Nas sucessivas subculturas, o tecido caloso passou a apresentar um aspecto heterogénio, contendo áreas densas e compactas, com porções com tonalidade acastanhada, avermelhada e amarelada.

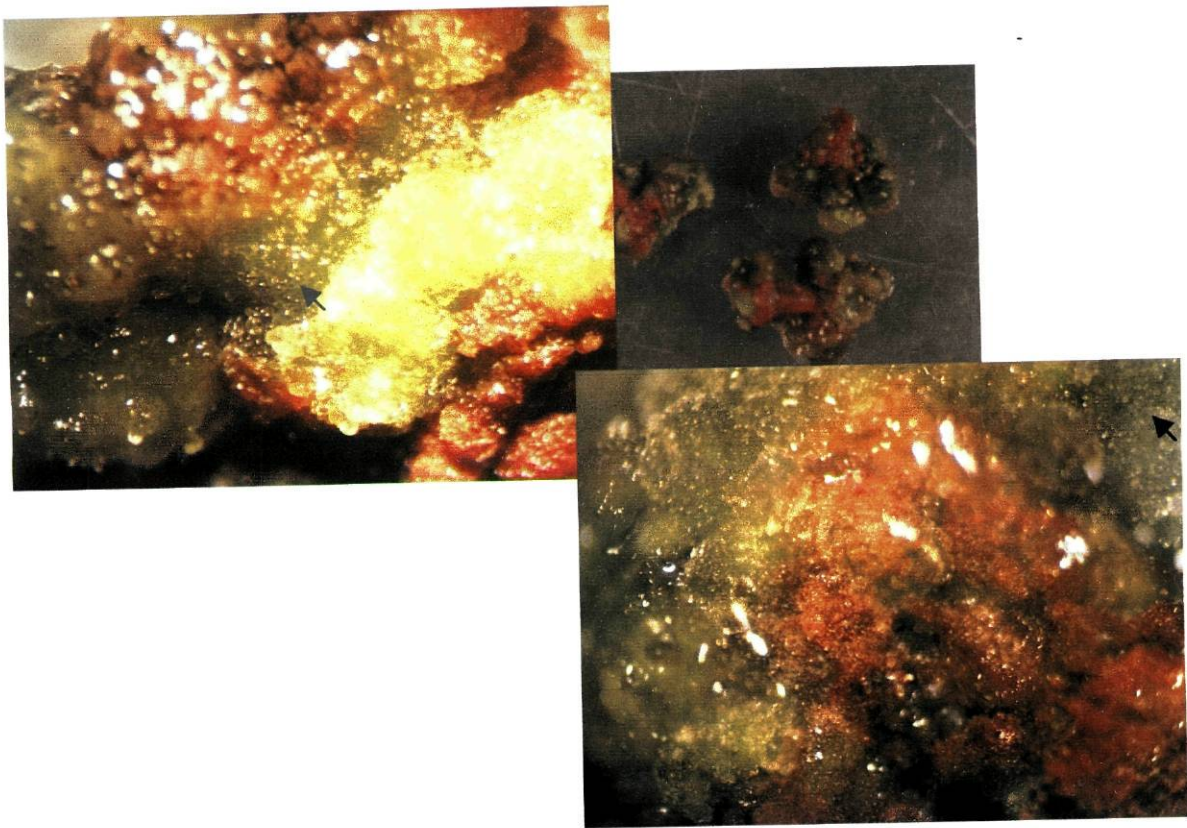


Figura 15 – Aspecto do tecido caloso em meio H2, verde (↖) e translúcido (↗).

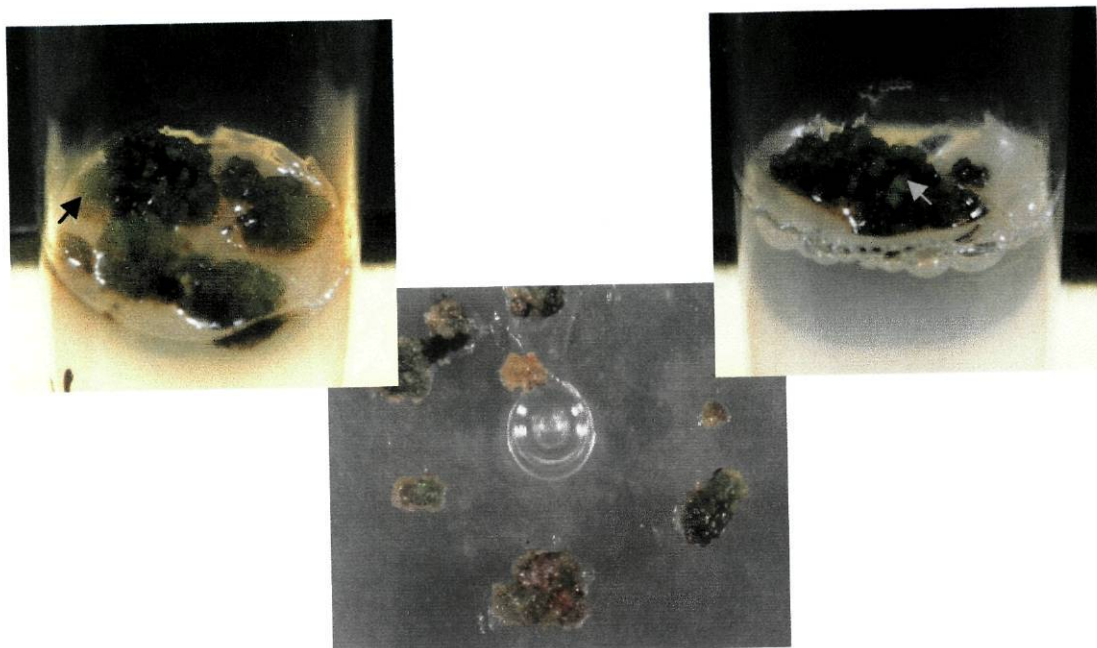


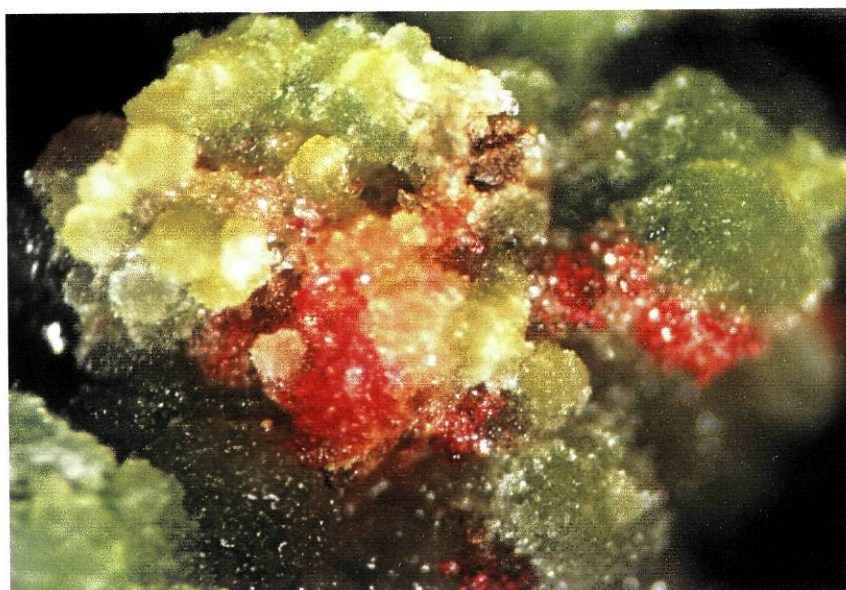
Figura 16 – Tecido caloso, em meio H1. Cor verde e translúcida (↑), com formações globulares (↘) (x9,5).



**Figura 17** – Aspecto do tecido caloso em meio H7 (x21).



**Figura 18** – Aspecto do tecido caloso em meio H8 (x21).



**Figura 19** – Aspecto do tecido caloso em meio H15 (x21).

Concentrações baixas de NAA (0,1 e 0,2 mg/L) levaram ao aparecimento de algumas áreas necrosadas.

Aumentando a concentração de NAA, 0,5 e 1,0 mg/L, deixou de se verificar o aparecimento de rebentos e aumentou a produção de tecido caloso. Contrariamente, em *Hypericum brasiliense* (Cardoso e Oliveira, 1996) e em *Hypericum perforatum* (Bütter et al., 1994), uma concentração de 1,0 mg/L de NAA, levou à indução de rebentos e não à indução de tecido caloso.

Ainda relativamente à tabela III, nos meios em que houve substituição da BA por KIN, os resultados apresentaram diferenças pouco significativas relativamente à quantidade e qualidade de tecido caloso. No meio H19, os resultados mostraram uma proliferação elevada de tecido caloso verde e também uma proliferação elevada de raízes com pêlos enquanto que no meio H22, a produção de tecido caloso foi menor apresentando cor verde e cor vermelha, mas também se observou a formação de algumas raízes (Figura 21). No meio H10 o tecido caloso produzido apresentou a cor verde mas posteriormente observaram-se pigmentos com cor variada, desde o acastanhado ao avermelhado. Também foi possível verificar que houve proliferação de raízes com pêlos assim como o aparecimento de pequenas formações globulares de aparência translúcida (Figura 22). No meio H18, o tecido caloso apresentou a cor verde (Figura 23). No entanto, voltou também a haver proliferação de raízes com pêlos e o aparecimento de pequenas formações globulares igualmente de aspecto translúcido. Também Dias et al. (2000) referem que neste meio após a 3ª subcultura, o tecido caloso mostra áreas de diferente pigmentação, bem como o desenvolvimento de primórdios radiculares.

Assim, em todos meios com NAA e KIN (tabela III), verificou-se rizogénese e produção de tecido caloso com características semelhantes, uma vez que predominou a cor verde.

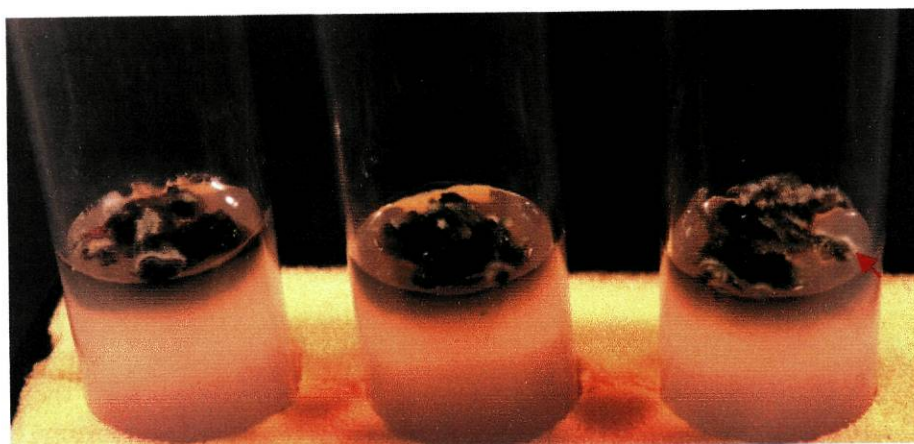
Da análise dos resultados da Tabela III, apenas num dos meios testados (0,1 mg/L de NAA + 1,0 mg/L de BA) é que se verificou a formação pouco significativa de rebentos. Isto permite dizer que tanto a auxina NAA adicionada à citocinina, BA ou à KIN, não são os reguladores de crescimento mais adequados à organogénese independentemente das concentrações utilizadas.

Dias e colaboradores (2000) referiram que em *Hypericum androsaemum* o crescimento do tecido caloso em meio suplementado com 1,0 mg/L de NAA e 0,5 mg/L de KIN levava à produção elevada de produtos metabólicos secundários,

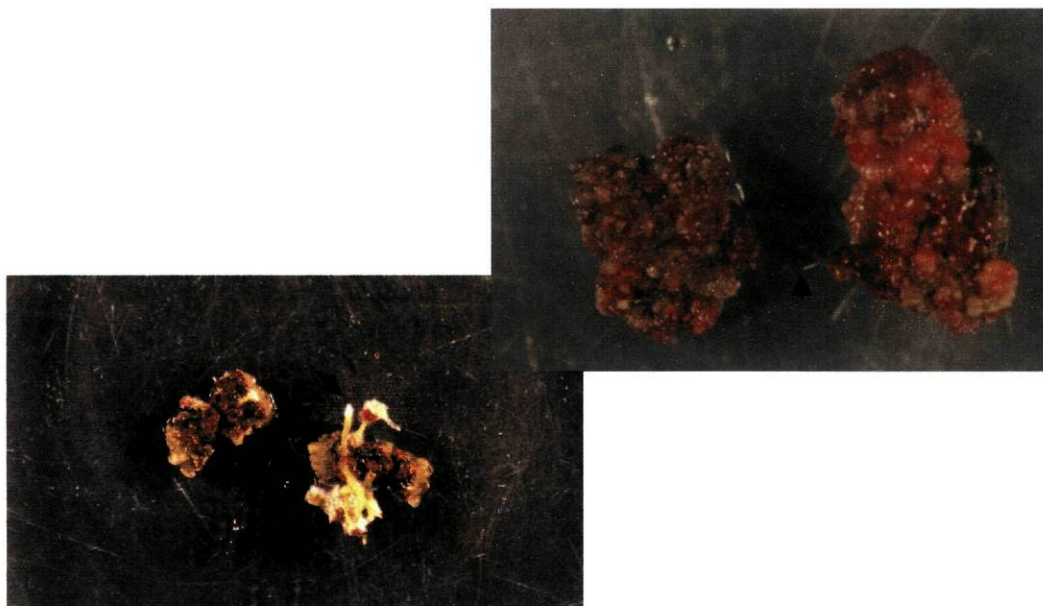
como por exemplo, xantonas. Estes compostos fenólicos poderiam alterar a normalidade da morfogênese nesta planta ao ficarem oxidados em contacto com alguns constituintes do meio de cultura (Benson, 2000), como por exemplo, o FeEDTA. Para evitar a oxidação dos explantes utilizou-se, como já foi referido, o ácido ascórbico mas em pequenas concentrações. Dever-se-ão realizar trabalhos futuros com aumentos graduais deste antioxidante, uma vez que o ácido ascórbico além ter funções antioxidantes também promoveu a organogênese em tecido caloso de tabaco (Joy et al, 1988). É de realçar, ainda, que na maior parte dos ensaios, a utilização de KIN induziu tecido caloso com uma tonalidade avermelhada enquanto que a utilização de BA induz tecido caloso verde e só após várias subculturas o tecido caloso adquiriu uma tonalidade vermelha. A diferença de cor no tecido caloso obtido sugere que a citocinina KIN alterou o tipo de pigmentos produzidos no tecido caloso.



