



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Micropropagação de *Bupleurum* spp. e avaliação da atividade anti-inflamatória dos seus óleos essenciais.



Pedro Miguel Pereira Correia

2013



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Micropropagação de *Bupleurum* spp. e avaliação da atividade anti-inflamatória dos seus óleos essenciais.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro Silva Couto (Universidade de Coimbra) .

Pedro Miguel Pereira Correia

2013



Aos meus pais e ao meu irmão, apesar de distantes estão sempre presentes.

À Ana.

## **Agradecimentos**

Ao terminar este trabalho não posso deixar de agradecer às pessoas que por diversas formas tornaram possível a sua concretização.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, ao Doutor Jorge Canhoto e à Doutora Lúcia Salgueiro, pela disponibilidade, apoio e orientação.

À Doutora Mónica Zuzarte, pela ajuda constante durante todo o trabalho e sobre tudo pela paciência, simpatia e incentivo.

Ao Doutor Dias e ao Doutor Augusto Dinis, pela ajuda em assuntos relacionados com microscopia.

À D. Eulalia Rosa, pela simpatia e por todo o auxílio prestado.

Ao Sr. Arménio Matos pela ajuda nas colheitas de material vegetal.

Ao Sr. José Brasão pela realização de cortes histológicos.

Aos meus colegas de laboratório pela boa disposição, companheirismo, ajuda e amizade.

Por fim aos Doors, ao Jimmy Page, ao Hendrix etc... pela virtuosidade e inspiração e ao Rui Costa pela ajuda motivacional na reta final do trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
ABREVIATURAS.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Contextualização do trabalho .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Género <i>Bupleurum</i>.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Caracterização, distribuição geográfica e importância económica.....	3
<b>1.3. Metabolitos secundários .....</b>	<b>5</b>
1.3.1. Óleos essenciais .....	8
1.3.1.1. Atividade anti-inflamatória .....	10
<b>1.4. Cultura <i>in vitro</i> .....</b>	<b>12</b>
1.4.1. Proliferação de meristemas.....	14
1.4.2. Embriogénese somática .....	15
<b>1.5. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Material vegetal.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Óleos essenciais.....</b>	<b>21</b>
2.2.1. Extração dos óleos essenciais .....	21
2.2.2. Atividade anti-inflamatória .....	21
2.2.2.1. Linha celular.....	21
2.2.2.2. Inibição da produção de NO.....	22
2.2.2.3. Viabilidade celular.....	22
<b>2.3. Culturas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>23</b>
2.3.1. Meio de cultura.....	23
2.3.2. Desinfecção do material vegetal.....	23
2.3.3. <i>Bupleurum rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i> .....	24
2.3.3.1. Germinação de sementes.....	24
2.3.3.2. Cultura de embriões zigóticos.....	25
2.3.3.3. Proliferação de meristemas.....	25

2.3.4. <i>Bupleurum gerardi</i> .....	26
2.3.4.1. Germinação de sementes.....	26
2.3.4.2. Proliferação de meristemas.....	26
2.3.4.3. Floração <i>in vitro</i> .....	26
2.3.5. <i>Bupleurum fruticosum</i> .....	26
2.3.5.1. Proliferação de meristemas.....	26
2.3.6. Embriogênese somática.....	27
<b>2.4. Microscopia</b> .....	27
2.4.1. Caracterização das estruturas secretoras.....	27
2.4.1.1. Microscopia ótica.....	28
2.4.1.1.1. Cortes histológicos.....	28
2.4.1.1.2. Caracterização histoquímica.....	28
2.4.1.2. Microscopia eletrônica de varrimento .....	29
2.4.2. Caracterização da floração <i>in vitro</i> .....	30
<b>2.5. Análise estatística</b> .....	30
<b>3. Resultados</b> .....	31
<b>3.1. Extração dos óleos essenciais</b> .....	32
<b>3.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória</b> .....	32
3.2.1. Óleo essencial de <i>Bupleurum fruticosum</i> I (BFI) .....	33
3.2.2. Óleo essencial de <i>Bupleurum fruticosum</i> II (BFII) .....	35
3.2.3. Óleo essencial de <i>Bupleurum rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i> I (BRI).....	36
3.2.4. Óleo essencial de <i>Bupleurum rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i> II (BRII).....	38
<b>3.3. Culturas <i>in vitro</i></b> .....	39
3.3.1. <i>Bupleurum rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i> .....	39
3.3.1.1. Germinação de sementes.....	39
3.3.1.2. Proliferação de meristemas .....	40
3.3.1.3. Proliferação de meristemas provenientes da germinação de embriões zigóticos.....	41
3.3.2. <i>Bupleurum gerardi</i> .....	42
3.3.2.1. Germinação de sementes.....	42
3.3.2.2. Proliferação de meristemas.....	42
3.3.2.3. Floração <i>in vitro</i> .....	43

3.3.3. <i>Bupleurum fruticosum</i> .....	47
3.3.3.1. Proliferação de meristemas.....	47
3.3.4. Embriogênese somática.....	49
<b>3.4. Estruturas secretoras.....</b>	<b>50</b>
3.4.1. <i>Bupleurum rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i> .....	51
3.4.2. <i>Bupleurum fruticosum</i> .....	51
3.4.3. <i>Bupleurum gerardi</i> .....	54
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Extração dos óleos essenciais.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Atividade anti-inflamatória.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3. Culturas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>58</b>
4.3.1. <i>Bupleurum rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i> .....	59
4.3.2. <i>Bupleurum gerardi</i> .....	61
4.3.3. <i>Bupleurum fruticosum</i> .....	62
4.3.4. Embriogênese somática.....	62
<b>4.4. Estruturas secretoras.....</b>	<b>63</b>
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1. Conclusões .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2. Perspetivas futuras.....</b>	<b>66</b>
<b>6. Referências bibliográficas .....</b>	<b>68</b>

## RESUMO

Algumas espécies do género *Bupleurum* L. contêm metabolitos secundários que apresentam atividade biológica e valor comercial. No entanto, apesar de apresentar grande diversidade, poucos estudos foram efetuados nas espécies deste género presentes em Portugal. O presente trabalho visa a valorização das espécies de *Bupleurum* que crescem espontaneamente em Portugal, estudando o potencial anti-inflamatório dos seus óleos essenciais e desenvolvendo protocolos de micropropagação *in vitro* de algumas espécies presentes na região da Beira Litoral.