**Figura 20** – Aspecto do tecidocaloso em meio H17 (x21).



**Figura 21** – Aspecto do tecido caloso em meio H22 com formação de raízes (↖).



**Figura 22** – Aspecto do tecido caloso em meio H10, com raízes (▲) (x9,5; x12).

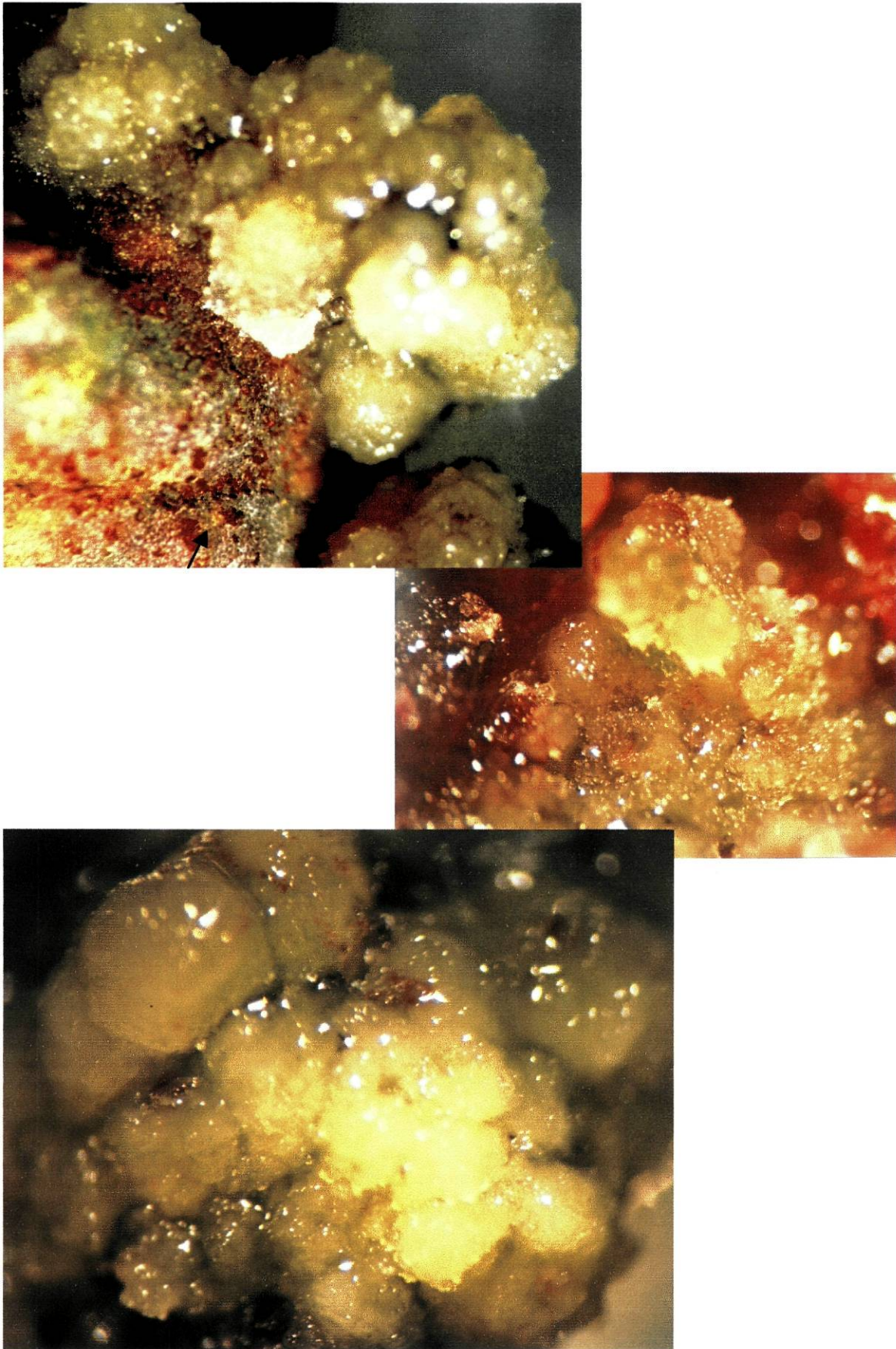


**Figura 23** – Aspecto do tecido caloso em meio H18, com formações globulares vermelhas (▼) (x28).

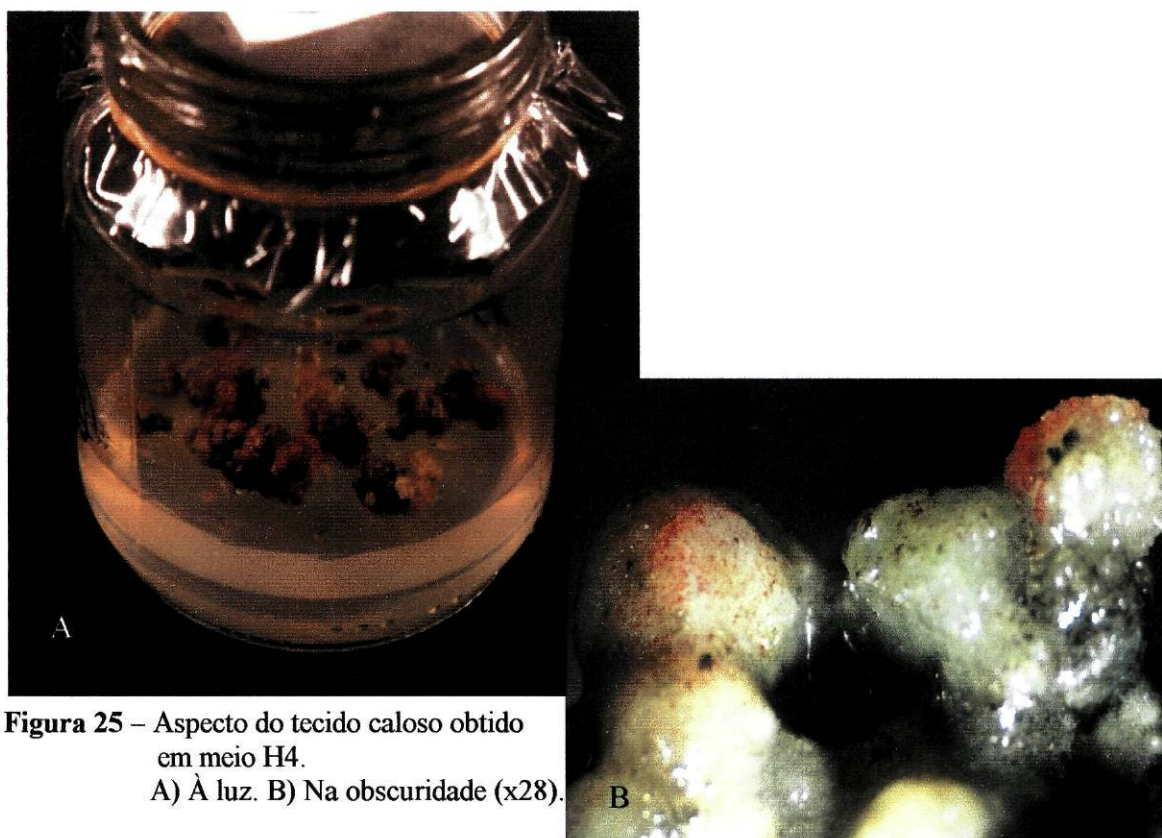
Os resultados registados na tabela VII referem-se aos meios em que houve substituição da NAA por 2,4-D, isoladamente ou adicionada à BA ou à KIN. Nestes meios testados verificou-se indução de tecido caloso e formação de pequenos rebentos unicamente no meio H23.

Nos meios em que se utilizou só a auxina 2,4-D (H3, H4 e H9), os resultados mostraram que, quando foram utilizadas as concentrações 1,0, 2,0 e 3,0 mg/L, houve só formação de tecido caloso. Este tecido, em meio H3, mostrou a cor amarelada e translúcida no início e, posteriormente nas subculturas realizadas em meio fresco, mostraram porções de cor avermelhada e formações globulares bem evidentes (Figura 24). No meio H4 foi possível observar algumas necroses (Figura 25 A). No meio H9, o tecido caloso apresentou um aspecto globular com cor vermelho escuro e acastanhado (Figura 26). Nestes três meios, só com 2,4-D, a indução de tecido caloso mostrou-se tardia. Quando foram efectuadas subculturas de tecido caloso, na obscuridade, os resultados mostraram a produção de tecido caloso friável (Figura 25 B). Estes resultados contrariam, em parte, os obtidos na cultura de explantes de folha de *Hypericum perforatum*. Nesta espécie, na presença de 2,4-D como único regulador de crescimento, não se verificou a formação de tecido caloso, mas sim necroses nos explantes após a 3<sup>a</sup>.semana de cultura (Pretto e Santarém, 2000). No entanto, em *Hypericum androsaemum*, também foram observadas algumas necroses em H2 apesar de ter havido produção de tecido caloso e de rebentos ocasionais. Os resultados obtidos em culturas de *Hypericum brasiliense* (Cardoso e Oliveira, 1996) mostraram que o tecido caloso produzido em meio MS ou B5 suplementado só com 2,4-D, a 1,0 e 2,0 mg/L, apresentava uma cor acastanhada e friável, aspecto semelhante ao obtido em *Hypericum androsaemum* mas com 3,0 mg/L de 2,4-D.

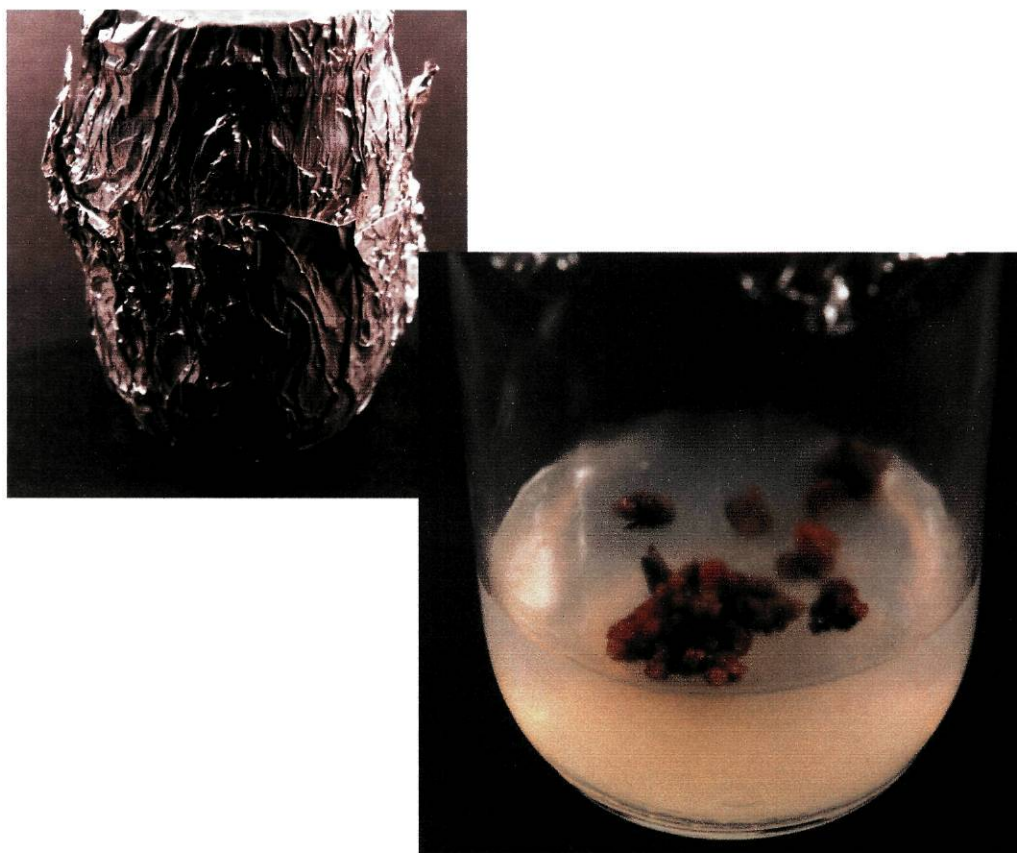
Nos meios com 2,4-D adicionado à BA os resultados obtidos são relativamente satisfatórios uma vez que houve formação de rebentos, com pequenas folhas (Figura 9), no meio H23 quando se utilizou uma concentração baixa de 0,1 mg/L de 2,4-D adicionado a 1,0 mg/L de BA. No entanto foram visíveis, neste meio H23, a formação de porções com áreas necrosadas no tecido caloso envolvente que não apresentava qualquer aspecto friável. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em *Hypericum perforatum* dado que Pretto e Santarém (2000) tinham também obtido a indução de tecido caloso no meio suplementado com dois



**Figura 24** – Aspecto do tecido caloso em meio H3, btido em explante de folha ( ✪  
(x24).



**Figura 25** – Aspecto do tecido caloso obtido em meio H4.  
A) À luz. B) Na obscuridade (x28).



**Figura 26** – Aspecto do tecido caloso friável em meio H9, obtido na obscuridade.

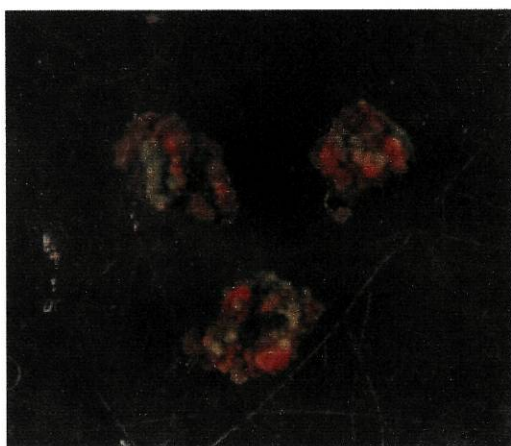
reguladores 2,4-D (0,1 mg/L) + BA (1,0 mg/L). Observaram-se, igualmente, áreas de necrose, quer na presença da luz quer na obscuridade.

O tecido caloso induzido em meio H6, com 1,0 mg/L de 2,4-D e 1,0 mg/L de BA, mostrou-se, após as subculturas, translúcido e de cor vermelha (Figura 27). Nos casos em que se prolongou o tempo de cultura verificou-se o aparecimento de formações semelhantes a ápices caulinares, as quais não se desenvolveram. Na obscuridade, o tecido caloso obtido também se mostrou mais friável tal como o observado em *Hypericum perforatum* no mesmo meio.

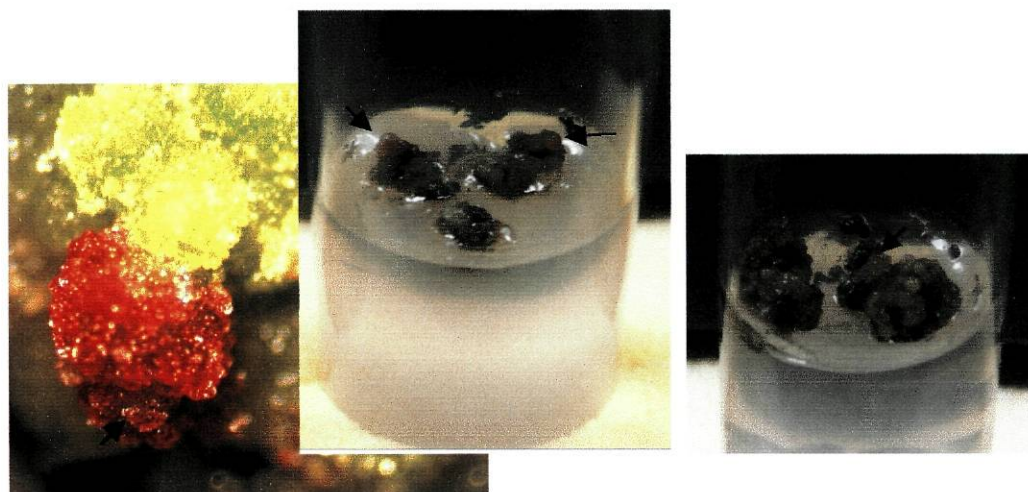
No meio H21, com 0,5 mg/L de 2,4-D e 1,0 mg/L de KIN, em substituição de BA, os resultados mostraram uma produção elevada de tecido caloso de cor verde, vermelha e com formações globulares (Figura 28), enquanto que o meio H20, quando se utilizaram concentrações de 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,1 mg/L de KIN, só houve produção de tecido caloso verde e em quantidade baixa. O tecido caloso obtido em meio H5, 1,0 mg/L de 2,4-D e 1,0 mg/L de KIN, apresentou-se translúcido e com nódulos avermelhados, após a 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> subcultura (Figura 29). Nas subculturas seguintes o tecido caloso passou a apresentar, quase na totalidade, a cor vermelha com pequenas porções de tecido transparente. Esta porção transparente apresentava um aspecto mais indiferenciado enquanto que as porções vermelhas evidenciavam formações com aspecto globular. Na obscuridade, o tecido caloso em meio H5 passou a mostrar-se friável. Também os resultados, em *Hypericum linarifolium*, no meio suplementado com 1,0 mg/L tanto de 2,4-D como de KIN ou com 1,0 mg/L de 2,4-D e 2,0 mg/L de KIN (não testado neste trabalho), levou à indução de tecido caloso friável, mas não conduziu à organogénese (Santos et al, 1993). Os resultados em H27, com 2,0 mg/L de 2,4-D e 1,0 mg/L de KIN, mostraram uma produção elevada de tecido caloso com aspecto vermelho e friável (Figura 30) na parte superior e de aspecto leitoso na parte inferior, quando as culturas foram colocadas na obscuridade. Também, em *Hypericum perforatum*, o meio suplementado com 2,4-D e KIN promoveu a formação de tecido caloso (Cellárová et al., 1992a). Perante os resultados obtidos, com as diferentes concentrações de 2,4-D e KIN, a concentração de KIN parece ter tido influência no tipo de tecido caloso produzido relativamente à quantidade, à cor e à diferenciação.



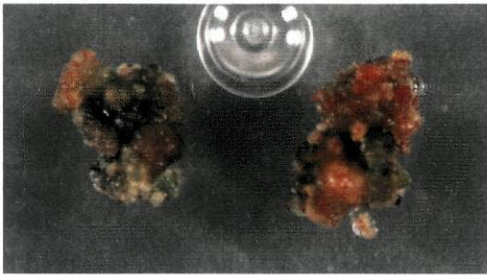
**Figura 27** – Aspecto do tecido caloso em meio H6 (x9,5; x14).



**Figura 28** – Aspecto do tecido caloso em meio H21 (x9,5).



**Figura 29** – Aspecto do tecido caloso em meio H5, com formações globulares pigmentadas de vermelho (↗) (x21).



**Figura 30** – Aspecto do tecido caloso em meio H27 (x9,5).

A análise dos resultados obtidos permite admitir que a BA parece ser responsável pelo aparecimento de rebentos, nos meios H23 e H2, quando associado ao 2,4-D (0,1 mg/L) ou ao NAA (0,1 mg/L), em baixas concentrações. Comparando com outras citocininas, a BA foi também considerada mais eficiente na indução de rebentos caulinares noutras espécies (Moura, 1998 e citações aí referidas). Por outro lado, os resultados em *Hypericum brasiliense* mostraram que o meio B5 ou MS, suplementados com auxinas e citocininas nas mesmas concentrações, davam lugar a um crescimento muito reduzido de tecido caloso, principalmente nas culturas mantidas na obscuridade. Nesta mesma espécie, os explantes inoculados em meio adicionado de 2,4-D e de KIN produziram pouco tecido caloso, mas abundante formação de raízes (Cardoso e Oliveira, 1996).

Os resultados foram diferentes nos meios em que se utilizou a concentração de 1,0 mg/L de KIN adicionado com 2,4-D, em substituição de NAA, uma vez que não houve rizogénese como nos ensaios anteriores (tabela III) tendo apenas havido a formação de tecido caloso. A produção de tecido caloso tanto pode ter sido influenciada pelas concentrações de 2,4-D, como pelas concentrações de KIN, dado que mostrou aspectos diferentes com porções de cor avermelhada e porções esverdeadas e com formações globulares bem evidentes. Com concentrações de 2,0 mg/L de 2,4-D, após as subculturas, foi produzido cada vez menos tecido caloso, acabando por aparecerem necroses. Com concentrações mais elevadas, 3,0 mg/L de 2,4-D, na obscuridade, houve formação de tecido caloso amarelado/acastanhado, friável e globular. Estas características também foram observadas em *H. perforatum* mas com o 2,4-D associado à KIN ou à BA (Pretto e Santarém, 2000), na obscuridade e em *H. brasiliense* em meios MS e B5 suplementados só com 2,4-D (0,5, 1,0 e 2,0 mg/L) é que foi possível obter tecido caloso, pois a adição de auxinas e de citocininas não permitiu o crescimento de

tecido caloso (Cardoso e Oliveira, 1996). Em *Hypericum androsaemum*, os resultados mostraram que quando se utilizou a citocinina BA, em substituição de KIN, adicionada quer a NAA quer a 2,4-D, houve proliferação de tecido caloso com cor verde e aparecimento de rebentos com pequenas folhas, especialmente, quando se utilizou concentrações baixas de auxinas, NAA ou 2,4-D, a 0,1 mg/L. Em *Hypericum perforatum* foi possível observar a formação de tecido caloso verde em meio suplementado com 2,4-D e BA ou KIN, mas só nas culturas realizadas à luz (Pretto e Santarém, 2000). Estes resultados mostram que, à semelhança do descrito para outras espécies, também as espécies de *Hypericum* apresentam uma resposta morfogenética diferente, usando o mesmo tipo e a mesma concentração de um dado regulador de crescimento ou usando dois reguladores diferentes simultaneamente, assim como fazendo variar as condições de luz ou de obscuridade.

A utilização de KIN, em vez de BA, conduziu à indução de tecido caloso de cor predominantemente avermelhada e com indução de raízes, principalmente quando associada ao NAA. Assim, parece que, para haver morfogénese, a melhor citocinina será o BA, em condições de luminosidade uma vez que Pretto e Santarém (2000) sugerem que o tratamento com luz não induz a produção de compostos fenólicos na espécie *Hypericum perforatum*, apresentando o tecido caloso a cor verde e compacto.

Relativamente às auxinas utilizadas, a 2,4-D levou à indução de tecido caloso friável, quando usada em concentrações altas e em condições de obscuridade, o que pode indicar que houve indícios de embriogénese. Os resultados obtidos quando se mudou este tecido friável para meio líquido mostraram um aumento mais significativo das estruturas globulares com formações ligeiramente alongadas.

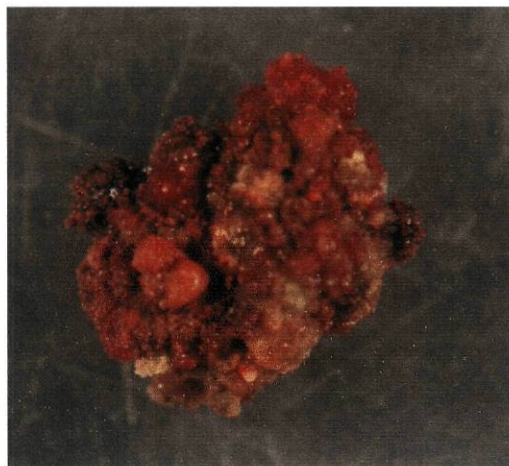
Perante os resultados gerais na espécie *Hypericum androsaemum* pode-se concluir que a formação de tecido caloso foi estimulada pelas duas auxinas testadas, 2,4-D e NAA, e que as citocininas, BA e KIN, levaram a comportamentos diferentes por parte dos explantes.

Os resultados com o meio base MS/B5, suplementado com os mesmos reguladores de crescimento e nas mesmas concentrações, mas testados tendo como variação agora a quantidade de sacarose que passou a ser utilizada a 20%, não foram satisfatórios de acordo com o objectivo principal do trabalho. No entanto,

não apresentaram diferenças significativas, relativamente à quantidade de sacarose inicialmente utilizada (30%), pelo que se considerou que a percentagem de sacarose não era importante na mudança de morfogénese. Estas percentagens diferentes de sacarose também foram testadas em *Hypericum brasiliense* mas não há referências a modificações verificadas na produção de tecido caloso (Cardoso e Oliveira, 1996).

Na tentativa de obter estruturas diferenciadas foram realizadas novas subculturas por transferência do tecido caloso obtido, para meios suplementados com outros reguladores de crescimento, com os mesmos reguladores mas com diferentes concentrações ou para meio sem reguladores de crescimento. Assim, o tecido caloso obtido em meio H1 (0,5 mg/L NAA + 1,0 mg/l BA) foi mudado para meio H3 (Figura 31) ou H4, só com 2,4-D (1,0 e 2,0 mg/L), durante alguns dias para ser sujeito a um choque de auxina e de seguida houve transferência para meio sem reguladores de crescimento, em condições de luz e de obscuridade. Os resultados mostraram-se negativos tendo continuado só a haver produção de tecido caloso com pigmentos vermelhos. No entanto, na situação de obscuridade, o tecido caloso passou a formar raízes, com pêlos radiculares. O tecido caloso obtido em meio H2 (0,1 mg/L NAA + 1,0 mg/l BA) foi mudado para meio H3 (Figura 32) ou para H4 (Figura 33), só com 2,4-D (1,0 e 2,0 mg/L) e houve um aumento da quantidade de tecido caloso de cor vermelha, mais friável (Figura 32) ou mais compacto (Figura 33). Os resultados, nesta mudança de meios, continuaram a dar negativos e a não se verificar organogénese indirecta. Na obscuridade, o número de estruturas radiculares aumentou. O tecido caloso obtido em meio H5 (1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L KIN) foi mudado também para meio H3 ou H4, só com 2,4-D (1,0 e 2,0 mg/L) e posteriormente procedeu-se à sua transferência para meio sem reguladores de crescimento, sólido e líquido. Nestas subculturas formaram-se dois grupos, tendo ficado um grupo ficado à luz e outro grupo na obscuridade. No grupo mantido na obscuridade, o tecido tornou-se mais friável do que o mantido à luz. No meio líquido, a observação dos resultados foi dificultada dado que este meio se tornava turvo, ao fim de 2-3 dias de cultura, pela libertação rápida, por parte do tecido caloso, de compostos metabólicos e não devido a uma possível infecção. Os resultados mostraram que o tecido caloso só se tornou mais globular. No entanto, na obscuridade, as formações globulares passaram a mostrar estruturas alongadas, mas sem pêlos, tendo o tecido ficado com um aspecto

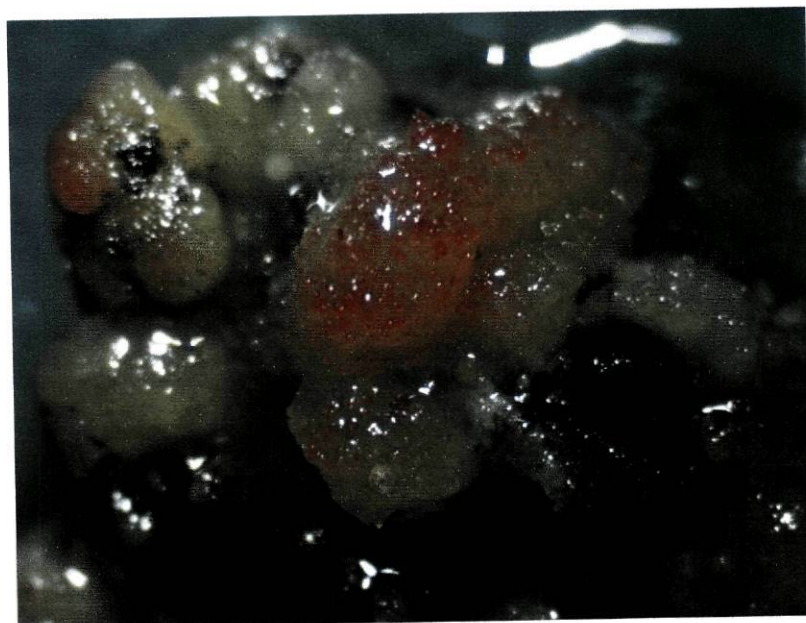
amarelado e esbranquiçado (Figura 34). O tecido caloso obtido em meio H6 (1,0 mg/L 2,4-D + 1,0 mg/L BA) foi mudado igualmente para meio H3 ou H4, sólido ou líquido e os resultados mostraram uma morfogênese idêntica ao do meio H5, quando mudado para os mesmos meios. Os resultados, durante as subculturas, com o tecido caloso transparente e avermelhado, mostraram a formação de estruturas globulares, de um modo mais rápido, no meio H3 relativamente ao meio H4. Neste último apareceram necroses frequentes durante a manutenção do tecido caloso. Também se mudou parte do tecido caloso obtido para meio líquido, sem reguladores de crescimento, o que resultou numa maior percentagem de formações globulares. Estas mostraram mais tarde, como resultado, a formação de raízes. No entanto, foi igualmente difícil continuar a obter resultados devido ao meio que ficou rapidamente turvo, devido à libertação de compostos metabólicos. O tecido caloso obtido nos meios H1, H5, H6, H7 e H8 foram mudados para meio com ABA mas os resultados mostraram necroses significativas o que levou a colocar de parte estes ensaios com este regulador de crescimento. Quando o tecido caloso foi transferido para meios com os mesmos reguladores de crescimento, mas em concentrações diferentes das iniciais, continuou a não se observar organogênese indirecta. Os resultados apenas mostraram algumas mudanças morfológicas no tecido caloso.



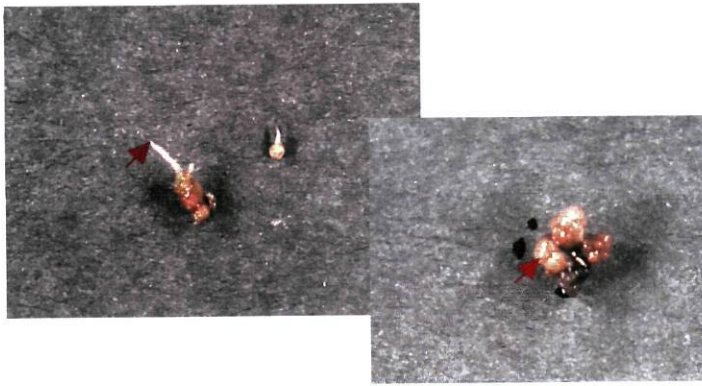
**Figura 31** - Aspecto do tecido caloso, induzido em meio H1, após transferência para meio H3 (x9,5).





**Figura 32** — Aspecto mais friável do tecido caloso, induzido em meio H2, após transferência para meio H3 (x28).



**Figura 33** — Aspecto mais compacto do tecido caloso, induzido em meio H2, após transferência para meio H4 (x24).



**Figura 34** – Aspecto do tecido caloso, por transferência do meio H5 para meio líquido sem reguladores de crescimento (cor esbranquiçada  e estruturas alongadas sem pêlos  (x9,5).

Em conclusão, os resultados obtidos com culturas de explantes de *Hypericum androsaemum*, nos vários meios testados nesta primeira fase, mostraram que o crescimento do tecido caloso e as suas características morfogenéticas, foram visivelmente influenciadas pelos reguladores de crescimento (Gaspar et al., 1996; Kevers et al., 1996). Também foi influenciado pelo factor luz/obscuridade, na medida em que apresentou um aspecto mais ou menos friável (Poutaraud et al., 2000). Logo, é atribuída grande importância aos factores que influenciam a produção de tecido caloso. A indução de tecido caloso, a sua proliferação bem como a sua manutenção é reconhecida como muito útil para o estudo da biossíntese e produção de compostos metabólicos secundários de interesse farmacológico. No entanto, como o objectivo principal era a multiplicação *in vitro* de *Hypericum androsaemum* todos os meios testados nesta parte do trabalho não se mostraram serem apropriados para tal.

Nesta altura podemos então dizer, que o *Hypericum androsaemum* é uma espécie que não respondeu positivamente aos tipos e às concentrações dos reguladores de crescimento utilizados (NAA, 2,4-D, BA, KIN e ABA). Parece ser evidente a recalcitrância *in vitro* deste material biológico, pela incapacidade dos tecidos responderem às manipulações realizadas nas culturas *in vitro*. Estas culturas são influenciadas principalmente por três factores: a fisiologia da planta dadora, as manipulações *in vitro* e o stress fisiológico da planta *in vitro* (Benson, 2000). Assim, é importante salientar que o ambiente de cultura, só por si, leva ao aparecimento de respostas de stress que por sua vez promovem o aparecimento de

problemas de recalcitrância (Benson, 2000). No que se refere à regeneração das plantas, a recalcitrância pode ser o maior factor limitativo para o uso biotecnológico das espécies com importância económica podendo também prejudicar a vasta aplicação das técnicas de conservação *in vitro* (Benson, 2000).

## 2. Cultura *in vitro* de segmentos de caule com nódulos

### 2.1. Proliferação de rebentos axilares

No método de cultura *in vitro*, usado agora nesta fase de regeneração de *Hypericum androsaemum*, foram utilizados, como explante, fragmentos de caule com nódulos individualizados e sem folhas (excisão do par de folhas) (Figura 35), em diferentes posições. Este método mostrou-se eficiente como forma de propagação desta planta.

Os explantes utilizados por Mederos (1991), em *Hypericum canariense*, foram, também, gomos axilares bem como gomos apicais. Em *Hypericum brasiliense* foram utilizados explantes idênticos, segmentos de caule com nódulos individualizados mas com folhas (Cardoso e Oliveira, 1996). Cardoso e Oliveira (1996) referem que, embora os ápices caulinares apresentem um potencial mais elevado de morfogénese do que os segmentos nodais, não são vulgarmente usados como explantes. O uso destes explantes, não apicais, é um modo de prevenir diferenças no desenvolvimento da planta devido ao equilíbrio diferencial das auxinas e das citocininas (Cardoso e Oliveira, 1996). Tamas (1987), escreveu vários trabalhos sobre a dominância apical, indicando que, a falta desta dominância apical, pode canalizar a citocinina disponível, principalmente para os gomos axilares, em detrimento do ápice, sendo assim implementado um desenvolvimento dos rebentos axilares em vez do crescimento do rebento principal. Também, de acordo com o mesmo autor, a acumulação de citocinina no gomo apical, devido a uma forte dominância apical, aumenta a produção, nesta estrutura, de auxinas endógenas que tem um efeito supressivo na caulogénese axilar. Explantes semelhantes ao usado em *H. androsaemum*, já tinham sido utilizados em *Hypericum foliosum* (Moura, 1998). Noutras espécies do género *Hypericum*, e com o mesmo objectivo principal deste trabalho, obter a regeneração de plantas, foram utilizados diferentes explantes. Assim, em *Hypericum linarifolium*, foram utilizados explantes de folha e caule (Santos et al., 1993). Em *Hypericum perforatum*, Cellárová et al. (1992a,b) utilizaram explantes excisados de plântulas, folhas excisadas, rebentos e raízes, Pretto e Santarém (2000) utilizaram explantes de folha, Kirakosyan et al. (2000) utilizaram explantes de anteras e Murch et al. (2000a) utilizaram explantes de

hipocótilo. Nestas espécies mencionadas a organogénese foi nuns casos directa e noutros foi indirecta.

Os resultados da segunda fase do trabalho, em *Hypericum androsaemum*, foram obtidos utilizando o mesmo meio base da primeira fase. Na indução e multiplicação de rebentos, o regulador de crescimento adicionado ao meio base foi a BA em diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,5 e 1,0 mg/L). De acordo com os nossos resultados, em *Hypericum androsaemum*, a BA, isolada, fornecida ao meio mostrou ser um regulador de crescimento eficiente para a diferenciação e proliferação de rebentos axilares. No entanto, o aumento na concentração de BA não teve um efeito inibidor na regeneração dos rebentos. O efeito estimulador da BA na organogénese de *de novo* rebentos, isto é, na formação de múltiplos rebentos caulinares já tinha sido referido em várias plantas medicinais, nomeadamente em *Hypericum canariense* (Mederos, 1991), *Hypericum perforatum* (Cellárová et al., 1992a,b) e *Hypericum foliosum* (Moura, 1998). Relativamente a outras plantas medicinais, a BA possui um efeito inibidor quando utilizada em concentrações superiores a um valor óptimo, verificando-se a redução do número de rebentos regenerados por nódulo (Raha e Roy, 2001).

Ao fim de uma semana de cultura, observou-se a indução de vários rebentos a partir dos nódulos (Figura 36), em número de 2-4 rebentos por nódulo. Para tornar possível a multiplicação dos rebentos, estes foram transferidos para frascos que continham o meio base inicial, fresco e suplementado com o mesmo regulador de crescimento, a BA. Os resultados desta subcultura, ao fim de três semanas, mostraram uma proliferação elevada do número de rebentos caulinares. Estas estruturas continuavam a não apresentar diferenças significativamente visíveis no seu aspecto geral (Figura 37).

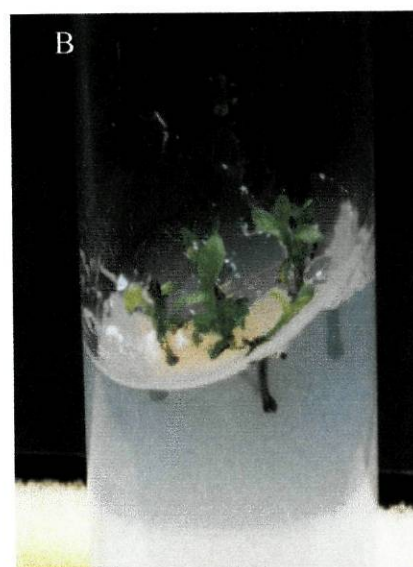
No fim desta subcultura formaram-se dois conjuntos de rebentos caulinares. Assim, os rebentos que apresentavam um desenvolvimento menor foram novamente transferidos para meio base fresco, com BA, e os outros rebentos mais desenvolvidos foram individualizados e transferidos para meio de enraizamento suplementado com IBA. No grupo transferido para meio com BA a taxa de multiplicação dos rebentos continuou a aumentar enquanto que no segundo grupo transferido para meio com IBA observou-se o aparecimento de raízes (Figura 38).