A extração dos óleos essenciais de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. lancifolium* foi realizada através de hidrodestilação. A análise da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. fruticosum* foi realizada, utilizando várias concentrações (0,16-0,64  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) de duas amostras de óleo essencial de *B. fruticosum* (BFI e BFII) e duas amostras de óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* (BRI e BRII), avaliando o efeito destes na produção de NO e citotoxicidade em linhas celulares de macrófagos de rato (Raw 264,7) estimuladas por LPS. A cultura *in vitro* de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum* foi estabelecida via proliferação de meristemas e embriogénese somática, utilizando o meio de cultura MS com diferentes concentrações de benzilamino-purina (BAP) e ácido 3-indol acético (IAA). A caracterização das estruturas secretoras foi efetuada com base em observações em microscopia ótica (MO) e microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e as suas secreções analisadas a partir de testes histoquímicos.

A hidrodestilação permitiu a extração do óleo essencial de partes aéreas floridas de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, no entanto, não foi possível isolar o óleo de partes aéreas em flor e frutos secos de *B. lancifolium*. Os resultados da atividade anti-inflamatória permitiram identificar o efeito inibitório na produção de NO da amostra BRI na concentração de 0,64  $\mu\text{l ml}^{-1}$ . Na micropropagação a adição de 1,0  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP e 0,5  $\text{mg l}^{-1}$  IAA, ao meio de cultura MS, foi a mais eficiente na multiplicação de rebentos de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, em *B. fruticosum* a adição de 1,5  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP e 1,0  $\text{mg l}^{-1}$  IAA permitiu a multiplicação dos explantes. O enraizamento das plântulas formadas foi possível após o cultivo durante 2 semanas em meio de cultura MS com 1,0  $\text{mg l}^{-1}$  de ácido 3-indol butírico (IBA) e 2 semanas em meio de cultura sem reguladores de crescimento. A proliferação de meristemas de *B. gerardi* foi possível em meio de cultura com e sem a adição de BAP. No entanto, nesta espécie observou-se floração *in vitro* e a adição de BAP demonstrou ter um efeito positivo na floração dos explantes. A indução de embriogénese somática, através de secções foliares de plantas estabelecidas *in vitro*, realizou-se com base num protocolo constituído por duas fases: inicialmente massas proembriogénicas formaram-se em meio MS suplementado com 1,0  $\text{mg l}^{-1}$  de ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D), 0,2 mg l<sup>-1</sup> de Cinetina (KN) e o desenvolvimento de embriões somáticos a partir destas ocorreu somente em meio de cultura sem reguladores de crescimento. A caracterização das estruturas secretoras permitiu identificar canais secretores em *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum* e a identificação de secretados terpénicos em plantas *in vitro*.

Os resultados obtidos permitiram, pela primeira, vez identificar o efeito anti-inflamatório do óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, estabelecer culturas *in vitro* de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e a proliferação via embriogénese somática de *B. fruticosum*. A identificação da presença de compostos terpénicos em plantas estabelecidas *in vitro* comprova a capacidade destas produzirem compostos desta natureza.

**Palavras-chave:** canais secretores; embriogénese somática; floração; inibição de NO; proliferação de meristemas.

## ABSTRACT

Some species of the genus *Bupleurum* L. contain secondary metabolites with biological activity and commercial value. However, despite the great biodiversity, few studies have been performed in species of this genus present in Portugal. This work aims to value species of *Bupleurum* growing spontaneously in Portugal by studying the anti-inflammatory potential of their essential oils and developing protocols for *in vitro* micropropagation of some species present in Beira Litoral region.

The essential oil extraction of *B. rigidum* subsp. *paniculatum* and *B. lancifolium* was performed by hydrodistillation. The anti-inflammatory activity of the essential oils of *B. rigidum* subsp. *paniculatum* and *B. fruticosum* was evaluated using different concentrations (0.16-0.64  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) of two samples of *B. fruticosum* essential oil (BFI and BFII) and two samples of *B. rigidum* subsp. *paniculatum* essential oil (BRI and BRII), by testing their effect on NO production in a macrophages cell line (Raw 264.7) stimulated with LPS. *In vitro* cultures of *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* and *B. fruticosum* were evaluated by shoot proliferation and somatic embryogenesis, in MS culture medium supplemented with different concentrations of BAP and IAA. The secretory structures of these species were examined by LM and SEM and their secretion analyzed through histochemical tests.

Hydrodistillation allowed the extraction of essential oils from the flowering aerial parts of *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, but was unable to isolate the oils from the flowering aerial parts and dried fruits of *B. lancifolium*. The results of the anti-inflammatory activity showed that BRI at 0.64  $\mu\text{l ml}^{-1}$  had an inhibitory effect on NO production. Regarding *in vitro* cultures, MS medium supplemented with 0.5  $\text{mg l}^{-1}$  IAA and 1.0  $\text{mg l}^{-1}$  BAP resulted in the best multiplication rate of *B. rigidum* subsp. *paniculatum*; in *B. fruticosum* the best results were achieved with the addition of 1.0  $\text{mg l}^{-1}$  IAA and 1.5  $\text{mg l}^{-1}$  BAP to the culture medium and root formation gave the best results in two weeks culture in MS medium supplemented with 1.0  $\text{mg l}^{-1}$  IBA and two weeks culture in hormone-free medium. Shoot proliferation of *B. gerardi* was achieved in MS medium with or without BAP, however in this species, *in vitro* flowering was observed and the addition of BAP to the culture medium showed a positive effect in *in vitro* flowering. Somatic embryogenesis induction, using leaf sections of *in vitro* plantlets, was achieved in two steps: first the formation of proembryogenic masses occurred in MS medium with 1.0  $\text{mg l}^{-1}$  2,4-D and 0.2  $\text{mg l}^{-1}$  KN and only after transfer to hormone-free medium the somatic embryos were formed. The secretory structures were identified as secretory ducts in several tissues of *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* and *B. fruticosum* and the histochemical tests revealed the presence of terpenic compounds in these structures.

For the first time the anti-inflammatory effect of the essential oil of *B. rigidum* subsp. *paniculatum* was identified and *in vitro* cultures of *B. gerardi* and *B. rigidum* subsp. *paniculatum* were successfully established. Also, somatic embryogenesis induction in *B. fruticosum* was achieved and the identification of terpenic compounds in *in vitro* plantlets proved their capacity to produce essential oils in early stages of development.

**Keywords:** flowering; NO inhibition; secretory ducts; shoot proliferation; somatic embryogenesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2,4-D** - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

**AC**- Carvão ativado.

**BAP** - Benzilamino-purina.

**BFI**- Óleo essencial de *Bupleurum fruticosum* I.

**BFII**- Óleo essencial de *Bupleurum fruticosum* II.

**BRI**- Óleo essencial de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum* I.

**BRII**- Óleo essencial de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum* II.

**CDEI**- Células determinadas embriogenicamente por indução.

**CEPD**- Células embriogénicas pré-determinadas.

**CGL** - Cromatografia gás-líquido.

**COX**- Cicloxigenase.

**CGL-EM** - Cromatografia gás-líquido- Espectrometria de massa.

**DMEM**- Dulbecco's modified eagle medium.

**FAA**- Formalina-aceto-álcool.

**IAA** - Ácido 3-indol acético.

**IBA**- Ácido 3-indol butírico.

**iNOS**- Óxido nítrico-sintase induzida.

**JBUC** - Jardim Botânico da Universidade de Coimbra.

**KN**- Cinetina.

**LPS**- Lipopolissacarídeo

**LOX**- Lipoxigenase.

**MEP**- Metileritritol fosfato.

**MS**- Meio de Murashige & Skoog (1962).

**MTT**- Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.

**MVA**- Mevalonato.

**NAA**- Ácido-1-naftaleno acético.

**NF- $\kappa$ B**- Fator de transcrição nuclear kappa B

**NO**- Óxido nítrico.

**PAM**- Plantas aromáticas e medicinais.

**PGE2**- Prostaglandina E2

**MO**- Microscopia ótica

**SEM**- Microscopia eletrônica de varrimento.

**TNF $\alpha$** - Fator de necrose tumoral alfa.

**TRIA**- Triacontanol.



# 1. INTRODUÇÃO



### 1.1. Contextualização do trabalho

A nível global, cerca de 12,5 % (52000 espécies) das plantas vasculares são utilizadas para fins medicinais. Apesar da grande procura e utilização, o cultivo para produção comercial de plantas aromáticas e medicinais (PAM) não excede poucas centenas de espécies, grande parte delas provenientes de colheitas espontâneas ( WHO, IUCN, & WWF., 1993). Devido à grande procura, a colheita de plantas nem sempre é feita de forma sustentável e muitas das populações e dos habitats onde as PAM existem encontram-se ameaçados.

A Flora Portuguesa é particularmente rica em espécies aromáticas e medicinais. Das cerca de 3800 espécies que compõem a cobertura vegetal do Continente, Açores e Madeira, cerca de 500 são consideradas aromáticas e/ou medicinais (Figueiredo *et al.*, 2007). Apesar da utilização de muitas destas espécies estar fortemente enraizada nos hábitos das populações o seu potencial bioativo é ainda, em grande parte, desconhecido.

Neste contexto, é de grande importância estudar o potencial bioativo das PAM da flora portuguesa, elucidar os seus mecanismos de ação e avaliar a viabilidade da utilização destas plantas para a produção de compostos bioativos em larga escala. É igualmente de extrema importância desenvolver metodologias que permitam o cultivo de PAM de forma a minimizar o efeito da sua colheita massiva e a consequente destruição dos habitats naturais. Assim, desenvolveu-se um trabalho de investigação, o qual visou associar a pesquisa de compostos naturais voláteis e a avaliação da sua atividade terapêutica com o estudo das estruturas secretoras das plantas e metodologias de propagação de plantas *in vitro*, de um grupo de espécies de plantas aromáticas incluídas no género *Bupleurum* L.

O Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra e o Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da mesma Universidade têm um longo historial de colaboração no estudo de PAM, tendo nos últimos anos estado envolvidos em trabalhos conjuntos de multiplicação *in vitro* e caracterização dos óleos de várias espécies da flora portuguesa, em particular de espécies do género *Lavandula* e de diversas taxa da família Apiaceae. O presente trabalho é mais um resultado do esforço conjunto das duas instituições no âmbito desta cooperação.