Os fragmentos de caule com um nódulo de *Hypericum androsaemum* mostraram que possuíam a capacidade de indução de rebentos na presença de BA e que esta

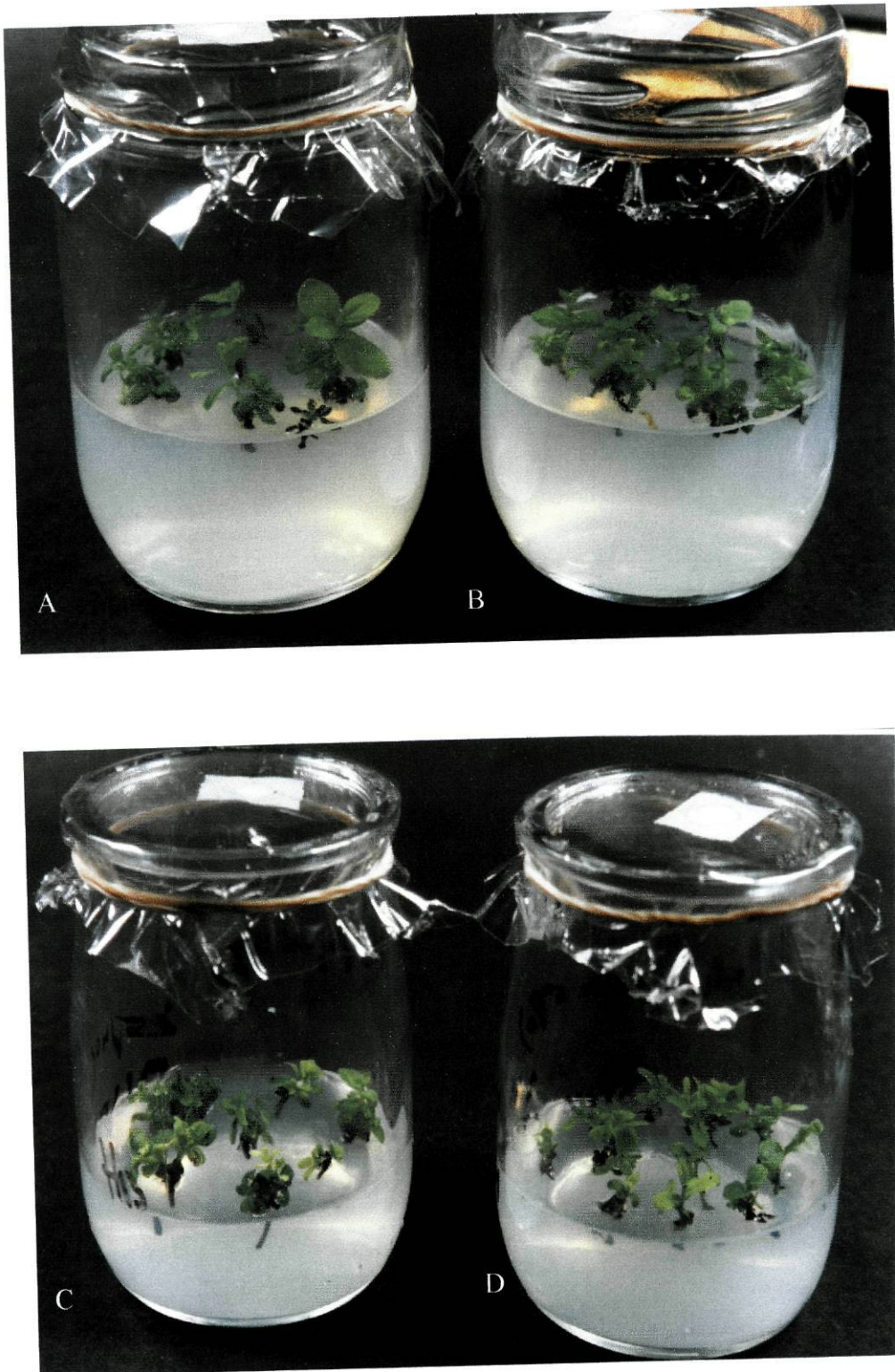
actuou como um regulador eficiente na iniciação e multiplicação desses mesmos rebentos.



**Figura 35** – Explantes. Fragmentos de caule com nódulos individualizados, sem folhas.



**Figura 36** –Rebentos caulinares de *Hypericum androsaemum*, induzidos em meio MS/B5 (2-3 semanas de cultura), suplementado com BA 0,1 mg/L (A), 0,2 mg/L (B), 0,5 mg/L (C) e 1,0 mg/L (D).



**Figura. 37** – Cultura de rebentos após 3 semanas da 1ª. subcultura, nos meios com 0,1 mg/L (A), 0,2 mg/L (B), 0,5 mg/L (C) e 1,0 mg/L (D) de BA.

Proliferação de agregados de rebentos caulinares com aspecto idêntico nos quatro meios.



**Figura 38** - Enraizamento de plântulas em meio base MS/B5. Meio sólido, a meia força, com sacarose a 2% e adicionado de IBA, na concentração de 0,2 mg/L. Neste meio verificou-se o alongamento das estruturas caulinares e a diferenciação de raízes, depois de decorridas 2 a 3 semanas de cultura.

As várias concentrações da BA, pelo menos as utilizadas em *H. androsaemum*, não pareceram afectar o sucesso da indução de rebentos axilares, uma vez que não foram detectadas diferenças relacionadas com a composição do meio para o processo de indução/iniciação e multiplicação. Em *Hypericum canariense* L., a proliferação *in vitro* dos rebentos caulinares foi conseguida em meio que continha as soluções de macronutrientes de Murashige e Skoog (MS, 1962). Este meio mostra ser o mais eficiente para a propagação desta espécie, suplementado com uma auxina (NAA) e com uma citocinina (BA) (Mederos, 1991). Na espécie *Hypericum erectum*, os gomos primordiais foram induzidos em meio suplementado com BA e IAA (Yasaki e Okuda, 1990). Do referido por Cellárová et al. (1992b) para *Hypericum perforatum*, concentrações elevadas de BA adicionadas a NAA não melhoraram os resultados obtidos. Na formação de rebentos desta mesma espécie, *H. perforatum*, a BA foi mais eficiente quando associada a IAA e quando foram usados explantes de plântulas às quais foram retiradas as raízes (Zdunek e Alfermann, 1992). Em *Hypericum foliosum*, Moura (1998) utilizou como meios a testar, os suplementados com o uso simultâneo de uma auxina e de uma citocinina ou só com uma citocinina. Os melhores resultados foram os obtidos no meio suplementado com NAA + BA seguidos do meio suplementado só com BA. Mais

uma vez é de salientar o papel positivo da BA, isolada ou adicionada a NAA, na quebra da dormência e multiplicação de rebentos axilares, em várias espécies de plantas (Pretto e Santarém, 2000). No entanto, para Moura (1998), um aumento da concentração de NAA no meio de cultura de *Hypericum foliosum*, provou na generalidade ser inversamente proporcional à diferenciação dos rebentos. O seu efeito inibidor foi unicamente contrabalançado pela adição de BA, na concentração de 1,0 mg/L. Mesmo com concentrações mais elevadas de BA, os resultados foram piores quando estava presente a NAA, 1,0 mg/L. O efeito inibidor de NAA foi mais tarde confirmado por uma total ausência de diferenciação dos rebentos em meios suplementados só com esta auxina (Moura, 1998). Os resultados obtidos com NAA, na fase de iniciação de *Hypericum foliosum* e, segundo a opinião da autora (Moura, 1998), só concordam parcialmente com a teoria de Skoog e Miller (1957). Segundo estes autores a formação de rebentos ou a formação de raízes está dependente da proporção entre os níveis de auxina/citocinina exógenos no meio de cultura. De acordo com os mesmos autores, a concentração relativamente alta de auxina irá promover a diferenciação da raiz e inibir o desenvolvimento dos rebentos. Os resultados com NAA, mesmo quando usados em baixas concentrações, sugerem a possibilidade da presença de um nível elevado de auxina endógena no material vegetal colhido no campo (Moura, 1998). Com 0,1 mg/L de BA parece não ser necessária uma fonte de auxina mas o mesmo já não se passa quando é adicionada 1,0 mg/L de BA. Em *Hypericum foliosum*, isto sugere a necessidade de um efeito compensatório a partir de uma fonte exógena, de auxina, que pode ser um sinal de uma dominância apical fraca nos rebentos produzidos *in vitro* (Moura, 1998).

Em *Hypericum brasiliense* a regeneração de rebentos foi conseguida em meio MS, sem reguladores de crescimento (Cardoso e Oliveira, 1996).

Os procedimentos que foram estabelecidos para a indução de rebentos e a multiplicação em espécies de *Hypericum* referiram uma média de 2 a 5,5 rebentos, dependendo do explante usado (Mederos et al., 1997; Moura, 1998), número comparável ao que obtivemos para *Hypericum androsaemum*. É de salientar também a diferença de sensibilidade que as espécies do género *Hypericum* mostram perante a manipulação das condições de cultura particularmente na utilização de reguladores de crescimento, relativamente ao tipo e concentração em que são usados.

A multiplicação dos rebentos, a partir de gomos axilares, foi considerado, por Mederos (1991), por Santos e colaboradores (1993), por Cardoso e Oliveira (1996),

por Moura (1998) e por Pretto e Santarém (2000), um sistema de micropropagação bastante aconselhável. Este método proporciona a obtenção de um número elevado de plantas, bem como uma produção rápida de plantas. A multiplicação e o enraizamento, de algumas espécies, podem ocorrer no mesmo meio o que facilita a utilização deste método.

## 2.2. Enraizamento de rebentos caulinares de *Hypericum androsaemum*

Dos agregados de rebentos caulinares de *Hypericum androsaemum* obtidos, após a 1ª subcultura, foram separados e individualizados os rebentos que apresentavam maior vigor. Posteriormente, foi feita a sua transferência para um meio novo, meio de enraizamento, com a composição base MS/B5, a meia força, sacarose a 2% e suplementado só com o regulador de crescimento IBA, na concentração de 0,2 mg/L. A citocinina IBA é, na generalidade, referenciada como um regulador de crescimento eficiente para a promoção de enraizamento *in vitro* (Selvakumar et al., 2001).

Decorridas 2-3 semanas, contadas a partir do início da 2ª subcultura, verificou-se um aumento em tamanho das estruturas caulinares e a indução de raízes, conforme se pode observar na Figura 36. O meio com IBA pode, assim, ser considerado um meio com eficiência no enraizamento considerando que o número total de rebentos produzidos por explante e transferidos formaram na generalidade raízes.

Comparando o nosso trabalho com os trabalhos realizados para o enraizamento de estruturas caulinares de outras espécies de *Hypericum*, verificamos que, à semelhança do descrito para *Hypericum androsaemum*, também o enraizamento em *Hypericum canariense* (Mederos, 1991) foi conseguido em meio com macronutrientes de MS, a meia força e com IBA. No entanto, este autor também verificou o efeito positivo de NAA no processo de enraizamento.

Resultados semelhantes foram descritos para o enraizamento de estruturas caulinares de *Hypericum linarifolium* (Santos et al., 1993), embora estas estruturas tivessem tido origem noutra tipo de explante.

O papel positivo de IBA no processo de enraizamento foi também demonstrado em *Hypericum perforatum*. Pretto e Santarém (2000) referiram que os rebentos caulinares obtidos a partir do tecido caloso foram enraizados em todos os meios

O papel positivo de IBA no processo de enraizamento foi também demonstrado em *Hypericum perforatum*. Pretto e Santarém (2000) referiram que os rebentos caulinares obtidos a partir do tecido caloso foram enraizados em todos os meios avaliados, embora as percentagens mais elevadas fossem obtidas em meio MS, a meia força, independentemente da presença ou não, de IBA. No entanto, uma redução ligeira na formação de raízes foi observada em meio MS, na ausência de IBA. A presença de IBA no meio de enraizamento, de *Hypericum perforatum*, parece ter tido efeito no número de raízes induzidas por rebento, tendo o número de raízes sido mais elevado, na presença deste regulador. As raízes induzidas em meio contendo IBA são mais espessas e mais ramificadas enquanto que as induzidas sem IBA são mais finas e mais longas.

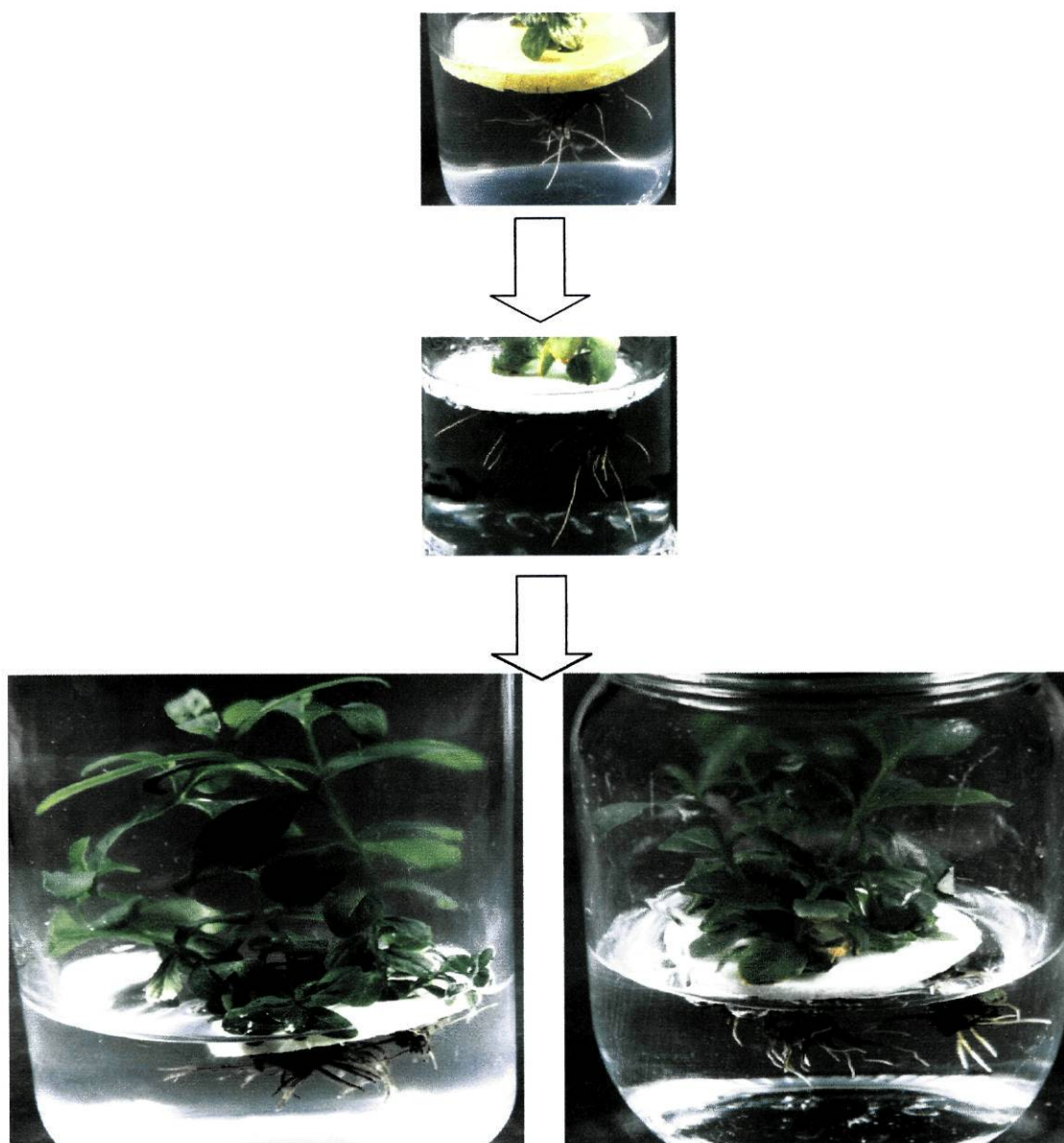
Pelo contrário, em *Hypericum foliosum* (Moura, 1998), o enraizamento não foi promovido pela adição de IBA nem de qualquer outro regulador de crescimento. A ausência de enraizamento para todos os reguladores de crescimento testados pode, segundo a autora, ser explicada pelo facto deste ser realizado em estruturas caulinares originadas a partir de explantes excisados de plantas estabelecidas no campo. Embora tenham sido usadas plantas, com um ciclo de crescimento como fonte preferida de explantes, o seu grau de diferenciação é mais elevado do que o das plântulas obtidas por germinação das sementes, aumentando, então, a dificuldade no enraizamento *in vitro*.

As plântulas com maior vigor, de *Hypericum androsaemum*, com raízes obtidas em meio sólido durante a 2<sup>a</sup>. subcultura foram transferidas para meio líquido MS/B5, sem reguladores de crescimento e sem sacarose. Esta transferência promoveu o crescimento e o desenvolvimento de raízes e assegurou, assim, uma elevada taxa de sobrevivência das plântulas após a sua transplantação.

As mesmas plântulas permaneceram neste meio líquido, cerca de 2-3 semanas, tendo sido possível observar durante este período de tempo o aumento de tamanho das estruturas caulinares e o desenvolvimento das raízes (Figura 39). Quando estas plântulas apresentaram, então, um tamanho e raízes suficientemente desenvolvidas, foram mudadas para um substrato terroso, constituído por uma mistura de terra com húmus. O impacto da transplantação teve sucesso uma vez que o desenvolvimento das plântulas continuou a realizar-se normalmente.

Em *Hypericum androsaemum* foi testado como meio de indução de raízes o meio MS, a meia força, suplementado com 0,2 mg/L de IBA, o qual se mostrou ser

eficiente. Entretanto, o crescimento e a multiplicação de raízes foi conseguido, positivamente, em meio líquido MS/B5, sem IBA e sem sacarose. De salientar que os segmentos nodais utilizados foram excisados a partir de plântulas jovens de *Hypericum androsaemum*, resultantes da germinação de sementes *in vitro*. Nestas plântulas o grau de diferenciação é relativamente baixo o que possivelmente tornou positivo o enraizamento promovido pelo IBA. Esta explicação tem como base o trabalho realizado com *Hypericum foliosum* (Moura, 1998), no qual foram usadas, como fonte de explantes, plantas estabelecidas no campo, já com um grau de diferenciação significativo o que segundo a autora e, como já foi referido, explica o efeito negativo do IBA e do NAA, no enraizamento.



**Figura 39** – Proliferação de raízes, em meio líquido MS/B5, sem reguladores de crescimento e sem sacarose. Notar o aumento do número e o engrossamento de raízes.