## 1.2. Género *Bupleurum*

### 1.2.1. Caracterização, distribuição geográfica e importância económica

O género *Bupleurum* está representado por cerca de 180 *taxa*, o que o torna um dos géneros mais representativos da família Apiaceae (Umbelliferae). O nome do género tem origem na palavra latina *boupleurum* (*bous* = boi e *pleura/on* = costelas), que descreve a forma das suas raízes, uma das partes da planta muito utilizada na medicina popular (Ashour & Wink, 2011).

Neste género incluem-se plantas anuais e perenes, de morfologia bastante diversa e que podem divergir bastante no tamanho, podendo referir-se como exemplos a espécie *Bupleurum semicompositum* que não ultrapassa poucos centímetros e *Bupleurum fruticosum* que pode atingir 3m. Todas as espécies deste género têm folhas simples, longas, estreitas, alternadas e geralmente paralelinérveas. São glabras e as suas flores bissexuais, amarelas ou raramente de cor púrpura, com 5 estames. Brácteas involucrais e bractéolas geralmente presentes, e os seus frutos são formados por dois mericarpos sendo-lhes atribuída a designação de cremocarpos. (Neves, 2003; Neves & Watson, 2004; Ashour & Wink, 2011).

As plantas deste género encontram-se distribuídas essencialmente no hemisfério norte, Ásia, Europa, América do Norte, Norte de África, Ilhas Canárias e Madeira. No entanto, apesar da larga distribuição, a maior parte das espécies são raras e encontram-se restritas a pequenas áreas. Apesar de crescerem em diferentes habitats, desde o nível do mar até mais de 4000 metros de altitude, em solos salinos, calcários, basálticos e graníticos, ao nível morfológico e de número de *taxa* a maior diversidade ocorre na região mediterrânica (Neves & Watson, 2004).

Em Portugal estão representados 10 *taxa* (Tabela 1), 5 dos quais estão presentes na Beira Litoral: *B. gerardi* All., *B. rigidum* subsp. *paniculatum* Brot. H. Wolff. (Fig.1) e *B. fruticosum* L. (Fig.2A), *B. lancifolium* Hornem. (Fig.2B), *B. tenuissimum* L. (Neves, 2003; Neves & Watson, 2004; Maxia *et al.*, 2011).



**Figura 1.** *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum*. **A-** Planta juvenil. **B-** Parte aérea em antese.



**Figura 2.** *Bupleurum* spp. **A-** Parte aérea de um arbusto de *B. fruticosum* na altura da antese. **B-** Parte aérea de uma planta de *B. lancifolium* em antese.

**Tabela 1.** Distribuição geográfica dos diferentes *taxa* do género *Bupleurum* em Portugal.

<b>Taxon</b>	<b>Localização (Região)</b>
<i>B. acutifolium</i> Boiss.	Baixo Alentejo
<i>B. fruticosum</i> L.	Algarve, Beira Litoral, Estremadura
<i>B. gerardi</i> All.	Beira Litoral, Estremadura, Trás-os-Montes
<i>B. lancifolium</i> Hornem.	Alto Alentejo, Algarve, Baixo Alentejo, Beira Litoral, Douro litoral, Estremadura, Ribatejo
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i> (Brot.) H. Wolff	Alto Alentejo, Algarve, Beira Litoral
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>rigidum</i> L.	Alto Alentejo, Estremadura, Ribatejo
<i>B. rotundifolium</i> L.	Minho
<i>B. salicifolium</i> R.Br.	Madeira
<i>B. semicompositum</i> L.	Algarve, Beira Alta, Estremadura, Ribatejo
<i>B. tenuissimum</i> L.	Baixo Alentejo, Beira litoral, Estremadura, Ribatejo

As raízes de numerosas espécies de *Bupleurum* (e. g. *Radix Bupleuri*) são utilizadas na medicina tradicional chinesa há mais de 2000 anos, sendo utilizadas popularmente na China, Japão e Coreia no tratamento de febres, gripe, infeções, feridas, tonturas, hepatite e malária. (WHO, 1999; Liu, 2008;). *B. fruticosum* é tradicionalmente usado na ilha da Sardenha (Itália) no tratamento antirreumático (Pistelli *et al.*, 1996) e em Espanha várias espécies são utilizadas como anti-inflamatórias e diuréticas (Benítez *et al.*, 2010; Prieto *et al.*, 2012). Algumas espécies estão incluídas nas farmacopeias chinesa (*B. chinense* DC., *B. scorzoneraefolium* Willd.) e japonesa (*B. falcatum* L.) (Herbal Pharmacology in the People's Republic of China, 1975; The