### 2.3. Transplante e aclimatização

As plântulas de *Hypericum androsaemum* desenvolvidas *in vitro* foram finalmente transferidas para condições *ex vitro*, sendo então, nesta etapa, plantadas em vasos com uma mistura de terra e de turfa. Depois de se ter procedido à transferência das plântulas para vasos, estes foram ainda mantidos na câmara de cultura, e debaixo de uma cobertura plástica (Figura 40). Deste modo, foi possível que a fase de aclimatização se processasse convenientemente proporcionando-se de forma gradual um aumento de intensidade luminosa e uma diminuição da humidade relativa e da temperatura. Observou-se que as plântulas tinham uma sobrevivência elevada desde que a terra se mantivesse com uma humidade relativamente elevada.

A sobrevivência das plântulas que entretanto continuaram a crescer, manteve-se elevada mesmo quando foi retirada a cobertura plástica (Figura 41).

Passadas duas semanas de permanência na câmara de crescimento as plantas já começaram a aparentar um certo vigor o que iria garantir sucesso na adaptação ao meio ambiente exterior. Foram, então, transferidas primeiro para uma estufa e posteriormente para o ar livre (Figura 42), de modo a completar-se o seu ciclo de desenvolvimento. A evocação floral verificou-se em Maio (Figura 43), e em Julho deu-se o aparecimento dos frutos (Figura 44). Estes mais tarde amadureceram, adquiriram a cor negra e libertaram as sementes.

A metodologia que acabamos de descrever permitiu, com sucesso, a multiplicação *in vitro* de *Hypericum androsaemum* através da proliferação de rebentos axilares.

Este método de propagação que implica a abolição da dominância apical, da qual resulta uma activação e multiplicação dos gomos axilares, tem sido utilizada para a propagação em larga escala de várias plantas (Rani e Raina, 2000). Estudos efectuados sobre a regeneração de plantas a partir destas regiões meristemáticas mostraram que a variação somaclonal é mínima (Illg, 1990), podendo obter-se plantas completas num intervalo de tempo relativamente curto. Comparativamente a outros métodos de micropropagação, a estabilidade genética das plantas micropropagadas por esta via é significativamente superior, só comparável ao das plantas obtidas por embriogénese somática directa (Gratapaglia e Machado, 1990; Rani e Raina, 2000 e citações aí referidas).



**Figura 40** – Aclimatização. Plântulas na câmara de crescimento, com cobertura de plástico para evitar alterações rápidas do ambiente físico de cultura.



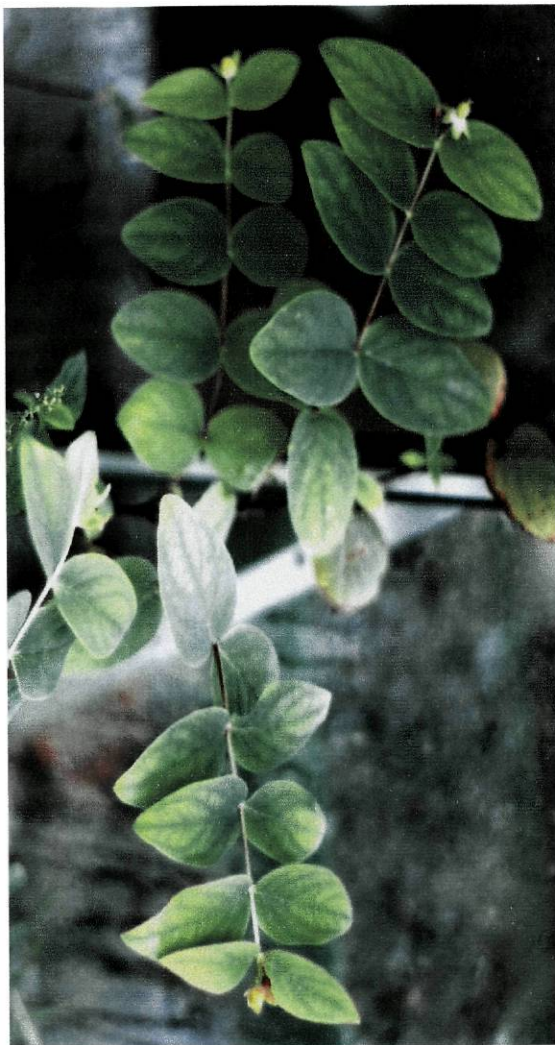
**Figura 41** – Plantas sem cobertura plástica, na câmara de crescimento.



**Figura 42** – Plantas em aclimatização na câmara de crescimento e apresentando vigor suficiente para serem transplantadas para a estufa exterior.



**Figura 43** – Planta a completar o seu ciclo de vida de desenvolvimento em condições *ex vitro*.



**Figura 44** - A) Pormenor da planta em crescimento *ex vitro*.  
B) Aspecto da flor.  
C) Fruto em formação, inicialmente com uma cor clara mas que posteriormente adquire a cor negra.

## CONCLUSÃO

Para cada espécie e de acordo com o objectivo de investigação vários trabalhos têm sido realizados. Muitas espécies de plantas são capazes de regeneração quer por organogénese quer por embriogénese somática, mas poucas espécies são capazes de sofrer regeneração por ambos os processos. Algumas espécies são facilmente regeneradas a partir de tecido caloso ou de cultura de células enquanto outras são regeneradas somente por um processo de rebentos adventícios (Phillips e Hubstenberger, 1995).

De acordo com o objectivo principal proposto, o nosso trabalho desenvolvido com *Hypericum androsaemum*, permitiu definir as condições de cultura para a micropropagação desta espécie. A propagação *in vitro* pode ser facilmente obtida, em *H. androsaemum*, pela via da proliferação de rebentos a partir de nódulos axilares. A regeneração de rebentos foi efectivamente induzida em segmentos nodais (fragmentos de caule com nódulos simples) inoculados no meio base MS/B5 suplementado com diferentes concentrações de BA (0,1, 0,2, 0,5 e 1,0 mg/L). Este regulador de crescimento, BA, ao fim de 2-3 semanas, possibilitou a multiplicação de gomos e posterior desenvolvimento de estruturas caulinares. É interessante notar que o aumento de concentração de BA no meio não afectou significativamente a regeneração. Esta citocinina não promoveu o enraizamento. Os rebentos caulinares enraizaram facilmente após transferência para o mesmo meio base MS/B5, a meia força, com sacarose a 2% e suplementado com 0,2 mg/L IBA. A utilização de uma citocinina exógena, com concentração baixa pode levar a pensar que a auxina endógena era elevada. O enraizamento foi efectuado em meio sólido. Posteriormente, o aumento do número, do tamanho e engrossamento das raízes foi realizado em meio líquido, sem reguladores de crescimento e sem sacarose.

De referir que durante o estabelecimento dos explantes foi necessário eliminar os compostos fenólicos exsudados para o meio de cultura o que foi conseguido usando como anti-oxidante, o ácido ascórbico. Assim, a utilização de um anti-oxidante, tornou possível aumentar significativamente a quantidade de plantas produzidas.

Quando se utilizaram como explantes fragmentos de caule e folha, foram testados alguns reguladores de crescimento. As auxinas NAA e 2,4-D, em diferentes concentrações, foram associadas a diferentes concentrações de BA e KIN. Em alguns meios de cultura foi adicionado, isoladamente, o 2,4-D em concentração de 1,0, 2,0 e 3,0 mg/L. Nestes meios testados só foi possível obter tecido caloso, embora a quantidade de tecido caloso apresenta-se variações no seu aspecto e cor. Em todos os meios em que estavam presentes os reguladores de crescimento NAA associado a KIN, foi possível observar a formação de raízes e a diminuição da produção de tecido caloso. Num dos meios com 1,0 mg/L de 2,4-D e 1,0 mg/L também se verificou uma manifestação muito ligeira de organogénese radicular. Outras duas excepções foram o meio com 0,1 mg/L de NAA adicionado a 1,0 mg/L de BA e o meio com 0,1 mg/L de 2,4-D adicionado a 1,0 mg/L de BA, em que houve obtenção de pouca quantidade de tecido caloso e obtenção de rebentos, embora com pouco sucesso. Os reguladores, NAA, 2,4-D, BA e KIN, utilizados mostraram a não eficiência na regeneração de *H. androsaemum*, uma vez que não levaram à indução controlada da competência nos explantes usados. Por outro lado, os explantes de folha e caule não mostraram competência embriogénica ou organogénica.

O insucesso encontrado na resposta morfogenética dos explantes de folha e caule, de *Hypericum androsaemum*, nos vários meios acima referidos, aponta a necessidade de se ensaiarem outros reguladores, nomeadamente o TDZ, que permitiu a regeneração de plantas de *Hypericum perforatum* a partir de culturas de hipocótilo, quando outros reguladores testados, como por exemplo a BA e o IAA, não foram eficazes (Murch et al., 2000a). O TDZ é um regulador sintético potente e é altamente efectivo na morfogénese *in vitro*, podendo ser usado para induzir uma série de respostas de diferenciação e desdiferenciação (Murthy et al., 1998). Pensa-se que este regulador possa modular a actividade hormonal endógena (Benson, 2000).

O ácido ascórbico também poderá ser empregue em trabalhos futuros com a espécie deste trabalho dado que, em algumas espécies, o seu uso levou a um aumento de organogénese (Joy et al., 1988).

O estudo da acção do etileno produzido pelas culturas *in vitro* também não seria de colocar de lado dado que pode ser um factor de recalcitrância. O etileno está

envolvido em muitas respostas de morfogénese e tanto pode promover como inibir a morfogénese (Benson, 2000).

Será também importante verificar a resposta de outros tipos de explantes e mesmo de explantes em diferentes estádios fisiológicos de desenvolvimento, de modo a tentar testar outros métodos de micropropagação.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Ahmed, M. A., El-Mawla, A., Schmidt, W., Berhues, L.. 2001. Ciannamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaurium erythrea* RAFN. *Planta*. **212**:288-293.
- Akamatsu, K.. 1966. In Wakanyaku. Ishiyaku Publications. Tokyo. Citado por Yazaki, K., Okuda, T. (1990).
- Alford, C. A., Britt, W. J.. 1990. Cytomegalovirus. In Fields, B. N., Knipe, D. M. (ed). Raven Press. New York. *Virology*. 2nd ed, Pp 1981-2100. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Anderson, L. A., Phillipson, J. D.. 1986. *Pharmacology Journal*. **236**:303.
- Anker, L., Gopalakrishna, R., Jones, K. D., Law, E. R., Couldwell, W. T.. 1995. Hypericin in adjuvant tumor therapy. *Drugs of the future*. **20**:511-517.
- Arrigoni, O.. 1994. Ascorbate system in plant development. *J. Bioenerg. Biomem.* **26**:407-419.
- Arrigoni, O., De Gara, L., Tommasi, F., Liso, R.. 1992. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L.. *Plant Physiology*. **99**:235-238
- Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M.. 1998. Antiviral *In vitro* of *Hypericum perforatum* L. Extract on the Human Cytomegalovirus (HCMV). *Phytotherapy Research*. **12**:507-511.
- Ball, E.. 1946. Development in sterile culture of stems tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. *Am. Journal Bot.* **33**:301-318.
- Barnard, D. L., Huffmann, J. H., Morris, J. L., Wood, S. G., Hughes, B. C., Sidwell, R. W.. 1992. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinones derivatives gainst human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **17**:63-77.
- Beerhues L., Barillas, W., Peters, S., Schmid, W.. 1997. Recent research developments in phytochemistry 1, Xanthone biosynthesis in plant cultures. In Padalai, S. G., Ed.. Research Signpost. *Trivandrum*. Pp 69-76. Citado por Schmidt, W., Abd El-Mawla, A. M. A., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Beerhues, L. (2000a).
- Bennett, G. J., Lee, H. H.. 1988. The biosintesis of magostin: the origin of the xanthone skeleton. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* Pp 619-620.
- Bennett, G. J. e Lee, H. H.. 1989. Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*. N° 4, **28**:967-998.

- Benson, Erica E.. 2000. Special symposium: *In vitro* Plant recalcitrance. *In vitro* Plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* **36**:141-148.
- Bone, K.. 1994. The herbal treatment of viral infections. *Eur. J. Herbal Med.* **1**:23-28.
- Bork, P. M., Bacher, S., Schmitz, M. L., Kaspers, U., Heinrich, M.. 1999. Hypericin as a Non-Antioxidante Inhibitor of NF-kB. *Planta Medica.* **65**:297-300.
- Boxus, P. H., Quoirin, M., Laine, J. M.. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In Reinert, J., Bajaj, O. L.. Springer-Verlag. Berlin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods.* Pp 131-143.
- Brevoort, P.. 1998. The blooming U.S. botanical market: a new overview. *Herbalgram.* **44**:33-46. Citado por Briskin, D. P. (2000).
- Briskin, D. P.. 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology.* **124**:507-514.
- Brown, D. C. W., Leung, D. W. M., Thorpe, T. A.. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.* **46**:36-41. Citado por Brown, D. C. W. e Thorpe, T. A. (1986).
- Brown, D. C. W., Thorpe, T. A.. 1986. Plant Regeneration by Organogenesis. In Vasil, I. K.. Ed. Academic Press, Inc.. Florida. *Cell culture and somatic cell genetics of plants.* Volume 3. Pp 49-60.
- Büter, K. B., Büter, B., Schaffner, W.. 1994. *In vitro* propagation of *Hypericum perforatum*: impact of thidiazuron and 6-benzyloaminopurine. Italy. *Abstracts of the VIII IAPTC Congress.* Pp 62.
- Butterweck, V., Petereit, F., Winterhoff, H., Nahrstedt, A.. 1998. Solubilized hypericin and pseudohypericina from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica.* **64**:291-294.
- Butterweck, V., Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A., Winterhoff, H.. 2000. Flavonoids from *Hypericum perforatum* Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test. *Planta Medica.* **66**:3-6.
- Canhoto, J.. 1994. *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae): Estudos sobre Embrigenese Somática e outros tipos de morfogénese. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para obter o grau de Doutor em Biologia, especialidade em Fisiologia Vegetal.
- Capasso, F., Grandolini, G.. 1999. Uso razionale delle droghe vegetali. 2nd ed. Milano. Springer-Verlag Italia. *Fitofarmacia.*
- Capasso, R., Izzo, A. A., Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., Mascolo, N.. 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicines. Eds Elsevier Science. *Fitoterapia.* **71**: 58-65.

- Cardona, M. L., Seoane, E.. 1982. Flavonoids and xanthonolignoids of *Hypericum ericoides*. *Phytochemistry*. **21**(11):2759-2760.
- Cardoso, M. A., Oliveira, D. E.. 1996. Tissue culture of *Hypericum brasiliense*. Choisy: Shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell, Tissue Organ culture*. **44**: 91-94.
- Cass, H. M. D.. 1999. In Eds. Madras. São Paulo. *Erva-de-São-João, o antidepressivo natural*.
- Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Lainz, M., Monserrat, P., Morales, R., Garmendia F. M., F., Navarro, C., Paiva, J. & Soriano, C.. 1995. LVIII. GUTTIFERAE: In *Flora Ibérica*. Vol. III. Pp 157-185.
- Cellárová, E., Kimáková, K., Brutovská, R.. 1992a. Multiple shoot formation and phenotypic changes of R<sub>0</sub> regenerants in *Hypericum perforatum* L.. *Acta Biotechnol.* **12**:445-452.
- Cellárová, E., Kimáková, K., Brutovská, R.. 1992b. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and variability of R<sub>0</sub>. *Biol. Plant.* **34** (Suppl.): 534.
- Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A, Muller, W. E.. 1998. Hyperforin as a possible antidepressant compound of *Hypericum* extracts. *Life Sciences*. **63**:499-510.
- Chevallier, A.. 1996. In Selecções do Readers Digest. Ed.. Grã-Bretanha. *Enciclopédia de Plantas Mediciniais. Guia Prático de mais de 550 Plantas Mediciniais e respectivas aplicações*.
- Chu, IYE. 1992. Perspectives of micropropagation industry. In Eds. Kurata, K., Kozai, T.. Amsterdam. Kluwer Academic. *Transplant production systems*. Pp 137-150. Citado por Phillips, G. C., Hubstenberger, J. F. (1995).
- Citterio, S., Sgorbati, S., Scippa, S., Sparvoli, E.. 1994. Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiol. Plant..* **92**:601-607.
- Côrte, G; Mendonça, A..1985. Importance de la culture de méristèmes pour la multiplication accélérée de clones de vigne exempts de virus. *Bull. de CO. I. V.* 650-651: 397-402.
- Costa, M. J. F. 1904. *Hypericum androsaemum* L. Dissertação. Coimbra.
- Costa, Aloísio Fernandes. 1994. As plantas Mediciniais. Preparação e Conservação. In Eds.Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. *Farmacognosia..* Vol. II. 4ª edição. Pp 1032-1046.
- Coutinho, P. 1939. Eds. Telles Palhinha, Bertrand Lda. Lisboa. *Flora de Portugal*.