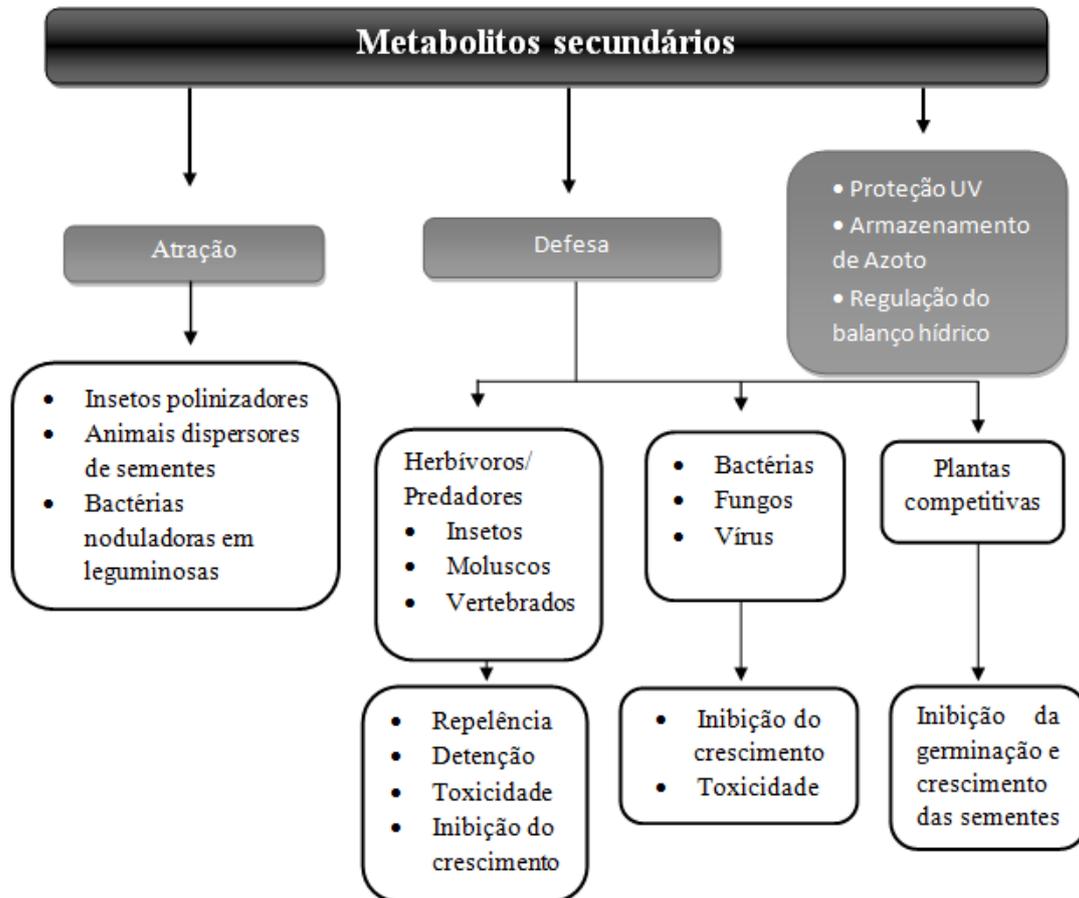
Japanese Pharmacopoeia, 2011). O comércio de raízes secas de *Bupleurum* spp. para o fabrico de medicamentos representa um volume de negócios considerável nos países asiáticos. Na China, por exemplo, são comercializadas anualmente cerca de oito mil toneladas, para utilização interna e também para exportação. Por sua vez, a exportação e a venda de medicamentos manufaturados ascende a 27 biliões de *yens* (cerca de 270 milhões de euros) anuais no Japão (Zhu *et al.*, 2009). Para responder a esta enorme procura, algumas espécies têm sido alvo de cultivo, nomeadamente *B. chinense* e *B. scorzoneraefolium* na China e *B. falcatum* no Japão (Hiraoka, 1983; Liu, 2008).

Apesar de bastante estudadas e utilizadas em alguns países asiáticos, o uso de espécies do género *Bupleurum* na Europa é residual, sendo somente utilizadas na medicina tradicional de alguns países Mediterrânicos. A elevada biodiversidade do género na região mediterrânica, aliada aos interessantes resultados de estudos efetuados envolvendo a bioatividade dos seus metabolitos secundários, poderão impulsionar a utilização e a descoberta de novos compostos e novas propriedades de espécies presentes nesta região. O patenteamento recente da utilização do óleo essencial de *B. fruticosum* na prevenção do envelhecimento da pele por parte de uma multinacional francesa ligada aos cosméticos (*L'Oréal*) (WO2012080992) comprova o interesse e importância das plantas deste género.

### 1.3. Metabolitos secundários

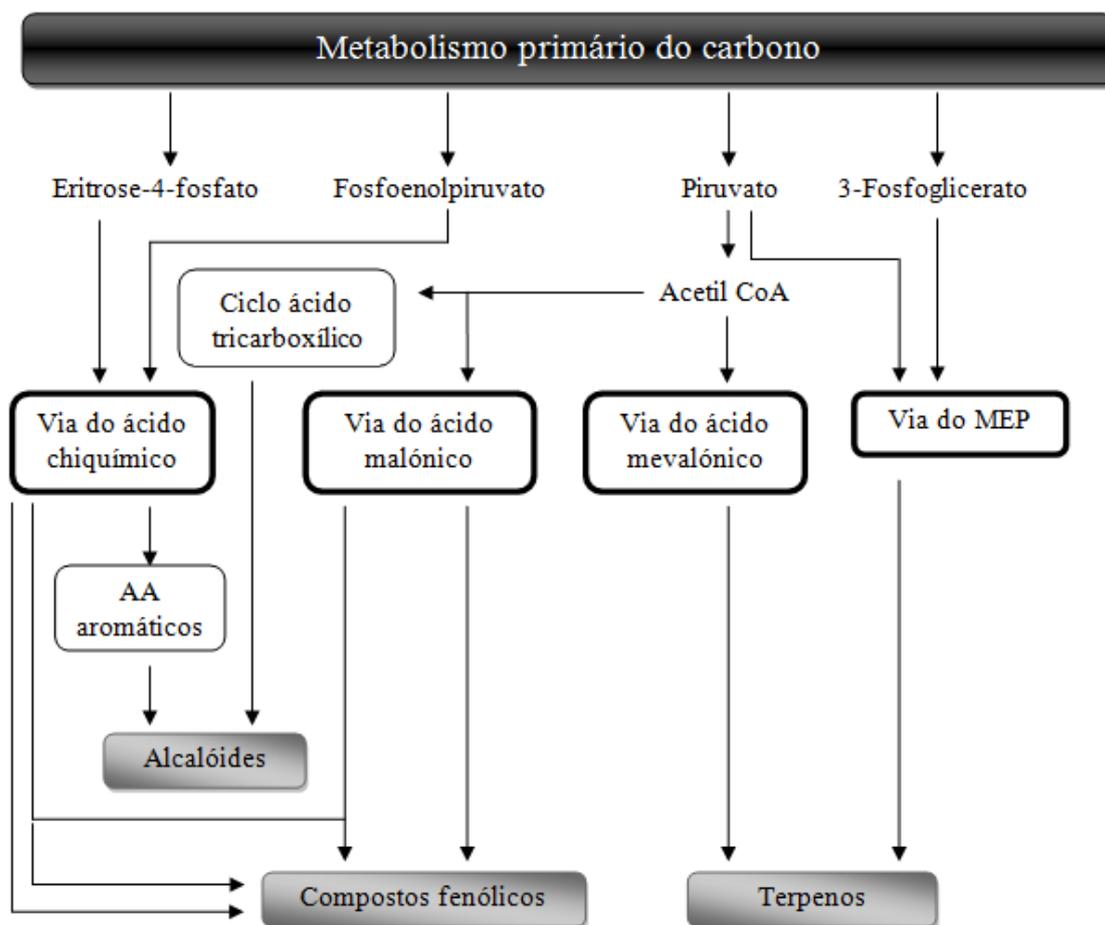
Os metabolitos secundários são assim designados, pois, inicialmente e durante muito tempo, foram considerados como produtos residuais do metabolismo, sem uma função particular nas plantas. Estes compostos diferem dos metabolitos primários (hidratos de carbono, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos) por serem menos abundantes e por apresentarem uma distribuição mais restrita no reino vegetal, ou seja, alguns metabolitos secundários são específicos e restritos de uma determinada espécie ou de um grupo de espécies relacionadas, enquanto que os metabolitos primários estão presentes em todo o reino vegetal e estão intimamente ligados a processos vitais para as plantas (Herbert, 1989; Taiz & Zeiger, 2002).

Alguns estudos têm mostrado que a importância dos metabolitos secundários nas plantas é enorme e alguns são mesmo vitais para o desenvolvimento e sobrevivência das espécies vegetais. Sabe-se atualmente que muitos destes compostos são importantes, protegendo as plantas contra predadores e microrganismos patogénicos, funcionando como compostos alelopáticos (conferindo uma vantagem competitiva relativamente a outras plantas), na atração de agentes polinizadores ou dispersores de sementes, na proteção contra radiações, no armazenamento de azoto e na regulação do balanço hídrico das plantas (Fig.3) (Canhoto, 2010; Wink, 2010).



**Figura 3.** Principais funções ecológicas e fisiológicas dos metabolitos secundários nas plantas (adaptado de Wink, 2010).

Alguns autores defendem que os metabolitos secundários são fruto de mutações aleatórias nas vias metabólicas primárias que levaram à formação destes novos compostos. Argumentando que quando a formação destes novos compostos apresenta alguma vantagem adaptativa para a planta, esta apresenta maior capacidade reprodutiva, transmitindo estas mutações aos seus descendentes prosperando estas novas vias metabólicas nas gerações seguintes, por seleção natural (Seigler, 1998; Taiz & Zeiger, 2002). De facto, os metabolitos secundários são essencialmente biossintetizados a partir de intermediários do metabolismo primário (Fig.4) e dividem-se em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (Herbert, 1989; Canhoto, 2010).



**Figura 4.** Principais vias metabólicas de biossíntese dos metabolitos secundários. AA - aminoácidos, MEP - metileritritol fosfato (adaptado de Taiz & Zeiger, 2002).

Diversas investigações fitoquímicas foram realizadas em cerca de 50 espécies de *Bupleurum*, conduzindo ao isolamento e caracterização de muitos dos seus metabolitos secundários. Apesar da elevada variabilidade química entre diferentes espécies, a maioria dos compostos isolados pertencem a 5 classes de compostos: flavonóides, triterpenos com uma elevada percentagem de saponinas triterpénicas, monoterpenos e sesquiterpenos (óleos essenciais), linhanos e poliacetilenos (Liu, 2008; Ashour & Wink, 2011). Ensaio *in vitro* comprovaram diversas propriedades biológicas destes metabolitos nomeadamente a atividade de extratos e de compostos isolados de alguns destes metabolitos secundários como anti-inflamatórios (Lorente *et al.*, 1989; Martin *et al.*, 1993; Navarro *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 2005; Ashour *et al.*, 2009), hepatoprotetores (Guinea *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 1997; Yen *et al.*, 2005), antioxidantes (Yen *et al.*, 2005; Shafaghat, 2011), antifúngicos e antibacterianos (Fernández-Ocaña *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Maxia *et al.*, 2011).