- Davey, M. W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I. J. J., Strain, J. J., Favell, Derek, F., Fletcher, J.. 2000. Review – Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**:825-860.
- Décosterd, L., Stoeckli-Evan, H., Msonthi, J. D., Hostettmann, K.. 1986. A new antifungal chromene and a related dichromene from *Hypericum revolutum*. *Planta Medica*. **52**:429.
- Denke, A., Schempp, H., Mann, E., Schneider, W., Elnstner, E. F.. 1999. Biochemical Activities of Extracts from *Hypericum perforatum* L.. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. **49** (I), 2:120-125.
- De Smet, P. A. G. M.. 1997. In De Smet P. A. G. M., Kelle, K., Hansel, R., Chandler, R. F., editors. Springer-Verlag. *Adverse effects of herbal drugs*. Vol.3. Pp 1-13.
- Dewick, P. M.. 1997.. Wiley, Chicester. *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*. Citado por Ahmed, M. A., El-Mawla, A., Schmidt, W., Berhues, L. (2001).
- Dias, A. C. P., Tomás-Barberán, F. A., Fernandes-Ferreira, M., Ferreres, F.. 1998. Unusual flavonoids produced by callus of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry*. **48**(7):1165-1168.
- Dias, A. C. P., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Ferreira, M. F.. 1999. The development and evaluation of a HPLC-DAD method for the analysis of the phenolic fractions from *in vivo* and *in vitro* biomass of *Hypericum* species. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technology*. **22**:215-227.
- Dias, A. C. P., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M.. 2000. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. *Plant Science*. **150**:93-101.
- Dixon, R. A.. 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. Ed. R. A. Dixon. Oxford. In *Plant Cell Culture. Pratical Approach Series*. Pp 1-78.
- Duke, J. A.. 1992. Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS. CRC Press. Florida, USA. *Herbs and Others Economic Plants*. Pp 302.
- Durzan, D. J.. 1988. Process control in somatic polyembryogenesis. In . J. Hallgren. Ed. Umea: Swedish Agri. Univ.. *Molecular genetics of forest trees*.
- Durzan, D. J., Gupta, P. K.. 1988. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in conifers. In Alan, R., Mizrahl, A.. Ed. New York. *Biotechnology in agriculture*. Pp 53-81.
- Ernest, E..1995. St. John's Wort, an anti-depressant? A systematic, criteria-based review. *Phytomedicine*. **2**:67-71.

- Falkiner, F. R.. 1990. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. *Soc. Plant Tissue. Newsletter*. **60**:14-23.
- Fellenberg, G..1963. *Z. Botanic*. **51**:113-141. Citado por Murashige, T. (1974).
- Fernandez, M., L., Alcaraz, M. J.. 1991. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Action*. **32**:283-288.
- Ferraz, A. B. F., Bordignons, S. A. L., Staats, C., Schripsema, J., von Poser, G. L.. 2001. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*. **57**:1227-1230.
- Franco, J. A.. 1971. Lisboa. Eds. Sociedade Astória. Ordem: Gutiferales. *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Volume I. Pp 447-453.
- Fuller, R. W., Blunt. J. W., Boswell, J. L., Cardellina, J. H., Boyd, M. R.. 1999. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblakia stuhlmannii*. *Journal of Natural Products*. **62**:130-132.
- Gama, M. D.. 2001. Parque Nacional da Peneda-Gêres. Do mito à realidade. Eds. FAPAS. *Revista Tribunal da Natureza*. Nº.6. Pp 4-7.
- Gamborg, L., Miller, R. A., Ojima, K.. 1968. Nutrient requeriments of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*. **50**:151-158.
- Gamborg, O. L., Phillips, G. C.. 1995. Eds Springer-Verlag. Berlin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.
- Gaspar, T, Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., Thorpe, T. A.. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant*. **32**:272-289.
- Gautheret, R. J.. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sc*. **208**:118-120.
- Gautheret, R. J.. 1985. History of Plant Tissue and Cell Culture: A Personal Account. In Vasil, I. K.. Ed. Academic Press, INC. New York. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Volume 2. Pp.1-59.
- George, E. F., Sherrington, P. D.. 1984. Exegetics. Eversley. England. "*Plant Propagation by Tissue Culture*". Citado por Brown, D. C. W., Thorpe, T. A. (1986).
- George, E. F.; Puttock, D. J. M.; George, H. J..1987. Exegetics Ltd.. Edington, England. *Plant Culture media. Formulation and uses*. Vol. I. Citado por Moura, M. (1998).
- Glaser, V.. 1999. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. *Nat. Biotechnol*. **17**:17-18. Citado por Briskin, D. P. (2000).
- Graham, J., Bennett and Hior-Huang Lee. 1989. Xanthones from Guttiferae. Review article number 43. *Phytochemistry*. **28**(4):967-998.

- Grattapaglia, D. & Machado, M. A.. 1990.. Micropropagação. In Torres, A.C. & Caldas. L. S., Ed.. ABCTP/EMBRAPA-CNPH Brasília. *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Pp 99-170.
- Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellsn. Sitzungsber. Akad. der Wiss. Wien. *Math.-Naturwiss. K1*. **111**:69-92. Citado por Murashige, T. (1974), por Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR, R. T. (1990) e por Gautheret, R. J. (1985).
- Hacius, B.. 1978. Question of unicellar origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*. **28**:74-81. Citado por Brown, D. C. W., Thorpe, T. A. (1986).
- Harborne, J. B., King, L.. 1976. *Biochemistry Systeme Ecologique*. **4**:111. Citado por Seabra, Rosa M., Alves, A. C. (1989).
- Hargreaves, K. R.. 1966. *Nature*. **211**:417.
- Harrer, G., Sommer, H..1994. Treatment of mild/moderate depressions with *Hypericum*. *Phytomedicine*. **1**:3-8.
- Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR, R. T.. 1990. Techniques of *In Vitro* Culture for Micropropagation. In Ed. Prentice Hall International. *Plant Propagation, Principles and Practices* (fifth edition). Pp 496-525.
- Hobbs, C.. 1989. St John's Wort. *Hypericum perforatum* L.: a review. *HerbalGram*. **18/19**:24-33.
- Hölzl, J., Ostrowski, E.. 1987. St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). HPLC analysis of the main components and their variability in a population. *Deuts. Apothekerztg*. **127**: 1227-1230.
- Hölzl, J., Sattler, S., Schütt, H.. 1994. Johanniskraut: eine Alternative zum synthetischen Antidepressiva? *Pharmazeutische Zeitung*. **139**:3959-3977. Citado por Schmidt, W., Abd El-Mawla, A. M. A., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Beerhues, L. (2000a).
- Hostettmann, K., Hostettmann, M.. 1989. Xanthones. In Harborne, J. B. (Ed.), Academic Press. New York. *Methods. Plant Biochemistry, Plant Phenolics*. Vol. 1. Pp. 493-508.
- Hostettmann, K., Marston, A., Wolfender, J.-L.. 1995. Strategy in the search for new biologically active plant constituents. In Hostettmann, K., Marston, A., Maillard, M., Hamburger (Eds). Claredon Press, Oxford. *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine*. Pp 17-45.
- Hudson, J. B.. 1992. CRC Press. Florida. *Antiviral Compounds from Plants*. Pp 162.
- Hudson, J. B., Lopez-Bazzocchi, I., Towers, G. H.. 1991. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res.*. **15**(2):101-112.

- Hussain, R. A., Owegby, A. G., Parimoo P., Waterman, P. G.. 1982. Kolanone, a novel polyisoprenylated benzophenone with antimicrobial proprieties from the fruit of *Garcinia kola*. *Planta Medica*. **44**:78-81.
- Hutchinson, J.. 1973. Academic Press. London. *The Families of Flowering Plants* (3ª edição). Pp 28.
- Ignatushchenko, M. V., V., Winter, R. W., Bächinger, H. P., Hinrichs, D. J., Riscoe, M. K.. 1997. Xanthonas as antimalarial agents; studies of a possible mode of action. *FEBS Lett*. **409**: 67-73.
- Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., Kobayashi, Y., Shimano, R., Miyauchi, K.I.. 1996. Antibacterial activity of xanthonas from guttiferaeous plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol*..**48**:861-865.
- Illg, R. D.. 1990. Variação somaclonal. In: Torres, A. C. & Caldas, L. S., Ed.. ABCPTP/EMBRAPA-CNPB, Brasilia. *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Pp 287-297. Citado por Cardoso, M. A., Oliveira, D. E. (1996).
- Ishiguro, K., Yamaki, M., Kashimara, M., Takagi, S., Isoi, K.. 1990. A chromene from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*. **29**:1010-1011.
- Ishiguro, K., Nagareya, N., Fukumoto, H.. 1998. A phloroglucinol derivate from cell suspension cultures of *Hypericum patalum*. *Phytochemistry*. **47**(6):1041-1043.
- Jayasuriya, H., Clark, A. M., McChesney, J. D.. 1991. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. *Journal of Natural Products*. **54**:1314-1320.
- Jiménez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A., Sevilla, F.. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*. **114**:275-284.
- Joy, R. W., Patel, K. R., Thorpe, T. A.. 1988. Ascorbic acid enhancement of organo genesis in tobacco. *Plant Cell Tissue Organ Cult*.. **13**:219-228.
- Kang, B. Y., Chung, Su W., Kim, T. S.. 2001. Inibition of Interleukin-12. Production in Lipopolysaccharide-Activated Mouse Macrophages by Hypericin, an Active Component of *Hypericum Perforatum*. *Planta Medica*. **67**:364-366.
- Kartnig, T., Brantner, A. 1990. Secondary constituents in cell cultures of *Hypericum perforatum* and *Hypericum maculatum*. *Planta Medica*. **56**:634.
- Kaufman, P. B., Cseke, L. J., Warber, S., Duke, J. A., Brielmann, H. L..1999. CRC Press, Boca Raton, FL. *Natural Products from Plants*. Citado por Briskin, D. P.. (2000).
- Kevers, C., Filali, M., Petit-Paly, G., Hagège, D., Rideau, M., Gaspar, T.. 1996. Habituation of plant cells does not mean insensitivity to plant growth regulators. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. **32**:204-209.

- Kirakosyan, A., Hayashi, H., Inoue, K., Charchoglyan, A., Vardapetyan, H.. 2000. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*. **53**:345-348.
- Kitanov, G. M., Nedialkov, P. T.. 2001. Benzophenone *O*-glucoside, a biogenic precursor of 1,3,7-trioxygenated xanthenes in *Hypericum annulatum*. *Phytochemistry*. **57**:1237-1243.
- Kukreja, A. K., Mathur, A. K., Zaim, M.. 1990. Mass production of virus free patchouli plants [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth] by *in vitro* culture. *Trop Agric.* **67**:101-104. Citado por Raha, S. e Roy, S. C. (2001).
- Lavie, G., Valentine, F., Levin, B., Mazur, Y., Gallo, G., Lavie, D., Weiner D. And Meruelo, D.. 1989. Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**:5963-5967. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Lavie, G., Mazur, Y., Meruelo, D.. 1995. The chemical and biological properties of hypericin: a compound with a broad spectrum of biological activities. *Medicinal Research Reviews*. **15** (2): 111-119.
- Lebreton, P., Bouchez, M. P.. 1967. *Plant. Med. Phytother.* **1**:188. Citado por Bennett, G. J. e Lee, H. H. (1989).
- Leifert, C., Waites, W. M.. 1990. Contaminants in plant tissue culture. *Int. Soc. Plant Tissue Cult. Newsletter*. **60**:2-13.
- Lenard, J., Rabson, A., Vanderoef, R.. 1993. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: Inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc. Natl Acad. Sci.* **90**:158-162.
- Leonhard, B. E.. 1995. Mechanisms of action of antidepressants. *CNS Drugs*. **4**(1):1-12.
- Lin, Yuh-Meei, Flavin, M. T., Schure R., Chen, Fa-Ching, Sidwell, R., Barnard, D. L., Huffmann, J. H., Kern, E. R.. 1999. Antiviral Activities of Biflavonoids. *Planta Medica*. **65**:120-125.
- Linsmaier, E. M., Skoog, F.. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. **18**:100-127.
- Lloyd, G., McCowm, B.. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. Proc.* **30**:421-427.
- Malamas, M., Marselos, M.. 1992. The tradition of medicinal plants in Zagori, Epirus (north-western Greece). *J. Ethnopharmacol.* **37**:197-203.

- McCown, B. H., McCown, D. D.. 1999. Workshop on Micropropagation. A general approach for developing a commercial micropropagation system. *In vitro Cell Biol.-Plant.* **35**:276-277.
- Maisenbacher, P., Kovar, K. A.. 1992. Analysis and stability of Hypericin oil. *Planta Medica.* **58**:351-354.
- Mantell, S. H., Matthews, J. A., McKee, R. A. 1985. Blackweel Scientific. Boston. *Principles of plant biotechnology.* Pp 130-157.
- Mathis, C., Ourisson, G.. 1963. Étude chimiotaxonomique du genre *Hypericum*. I. Repartition de l'hypericine. *Phytochemistry.* **2**:157.
- Mathis, C., Ourisson, G.. 1964a. Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*. *Phytochemistry.* **3**(1):115.
- Mathis, C., Ourisson, G.. 1964b. Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*. *Phytochemistry.* **3**(1):133.
- Mathis, C., Ourisson, G.. 1964. Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*. *Phytochemistry.* **3**(3):377.
- Matos, C. 1992. Micropropagação vegetative *in vitro* de: *Brassica oleracea* L., *Lippia citriodora* Ortega e *Punica granatum* L. Relatório do trabalho final de curso de bacharelato em engenharia de produção agrícola. Instituto Politécnico de Santarém.
- Mederos, M. S..1991. *In vitro* growth and multiplication of *Hypericum canariense* L.. *Acta Horticulturae.* **289**:133-134.
- Mederos, M. S., Rodríguez, E. M. J.. 1990. *Physiologia Plantarum.***79**: A3, 17.
- Meruelo, D., Lavie, G., Lavie, D.. 1988. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl Acad. Science.* **85**(14):5230-5234. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Mederos, S., San Andrés, L., Luis, J. G.. 1997. Rosmanol controls explants browing of *Hypericum canariense* L. during *in vitro* establishment of shoots. *Acta Societatis Botanic.* **66**:347-349.
- Merkle, S. A., Parrot, W. A., Flinn, B. S.. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In Thorp, T.. Klumer Academic Publishers *In Vitro Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture.* Pp 156-191.
- Miyake, C., Asada, K.. 1994. Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **35**:539-549.

- Moura, Mónica. 1998. Conservation of *Hypericum foliosum* Aiton, an endemic Azorean Species, by micropropagation. *In vitro Cell Dev. Biol.- Plant*. **34**:244-248.
- Murashige, Toshio. 1966. Principles of *in vitro* culture. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.* **16**:80-88. Citado por Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR, R. T. (1990).
- Murashige, Toshio. 1974. Plant Propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiology*. **25**:135-166.
- Murashige, T., Skoog, F.. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant*. **15**:473-497.
- Murch, S. J., Choffe, K. L., Victor, J. M. R., Slimmon, T. Y., KrishnaRaj, S., Saxena, P. K.. 2000a. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyls cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'Antos'). *Plant Cell Reports*. **19**:576-581.
- Murch, S. J., KrishnaRaj, S., Saxena, P. K.. 2000b. Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St. John's wort. (*Hypericum perforatum* L. cv Antos). *Plant Cell Reports*. **19**:698-704.
- Murthy, B. N. S., Murch, S. J., Saxena, P. K. 1998. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant*. **34**:267-275.
- Nahrstedt, A., Butterweck, V.. 1997. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiatry*. **30**(Suppl):129-134.
- Nobécourt, P. 1939. Sur lapérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil*. **130**:1270-1271. Citado por Gautheret, R. J. (1985) e por Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR., R. T. (1990).
- Nicolaeva, V. T.. 1977. Plants used by some nations in the USSR for diseases of the liver and biliary ducts. *Rastitel'nye Resursy*. **13**:396-403. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Noctor, G., Foyer, C. H.. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **49**:249-279.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Yasaki, K., Ikegami, Y., Shingu, T.. 1987. *Cem. Pharm. Bull.* **35**:443-446.
- Öztürk, Y.. 1997. Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. *Pharmacopsychiatry*. **30** (Suppl. 2):125-128.
- Paris, R. R., Moyse, H.. 1981. *Precis de Matière Medicale*. Pp:234. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Pathak, D., Pathak, K., Singla, A. K.. 1991. Flavonoids as medicinal agents-recent advances. *Filoterapia* LXII, 371-389.

- Peters, S., Schmidt, W., Beerhues, L..1998. Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone in cell of *Centaureum erythrae* RAFN e *Hypericum androsaemum* L.. *Planta*. **204**: 64-69.
- Phillips, G. C., Hubstenberger, J. F.. 1995. Micropropagation by proliferation of axillary buds. In Eds. O. L. Gamborg e G. C. Phillips. Springer-Verlag. Berlin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Pp 45-54.
- Phillips, G. C., Hubstenberger, J. F., Hansen, E. E.. 1995. Adventitious Shoot Proliferation. In Eds. O. L. Gamborg e G. C. Phillips. Springer-Verlag. Berlin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Pp 55-65.
- Pierick, R. L. M.. 1987. In Martinus Nijhoff, Dordrecht. *In vitro* culture of higher plants.. Pp.183-230.
- Pistelli, L., Bertoli, A., Zucconelli, S., Morelli, I., Panizzi, L., Menichini, F.. 2000. Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia*. **71**:S138-S140.
- Pitman, Vicki. 1996. Eds.Estampa. Lisboa.*Fitoterapia, as plantas medicinais e a saúde*.
- Poutaraud, A., Di Gregório, F., Tin, V. C. F., e Girardin, P.. 2000. Effect of Ligth on Hipericins Contents in Fresh Flowering Top Parts and in an Extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*. **67**:254-259.
- Pretto, F. R., Santarém, E. R.. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **62**:107-113.
- Quer, P. F.. 1962. In Eds. Labor, S. A.. Barcelona. Família 57ª GUTÍFERAS. *Plantas Medicinales*. Pp 291-293.
- Raha, S., Roy, S. C.. 2001. *In Vitro* Plant Regeneration in *Holarrhena antidysenterica* Wall., through high-frequency axillary shoot proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. **37**:232-236.
- Rani, V., Raina, S. N.. 2000. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. **36**:319-330.
- Reynolds, J. E. F. (Ed.). 1993. Martindale, The Pharmaceutical Press. London. *The Extra Pharmacopeia*. 30<sup>th</sup> edn. Pp 1378. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Rocha, L., Marston, A., Kaplan, M. A. C., Stoeckli-Evans, H., Thull, U., Testa, B., Hostettmann, K.. 1994. An antifungal gamma-pyrone and xantones with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. **36**(6):1381-1385.