### 1.3.1. Óleos essenciais

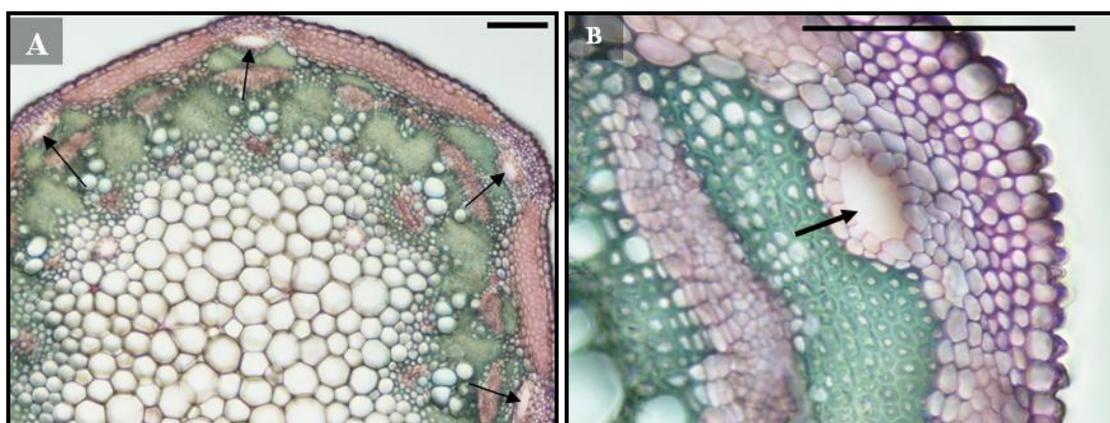
O termo óleo essencial advém da contração do termo original *óleo quintessencial*. Deriva da teoria do filósofo grego Aristóteles que considerava a matéria constituída por quatro elementos (Fogo, Ar, Terra e Água). Um quinto elemento (quintessência) foi então considerado como sendo o *espírito* ou a *força de vida*. Como a destilação ou evaporação era considerada o processo pelo qual se extraía o *espírito* das plantas, o óleo proveniente da destilação destas foi considerado o *óleo quintessencial* (Sell, 2010).

Atualmente os óleos essenciais podem ser definidos como produtos do metabolismo secundário presentes em todos os órgãos das plantas aromáticas, que por destilação e/ou por expressão formam líquidos de aspeto oleoso e volátil (Proença da Cunha, 2005). A síntese e a acumulação destes metabolitos secundários está geralmente associada a estruturas secretoras especializadas. Estas podem localizar-se na superfície dos órgãos da planta ou estar incluídas nos seus tecidos mais internos, podendo ser classificadas como estruturas externas ou internas respetivamente (Bruneton, 1993; Svoboda & Svoboda, 2000). As estruturas secretoras internas incluem células secretoras (ex. Lauraceae, Zingiberaceae), cavidades (ex. Myoporaceae, Rutaceae, Myrtaceae) e canais (ex. Apiaceae, Pinaceae, Asteraceae), enquanto que as estruturas secretoras externas incluem células epidérmicas (ex. Rosaceae, Oleaceae), osmóforos (ex. Orchidaceae) e tricomas glandulares (Lamiaceae).

Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenos e terpenóides. No entanto, os fenilpropanóides são também bastante frequentes em algumas famílias, nomeadamente Orchidaceae e Apiaceae. Os óleos essenciais são misturas bastante complexas podendo conter dezenas de compostos em diferentes concentrações, com 2 ou 3 constituintes maioritários (20-70%) e alguns constituintes em concentrações vestigiais. Os terpenos, de acordo com o número de átomos de carbono, podem ser considerados como isoprenos (5 carbonos), monoterpenos (10 átomos de carbono), sesquiterpenos (15 átomos de carbono), diterpenos (20 átomos de carbono), triterpenos (30 átomos de carbono) e tetraterpenos (40 átomos de carbono). Quando os terpenos contêm oxigénio são designados terpenóides (Bakkali *et al.*, 2008). A biossíntese dos terpenos (Fig.4) pode resultar de duas vias metabólicas alternativas, a via do mevalonato (MVA) e a via do metileritritol fosfato (MEP) (Taiz & Zeiger, 2002).

Diversos fatores podem influenciar a biossíntese de compostos voláteis sendo muito comum a variabilidade química nas plantas aromáticas, o que explica a existência, num mesmo *taxon*, de óleos essenciais com composições químicas muito distintas. Estes fatores podem ser tanto de natureza intrínseca (fisiológicos, genéticos) como resultantes das condições ambientais em que as plantas se desenvolvem (Figueiredo *et al.*, 2008).

Grande parte ou praticamente todos (Ashour & Wink, 2011) os membros do género *Bupleurum* têm a capacidade de produzir óleos essenciais e, tal como muitos outros membros da família Apiaceae, fazem-no a partir de canais secretores (Fig.5). Os canais secretores são cavidades alongadas, que frequentemente se ramificam formando uma complexa rede que se estende desde as raízes através do caule até às folhas, flores e frutos (Manunta *et al.*, 1992; Svoboda & Svoboda, 2000). Os canais secretores formam-se a partir de divisões sucessivas de células meristemáticas, originando rapidamente um conjunto de células, que constituem mais tarde as células epiteliais que delimitam o lúmen, e as células da bainha. O espaço intercelular que será, no futuro, o lúmen do canal forma-se entre as células mais internas deste maciço por um processo de esquizogenia, que envolve a degradação das pectinas da lamela média, ou por um processo de lisogenia em que ocorre autólise de uma ou mais células secretoras. Em algumas espécies parece ocorrer um processo misto de esquizolisogenia, iniciando-se a estrutura por esquizogenia e crescendo ulteriormente por autólise de células glandulares (Fahn, 1990; Ascensão, 2007). Os compostos que constituem os secretados podem ser localizados *in situ* permitindo a classificação das estruturas secretoras a partir de técnicas histológicas.



**Figura 5.** Canais secretores. A e B- Secções transversais de um caule de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum*. As setas indicam a localização dos canais secretores. Barra= 100µm.