- Rocha, L., Marston, A., Potterat, O., Kaplan, M. A. C., Stoeckli-Evans, H., Hostettmann, K.. 1995. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. **40**(5):1447-1452.
- Roest, S., Bockelmann, G. S.. 1973. Vegetative propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* *in vitro*. *Sci. Hort.* **1**:120-122.
- Roob, S. M.. 1957 *Journal Exp. Botanic*. **8**: 248-352. Citado por Murashige, T. (1974).
- Sampaio, G. 1947. Eds. Imprensa Portuguesa. Porto. *Flora Portuguesa*.
- Sandstrom, E.. 1989. Antiviral therapy in human immunodeficiency virus infection. *Drugs*. **38**:417-450.
- Santos, A., Abreu, I., Santos, I., Salema, R.. 1993. Direct organogenesis and plant regeneration of *Hypericum linarifolium* Vahl. Sociedade Portuguesa de Bioquímica. *Jornadas de estrutura, metabolismo e desenvolvimento em plantas*. Pp 5 e Pp.47.
- Schempp, H., Denke, A., Mann, E., Schneider, W., Elstner. 1999. Biochemical Activities of Extracts from *Hypericum perforatum* L..3rd Communication: Modulation of peroxidase activity as a simple method. *Arzneim.-Forsch./Drug Res*. **49**(I),2:115-119.
- Schinazi, R. F., Chu, C. K., Babu, J. R., Oswald, B. J., Saalman, V., Cannon, D. L.. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antivir. Res*. **13**(5):265-272.
- Schmidt, W., Beerhues, L..1997. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell culture of *Hypericum androsaemum* L..National Library of Medicine. PubMed. *FEBS Lett*. **420**(2-3): 143-146.
- Schmidt, W., Abd El-Mawla, A. M. A., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Beerhues, L.. 2000a. Xanthenes in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *Planta Medica*. **66**(4):380-381.
- Schmidt, W., Peters, S. Beerhues, L.. 2000b. Xanthone 6-hydroxylase from cell cultures of *Centaurium erythrae* RAFN and *Hypericum androsaemum* L.. *Phytochemistry*. **53**:427-431.
- Seabra, R. M. M.. 1987. *Contribuição para o estudo de compostos Flavónicos em espécies de HYPERICUM da flora Portuguesa*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia do Porto.
- Seabra, Rosa M., Alves, A. C.. 1989. Identificação de 3-sulfato de quercetina em *Hypericum androsaemum*. *Revista Portuguesa de Farmácia*. Vol.XXXIX, nº.1. Pp 16-19.
- Sen, J. E Sharma, A. K.. 1991. Micropropagation of *Withania somnifera* from germinating seeds and shoot tips. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **26**:71-73.

- Serkedjieva, J., Manolova, N., Zgorniak-Nowosielska, I., Zawilinska, B., Grzybek, J.. 1990. Antiviral activity of the infusion (SHS-174) from flowers of *Sambucus nigra* L., aerial parts of *Hypericum perforatum* L., and roots of *Saponaria officinalis* L. against influenza and herpes simplex viruses. *Phytother. Res.* **4**:97-100.
- Shulz, V., Hansel, R., Tyler, V. E... 1998. Springer-Verlag. Berlin. *Rational phytotherapy. A physicians guide to herbal medicine*. Citado por Capasso, R., Izzo, A. A., Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., Mascolo, N. (2000).
- Skirvin, R. M., Motoike, S., Norton, M. A., Ozgur, M., Al-Juboory, K., McMeans, M.. 1999. Workshop on Micropropagation. Establishment of contaminant-free perennial *in vitro*. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant*. **35**:278-280.
- Skoog, F., Miller, C. O.. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. For Exp. Biology*. **11**:118-131. Citado por Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR, R. T. (1990), por Gautheret, R. J.. 1985, por Brown, D. C. W., Thorpe, T. A. (1986) e por Moura, M. (1998).
- Smirnoff, N.. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* **78**:661-669
- Sommer, H., Harrer, G.. 1994. Placebo-controlled double blind study examining the effectiveness of an *Hypericum* preparation in 105 mildly depressed patients. *J. Geriatr. Psychiat. Neurol.* **7**:S9-S11.
- Southwell, I. A., Bourke, C. A.. 2001. Seasonal variation in hipericin content of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort). *Phytochemistry*. **56**:437-441.
- Stasolla, C., Yeung, E. C.. 1999. Ascorbic acid improves conversion of white spruce somatic embryos. *Plant*. **35**:316-319.
- Sussex, I. M..1983. Determination of plant organs and cells. In Meredith, C. P. e Holllaender, A.. Ed. T. Kosuge,. New York: Plenum Press. *Genetic engeneering of plants: an agricultural perspective*. Pp 443-451. Citado por Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR., R. T. (1990).
- Takahashi, I., Nakanishi, S., Kobayashi, E., Nakano, H., Suzuki, K., Tamaoki, T.. 1989. Hypericin pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165** (3):1207-1212. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Tamas, I. A.. 1987. Hormonal regulation of apical dominance. In Davies, P. J., Ed.. Martinus Nijhoff Publishers. Dodrecht, Netherlands. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Pp 393-410.
- Tang, J., Colacino, J. M., Larsen, S. H., Spitzer, W.. 1990. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral. Res.* **13** (6):313-325.

- Thiers, B. H.. 1989. Antiretroviral therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21/3 I**:443-454.
- Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. In R. A. Dixon. Oxford. *Plant Cell Culture. Pratical Approach Series*. Pp 79-105.
- Toonen, M. A. J. e Vries. 1996. Initiation of somatic embryos from single cells. In Wang, T. L. & Cuming, A.. *Embryogenesis, the generation of a plant*. Pp 173-189.
- Tosa, H., Iinuma, M., Tanaka, T., Nozaki, H., Ikeda, S., Tsutsui, K., Yamada, M., Fujimori, S.. 1997. Inhibitory activity of xanthone derivates isolated from some Guttiferaeous plants against DNA topoisomerases I and II. *Chem Pharm Bull.* **45**:418-420.
- Tran Thanh Van K., Trinh, T. H.. 1990. Organogenic differentiation. In Bhojwani, S. S., ed.: Elsevier Science Publishers B.V.. Netherlands. *Plant tissue culture: applications and limitations*. Pp 34-53.
- Tutin, T. G., Heywood, V. H.. 1968. GUTTIFERALES. Eds CambridgeUniversity Press. London. *Flora Europea*. Vol. 2. Pp 261-270.
- Tyler, V. E.. 1999. Pharmaceutical products Press. New York. *Herbs of choice. The therapeutic use of phytomedicinals*.
- Umek, A., Kreft, S., Kartnig, T., e Heydel, B.. 1999. Quantitative Phytochemical Analyses of Six *Hypericum* Species Growing in Slovenia. *Planta Medica.* **65**:388-390.
- Vasil, V., Hildebrandt, A. C.. 1965. Diferentiation of tabaco plants form single, isolated cells in micro cultures. *Science.* **150**:889-892.
- Verotta, L.. 1999. Furohyperforin, a prenylated phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Journal of Natural Products.* **62**:770-772.
- Vlietinck, A. J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L. A.. 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of HIV infection. *Planta medica.* **64**:291-294.
- Vorbach, E. U., Hubner, W. D., Arnolds, K. H.. 1994. Effectiveness and tolerance of the *Hypericum* extracts L1 160 in comparison with imipramine: randomised double-blind study with 135 outpatients. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neuropharmacology.* S19-S23.
- Went, F. W.. 1926. On growth accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. K. Ned. Akad. Wet., Ser. C.* **30**:10. Citado por Gautheret, R. J. (1985).
- White, P. R.. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Am. J. Bot.* **26**:59-64. Citado por Gautheret, R. J. (1985) e por Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR, R. T. (1990).
- White, P. R.. 1951. Nutritional requeriments of isolated plant tissues and organs. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **13**:55-80. Citado por Vasil, V., Hildebrandt, A. C. (1965).

- White, P. R.. 1963. Ronald Press. New York. *The cultivation of animal and plant cells* (2nd ed.). Citado por Hartmann, H. T., Kester, G. E., Davies, JR., R. T. (1990) e por Vasil, V., Hildebrandt, A. C. (1965).
- Wink, M.. 1999. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology*. **124**:507-514.
- Yazaki, K., Okuda, T.. 1990. Procyanidins in Callus and Multiple Shoot Cultures of *Hypericum erectum*. *Planta Medica*. **56**: 490-491.
- Yip, L., Hudson, J. B., Gruszecka-Kowalik, E., Zalkow, L. H., Towers, G. H.. 1996. Antiviral activity of a derivative of the photosensitive compound hypericin. *Phytomedicine*. **III**:185-190.
- Yu, Qibin. 2000. Automatisation in micropropagation. In Internet. Finland. *Plant Biology Department*.
- Zdunek, K., Alfermann, A. W.. 1992. Initiation of shoot organ cultures of *Hypericum perforatum* and formation of hypericin derivatives. *Planta Medica*. **58**:621-622.

uma vez é de salientar o papel positivo da BA, isolada ou adicionada a NAA, na quebra da dormência e multiplicação de rebentos axilares, em várias espécies de plantas (Pretto e Santarém, 2000). No entanto, para Moura (1998), um aumento da concentração de NAA no meio de cultura de *Hypericum foliosum*, provou na generalidade ser inversamente proporcional à diferenciação dos rebentos. O seu efeito inibidor foi unicamente contrabalançado pela adição de BA, na concentração de 1,0 mg/L. Mesmo com concentrações mais elevadas de BA, os resultados foram piores quando estava presente a NAA, 1,0 mg/L. O efeito inibidor de NAA foi mais tarde confirmado por uma total ausência de diferenciação dos rebentos em meios suplementados só com esta auxina (Moura, 1998). Os resultados obtidos com NAA, na fase de iniciação de *Hypericum foliosum* e, segundo a opinião da autora (Moura, 1998), só concordam parcialmente com a teoria de Skoog e Miller (1957). Segundo estes autores a formação de rebentos ou a formação de raízes está dependente da proporção entre os níveis de auxina/citocinina exógenos no meio de cultura. De acordo com os mesmos autores, a concentração relativamente alta de auxina irá promover a diferenciação da raiz e inibir o desenvolvimento dos rebentos. Os resultados com NAA, mesmo quando usados em baixas concentrações, sugerem a possibilidade da presença de um nível elevado de auxina endógena no material vegetal colhido no campo (Moura, 1998). Com 0,1 mg/L de BA parece não ser necessária uma fonte de auxina mas o mesmo já não se passa quando é adicionada 1,0 mg/L de BA. Em *Hypericum foliosum*, isto sugere a necessidade de um efeito compensatório a partir de uma fonte exógena, de auxina, que pode ser um sinal de uma dominância apical fraca nos rebentos produzidos *in vitro* (Moura, 1998).

Em *Hypericum brasiliense* a regeneração de rebentos foi conseguida em meio MS, sem reguladores de crescimento (Cardoso e Oliveira, 1996).

Os procedimentos que foram estabelecidos para a indução de rebentos e a multiplicação em espécies de *Hypericum* referiram uma média de 2 a 5,5 rebentos, dependendo do explante usado (Mederos et al., 1997; Moura, 1998), número comparável ao que obtivemos para *Hypericum androsaemum*. É de salientar também a diferença de sensibilidade que as espécies do género *Hypericum* mostram perante a manipulação das condições de cultura particularmente na utilização de reguladores de crescimento, relativamente ao tipo e concentração em que são usados.

A multiplicação dos rebentos, a partir de gomos axilares, foi considerado, por Mederos (1991), por Santos e colaboradores (1993), por Cardoso e Oliveira (1996),

por Moura (1998) e por Pretto e Santarém (2000), um sistema de micropropagação bastante aconselhável. Este método proporciona a obtenção de um número elevado de plantas, bem como uma produção rápida de plantas. A multiplicação e o enraizamento, de algumas espécies, podem ocorrer no mesmo meio o que facilita a utilização deste método.

## 2.2. Enraizamento de rebentos caulinares de *Hypericum androsaemum*

Dos agregados de rebentos caulinares de *Hypericum androsaemum* obtidos, após a 1ª subcultura, foram separados e individualizados os rebentos que apresentavam maior vigor. Posteriormente, foi feita a sua transferência para um meio novo, meio de enraizamento, com a composição base MS/B5, a meia força, sacarose a 2% e suplementado só com o regulador de crescimento IBA, na concentração de 0,2 mg/L. A citocinina IBA é, na generalidade, referenciada como um regulador de crescimento eficiente para a promoção de enraizamento *in vitro* (Selvakumar et al., 2001).

Decorridas 2-3 semanas, contadas a partir do início da 2ª subcultura, verificou-se um aumento em tamanho das estruturas caulinares e a indução de raízes, conforme se pode observar na Figura 36. O meio com IBA pode, assim, ser considerado um meio com eficiência no enraizamento considerando que o número total de rebentos produzidos por explante e transferidos formaram na generalidade raízes.

Comparando o nosso trabalho com os trabalhos realizados para o enraizamento de estruturas caulinares de outras espécies de *Hypericum*, verificamos que, à semelhança do descrito para *Hypericum androsaemum*, também o enraizamento em *Hypericum canariense* (Mederos, 1991) foi conseguido em meio com macronutrientes de MS, a meia força e com IBA. No entanto, este autor também verificou o efeito positivo de NAA no processo de enraizamento.

Resultados semelhantes foram descritos para o enraizamento de estruturas caulinares de *Hypericum linarifolium* (Santos et al., 1993), embora estas estruturas tivessem tido origem noutra tipo de explante.

O papel positivo de IBA no processo de enraizamento foi também demonstrado em *Hypericum perforatum*. Pretto e Santarém (2000) referiram que os rebentos caulinares obtidos a partir do tecido caloso foram enraizados em todos os meios

O papel positivo de IBA no processo de enraizamento foi também demonstrado em *Hypericum perforatum*. Pretto e Santarém (2000) referiram que os rebentos caulinares obtidos a partir do tecido caloso foram enraizados em todos os meios avaliados, embora as percentagens mais elevadas fossem obtidas em meio MS, a meia força, independentemente da presença ou não, de IBA. No entanto, uma redução ligeira na formação de raízes foi observada em meio MS, na ausência de IBA. A presença de IBA no meio de enraizamento, de *Hypericum perforatum*, parece ter tido efeito no número de raízes induzidas por rebento, tendo o número de raízes sido mais elevado, na presença deste regulador. As raízes induzidas em meio contendo IBA são mais espessas e mais ramificadas enquanto que as induzidas sem IBA são mais finas e mais longas.

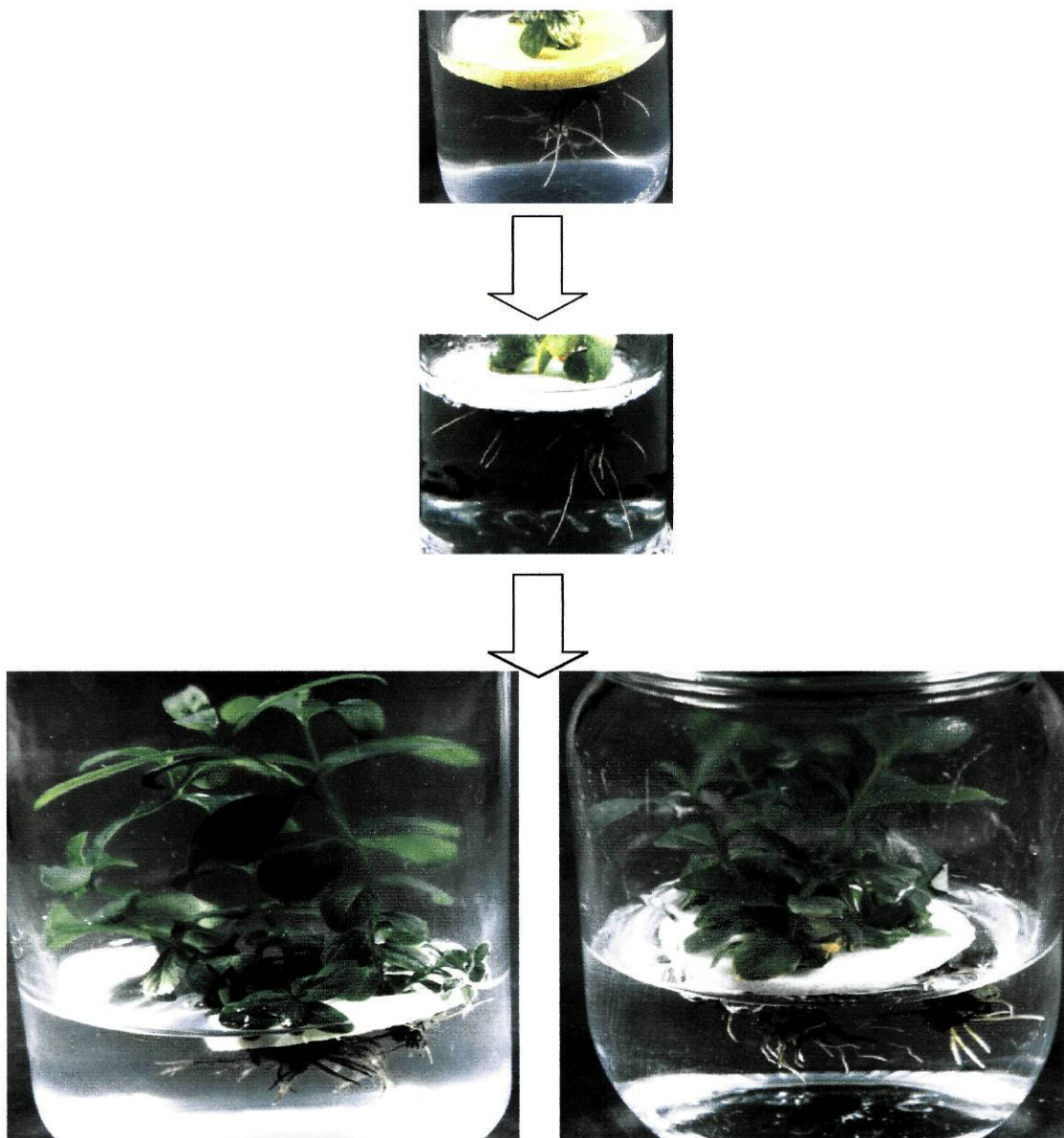
Pelo contrário, em *Hypericum foliosum* (Moura, 1998), o enraizamento não foi promovido pela adição de IBA nem de qualquer outro regulador de crescimento. A ausência de enraizamento para todos os reguladores de crescimento testados pode, segundo a autora, ser explicada pelo facto deste ser realizado em estruturas caulinares originadas a partir de explantes excisados de plantas estabelecidas no campo. Embora tenham sido usadas plantas, com um ciclo de crescimento como fonte preferida de explantes, o seu grau de diferenciação é mais elevado do que o das plântulas obtidas por germinação das sementes, aumentando, então, a dificuldade no enraizamento *in vitro*.

As plântulas com maior vigor, de *Hypericum androsaemum*, com raízes obtidas em meio sólido durante a 2<sup>a</sup>. subcultura foram transferidas para meio líquido MS/B5, sem reguladores de crescimento e sem sacarose. Esta transferência promoveu o crescimento e o desenvolvimento de raízes e assegurou, assim, uma elevada taxa de sobrevivência das plântulas após a sua transplantação.

As mesmas plântulas permaneceram neste meio líquido, cerca de 2-3 semanas, tendo sido possível observar durante este período de tempo o aumento de tamanho das estruturas caulinares e o desenvolvimento das raízes (Figura 39). Quando estas plântulas apresentaram, então, um tamanho e raízes suficientemente desenvolvidas, foram mudadas para um substrato terroso, constituído por uma mistura de terra com húmus. O impacto da transplantação teve sucesso uma vez que o desenvolvimento das plântulas continuou a realizar-se normalmente.

Em *Hypericum androsaemum* foi testado como meio de indução de raízes o meio MS, a meia força, suplementado com 0,2 mg/L de IBA, o qual se mostrou ser

eficiente. Entretanto, o crescimento e a multiplicação de raízes foi conseguido, positivamente, em meio líquido MS/B5, sem IBA e sem sacarose. De salientar que os segmentos nodais utilizados foram excisados a partir de plântulas jovens de *Hypericum androsaemum*, resultantes da germinação de sementes *in vitro*. Nestas plântulas o grau de diferenciação é relativamente baixo o que possivelmente tornou positivo o enraizamento promovido pelo IBA. Esta explicação tem como base o trabalho realizado com *Hypericum foliosum* (Moura, 1998), no qual foram usadas, como fonte de explantes, plantas estabelecidas no campo, já com um grau de diferenciação significativo o que segundo a autora e, como já foi referido, explica o efeito negativo do IBA e do NAA, no enraizamento.



**Figura 39** – Proliferação de raízes, em meio líquido MS/B5, sem reguladores de crescimento e sem sacarose. Notar o aumento do número e o engrossamento de raízes.

### 2.3. Transplante e aclimatização

As plântulas de *Hypericum androsaemum* desenvolvidas *in vitro* foram finalmente transferidas para condições *ex vitro*, sendo então, nesta etapa, plantadas em vasos com uma mistura de terra e de turfa. Depois de se ter procedido à transferência das plântulas para vasos, estes foram ainda mantidos na câmara de cultura, e debaixo de uma cobertura plástica (Figura 40). Deste modo, foi possível que a fase de aclimatização se processasse convenientemente proporcionando-se de forma gradual um aumento de intensidade luminosa e uma diminuição da humidade relativa e da temperatura. Observou-se que as plântulas tinham uma sobrevivência elevada desde que a terra se mantivesse com uma humidade relativamente elevada.

A sobrevivência das plântulas que entretanto continuaram a crescer, manteve-se elevada mesmo quando foi retirada a cobertura plástica (Figura 41).

Passadas duas semanas de permanência na câmara de crescimento as plantas já começaram a aparentar um certo vigor o que iria garantir sucesso na adaptação ao meio ambiente exterior. Foram, então, transferidas primeiro para uma estufa e posteriormente para o ar livre (Figura 42), de modo a completar-se o seu ciclo de desenvolvimento. A evocação floral verificou-se em Maio (Figura 43), e em Julho deu-se o aparecimento dos frutos (Figura 44). Estes mais tarde amadureceram, adquiriram a cor negra e libertaram as sementes.

A metodologia que acabamos de descrever permitiu, com sucesso, a multiplicação *in vitro* de *Hypericum androsaemum* através da proliferação de rebentos axilares.

Este método de propagação que implica a abolição da dominância apical, da qual resulta uma activação e multiplicação dos gomos axilares, tem sido utilizada para a propagação em larga escala de várias plantas (Rani e Raina, 2000). Estudos efectuados sobre a regeneração de plantas a partir destas regiões meristemáticas mostraram que a variação somaclonal é mínima (Illg, 1990), podendo obter-se plantas completas num intervalo de tempo relativamente curto. Comparativamente a outros métodos de micropropagação, a estabilidade genética das plantas micropropagadas por esta via é significativamente superior, só comparável ao das plantas obtidas por embriogénese somática directa (Gratapaglia e Machado, 1990; Rani e Raina, 2000 e citações aí referidas).



**Figura 40** – Aclimatização. Plântulas na câmara de crescimento, com cobertura de plástico para evitar alterações rápidas do ambiente físico de cultura.



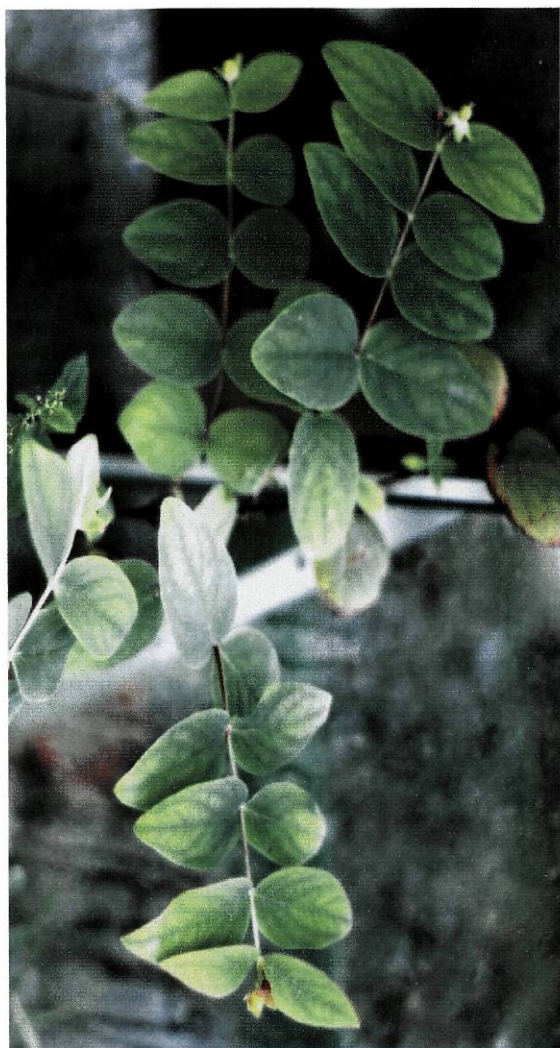
**Figura 41** – Plantas sem cobertura plástica, na câmara de crescimento.



**Figura 42** – Plantas em aclimatização na câmara de crescimento e apresentando vigor suficiente para serem transplantadas para a estufa exterior.



**Figura 43** – Planta a completar o seu ciclo de vida de desenvolvimento em condições *ex vitro*.



**Figura 44** - A) Pormenor da planta em crescimento *ex vitro*.  
B) Aspecto da flor.  
C) Fruto em formação, inicialmente com uma cor clara mas que posteriormente adquire a cor negra.

## CONCLUSÃO

Para cada espécie e de acordo com o objectivo de investigação vários trabalhos têm sido realizados. Muitas espécies de plantas são capazes de regeneração quer por organogénese quer por embriogénese somática, mas poucas espécies são capazes de sofrer regeneração por ambos os processos. Algumas espécies são facilmente regeneradas a partir de tecido caloso ou de cultura de células enquanto outras são regeneradas somente por um processo de rebentos adventícios (Phillips e Hubstenberger, 1995).

De acordo com o objectivo principal proposto, o nosso trabalho desenvolvido com *Hypericum androsaemum*, permitiu definir as condições de cultura para a micropropagação desta espécie. A propagação *in vitro* pode ser facilmente obtida, em *H. androsaemum*, pela via da proliferação de rebentos a partir de nódulos axilares. A regeneração de rebentos foi efectivamente induzida em segmentos nodais (fragmentos de caule com nódulos simples) inoculados no meio base MS/B5 suplementado com diferentes concentrações de BA (0,1, 0,2, 0,5 e 1,0 mg/L). Este regulador de crescimento, BA, ao fim de 2-3 semanas, possibilitou a multiplicação de gomos e posterior desenvolvimento de estruturas caulinares. É interessante notar que o aumento de concentração de BA no meio não afectou significativamente a regeneração. Esta citocinina não promoveu o enraizamento. Os rebentos caulinares enraizaram facilmente após transferência para o mesmo meio base MS/B5, a meia força, com sacarose a 2% e suplementado com 0,2 mg/L IBA. A utilização de uma citocinina exógena, com concentração baixa pode levar a pensar que a auxina endógena era elevada. O enraizamento foi efectuado em meio sólido. Posteriormente, o aumento do número, do tamanho e engrossamento das raízes foi realizado em meio líquido, sem reguladores de crescimento e sem sacarose.

De referir que durante o estabelecimento dos explantes foi necessário eliminar os compostos fenólicos exsudados para o meio de cultura o que foi conseguido usando como anti-oxidante, o ácido ascórbico. Assim, a utilização de um anti-oxidante, tornou possível aumentar significativamente a quantidade de plantas produzidas.

Quando se utilizaram como explantes fragmentos de caule e folha, foram testados alguns reguladores de crescimento. As auxinas NAA e 2,4-D, em diferentes concentrações, foram associadas a diferentes concentrações de BA e KIN. Em alguns meios de cultura foi adicionado, isoladamente, o 2,4-D em concentração de 1,0, 2,0 e 3,0 mg/L. Nestes meios testados só foi possível obter tecido caloso, embora a quantidade de tecido caloso apresenta-se variações no seu aspecto e cor. Em todos os meios em que estavam presentes os reguladores de crescimento NAA associado a KIN, foi possível observar a formação de raízes e a diminuição da produção de tecido caloso. Num dos meios com 1,0 mg/L de 2,4-D e 1,0 mg/L também se verificou uma manifestação muito ligeira de organogénese radicular. Outras duas excepções foram o meio com 0,1 mg/L de NAA adicionado a 1,0 mg/L de BA e o meio com 0,1 mg/L de 2,4-D adicionado a 1,0 mg/L de BA, em que houve obtenção de pouca quantidade de tecido caloso e obtenção de rebentos, embora com pouco sucesso. Os reguladores, NAA, 2,4-D, BA e KIN, utilizados mostraram a não eficiência na regeneração de *H. androsaemum*, uma vez que não levaram à indução controlada da competência nos explantes usados. Por outro lado, os explantes de folha e caule não mostraram competência embriogénica ou organogénica.

O insucesso encontrado na resposta morfogenética dos explantes de folha e caule, de *Hypericum androsaemum*, nos vários meios acima referidos, aponta a necessidade de se ensaiarem outros reguladores, nomeadamente o TDZ, que permitiu a regeneração de plantas de *Hypericum perforatum* a partir de culturas de hipocótilo, quando outros reguladores testados, como por exemplo a BA e o IAA, não foram eficazes (Murch et al., 2000a). O TDZ é um regulador sintético potente e é altamente efectivo na morfogénese *in vitro*, podendo ser usado para induzir uma série de respostas de diferenciação e desdiferenciação (Murthy et al., 1998). Pensa-se que este regulador possa modular a actividade hormonal endógena (Benson, 2000).

O ácido ascórbico também poderá ser empregue em trabalhos futuros com a espécie deste trabalho dado que, em algumas espécies, o seu uso levou a um aumento de organogénese (Joy et al., 1988).

O estudo da acção do etileno produzido pelas culturas *in vitro* também não seria de colocar de lado dado que pode ser um factor de recalcitrância. O etileno está

envolvido em muitas respostas de morfogénese e tanto pode promover como inibir a morfogénese (Benson, 2000).

Será também importante verificar a resposta de outros tipos de explantes e mesmo de explantes em diferentes estádios fisiológicos de desenvolvimento, de modo a tentar testar outros métodos de micropropagação.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

---

**BIBLIOGRAFIA**

- Ahmed, M. A., El-Mawla, A., Schmidt, W., Berhues, L.. 2001. Ciannamic acid is a precursor of benzoic acids in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. but not in cell cultures of *Centaureum erythrea* RAFN. *Planta*. **212**:288-293.
- Akamatsu, K.. 1966. In Wakanyaku. Ishiyaku Publications. Tokyo. Citado por Yazaki, K., Okuda, T. (1990).
- Alford, C. A., Britt, W. J.. 1990. Cytomegalovirus. In Fields, B. N., Knipe, D. M. (ed). Raven Press. New York. *Virology*. 2nd ed, Pp 1981-2100. Citado por Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M. (1998).
- Anderson, L. A., Phillipson, J. D.. 1986. *Pharmacology Journal*. **236**:303.
- Anker, L., Gopalakrishna, R., Jones, K. D., Law, E. R., Couldwell, W. T.. 1995. Hypericin in adjuvant tumor therapy. *Drugs of the future*. **20**:511-517.
- Arrigoni, O.. 1994. Ascorbate system in plant development. *J. Bioenerg. Biomem..* **26**:407-419.
- Arrigoni, O., De Gara, L., Tommasi, F., Liso, R.. 1992. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L.. *Plant Physiology*. **99**:235-238
- Axarlis, S., Mentis, A., Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Marselos, M., Malamas, M.. 1998. Antiviral *In vitro* of *Hypericum perforatum* L. Extract on the Human Cytomegalovirus (HCMV). *Phytotherapy Research*. **12**:507-511.
- Ball, E.. 1946. Development in sterile culture of stems tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. *Am. Journal Bot.* **33**:301-318.
- Barnard, D. L., Huffmann, J. H., Morris, J. L., Wood, S. G., Hughes, B. C., Sidwell, R. W.. 1992. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinones derivatives gainst human cytomegalovirus. *Antiviral Res..* **17**:63-77.
- Beerhues L., Barillas, W., Peters, S., Schmid, W.. 1997. Recent research developments in phytochemistry 1, Xanthone biosynthesis in plant cultures. In Padalai, S. G., Ed.. Research Signpost. *Trivandrum*. Pp 69-76. Citado por Schmidt, W., Abd El-Mawla, A. M. A., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Beerhues, L. (2000a).
- Bennett, G. J., Lee, H. H.. 1988. The biosintesis of magostin: the origin of the xanthone skeleton. *J. Chem. Soc. Chem. Commun..* Pp 619-620.
- Bennett, G. J. e Lee, H. H.. 1989. Xanthones from Guttiferae. *Phytochemistry*. N° 4, **28**:967-998.

- Benson, Erica E.. 2000. Special symposium: *In vitro* Plant recalcitrance. *In vitro* Plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* **36**:141-148.
- Bone, K.. 1994. The herbal treatment of viral infections. *Eur. J. Herbal Med.* **1**:23-28.
- Bork, P. M., Bacher, S., Schmitz, M. L., Kaspers, U., Heinrich, M.. 1999. Hypericin as a Non-Antioxidante Inhibitor of NF-kB. *Planta Medica.* **65**:297-300.
- Boxus, P. H., Quoirin, M., Laine, J. M.. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In Reinert, J., Bajaj, O. L.. Springer-Verlag. Berlin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods.* Pp 131-143.
- Brevoort, P.. 1998. The blooming U.S. botanical market: a new overview. *Herbalgram.* **44**:33-46. Citado por Briskin, D. P. (2000).
- Briskin, D. P.. 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology.* **124**:507-514.
- Brown, D. C. W., Leung, D. W. M., Thorpe, T. A.. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.* **46**:36-41. Citado por Brown, D. C. W. e Thorpe, T. A. (1986).
- Brown, D. C. W., Thorpe, T. A.. 1986. Plant Regeneration by Organogenesis. In Vasil, I. K.. Ed. Academic Press, Inc.. Florida. *Cell culture and somatic cell genetics of plants.* Volume 3. Pp 49-60.
- Büter, K. B., Büter, B., Schaffner, W.. 1994. *In vitro* propagation of *Hypericum perforatum*: impact of thidiazuron and 6-benzyloaminopurine. Italy. *Abstracts of the VIII IAPTC Congress.* Pp 62.
- Butterweck, V., Petereit, F., Winterhoff, H., Nahrstedt, A.. 1998. Solubilized hypericin and pseudohypericina from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica.* **64**:291-294.
- Butterweck, V., Jürgenliemk, G., Nahrsted, A., Winterhoff, H.. 2000. Flavonoids from *Hypericum perforatum* Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test. *Planta Medica.* **66**:3-6.
- Canhoto, J.. 1994. *Feijoa sellowiana* Berg (Myrtaceae): Estudos sobre Embrigénese Somática e outros tipos de morfogénese. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para obter o grau de Doutor em Biologia, especialidade em Fisiologia Vegetal.
- Capasso, F., Grandolini, G.. 1999. Uso rationale delle droghe vegetali. 2nd ed. Milano. Springer-Verlag Italia. *Fitofarmacia.*
- Capasso, R., Izzo, A. A., Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., Mascolo, N.. 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicines. Eds Elsevier Science. *Fitoterapia.* **71**: 58-65.