Das cerca de 20 espécies de *Bupleurum* documentadas na literatura, foram identificados cerca de 200 compostos nos seus óleos essenciais (Ashour & Wink, 2011). A composição dos óleos essenciais de *Bupleurum* varia bastante entre as diferentes espécies, dentro do mesmo *taxon* e nas diferentes partes das plantas. Na China, foi estudada a composição dos óleos presentes nas raízes de 10 espécies (Li *et al.*, 2007) tendo sido identificada uma grande percentagem de aldeídos, principalmente hexanal e furfural. Na Turquia foram caracterizados os óleos de frutos, flores e raízes em 6 espécies (Saraçoğlu *et al.*, 2012), destacando-se a presença em grandes quantidades de alcanos, monoterpenos e sesquiterpenos. A espécie mais estudada na Europa é o *B. fruticosum* tendo sido os seus óleos essenciais caracterizados em Itália (Manunta

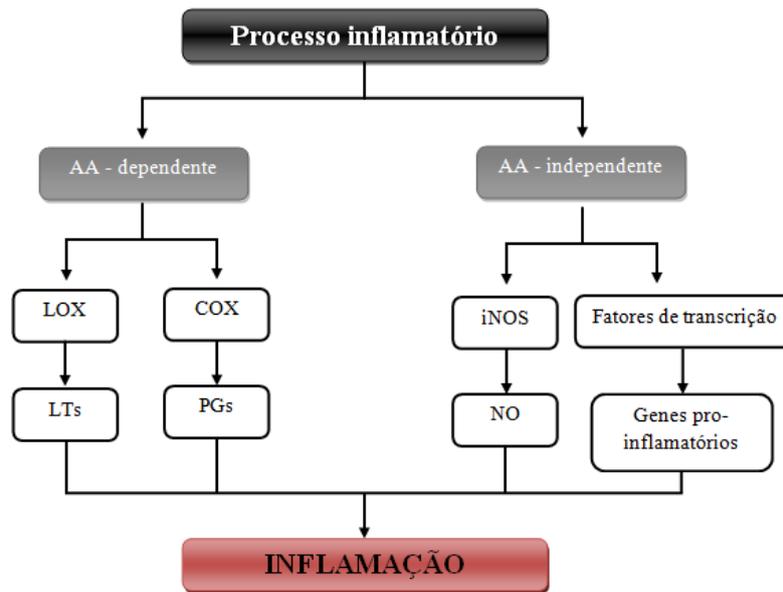
*et al.*, 1992; Giamperi *et al.*, 1998; Bertoli *et al.*, 2004; Maxia *et al.*, 2011), França (Chizzola, 2008; Liu *et al.*, 2009), Espanha (Lorente *et al.*, 1989) e Portugal (Maxia *et al.*, 2011). Nesta espécie é de destacar a diferença na composição entre os óleos ibéricos (em que os principais constituintes são  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno) e os italianos (ricos em  $\beta$ -felandreno e sabineno).

### **1.3.1.1. Atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais**

A incidência de doenças relacionadas com infeções aumentou nas últimas décadas. As dificuldades encontradas no seu tratamento, o aumento da resistência e dos efeitos secundários da medicação convencional justificam o desenvolvimento de novas drogas mais eficazes, menos tóxicas e mais baratas (Zuzarte *et al.*, 2013).

A inflamação é uma resposta protetora do organismo com o objetivo de combater a invasão de um corpo estranho (vírus, bactéria, fungo, parasita) e remover células hospedeiras danificadas ou mortas (Miguel, 2010). Nas últimas décadas foram identificados diversos mediadores inflamatórios em patologias importantes tais como a Doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares e cancro, que não estavam anteriormente ligadas à inflamação. A compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de inflamação permitiu descobrir um grande número de mediadores (Fig.6) incluindo metabolitos da via do ácido araquidónico, peptídeos, citoquinas e aminoácidos excitatórios (Calixto *et al.*, 2003).

O efeito anti-inflamatório da maioria dos metabolitos secundários vegetais está relacionado com a sua interferência direta ou indireta com mediadores de inflamação, na produção ou ação de segundos mensageiros (ex: cálcio, proteínas cinases), na expressão de fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), e proto-oncogenes, e na expressão de moléculas pro-inflamatórias chave tais como óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), cicloxigenases (ex: COX-2), lipoxigenases (ex. 5-LOX) e citoquinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Calixto *et al.*, 2003; Issa *et al.*, 2006; Miguel, 2010).



**Figura 6.** Metabolitos envolvidos em processos inflamatórios. AA- via metabólica do ácido araquidônico. LOX- lipoxigenases. LTs- leucotrienos. COX- cicloxigenases. PGs- prostaglandinas. iNOS- óxido nítrico-sintase induzida. NO- óxido nítrico. (Adaptado de Issa *et al.*, 2006).

A atividade anti-inflamatória de vários extratos do género *Bupleurum* foi estudada e comprovada. Os óleos essenciais não são exceção e a sua influência no processo inflamatório foi avaliada em várias espécies. Por exemplo, em *B. gibraltarium* e *B. fruticosum* a atividade dos óleos essenciais e dos constituintes maioritários administrados por via intraperitoneal e oral foi avaliada em dois modelos animais, o do edema induzido por carragenina e o da avaliação da formação do granuloma (Lorente *et al.*, 1989; Ocete *et al.*, 1989). Os dois óleos mostraram atividade anti-inflamatória, no entanto, o efeito foi mais notório usando o primeiro modelo e o óleo de *B. gibraltarium* mostrou ser mais ativo. Os principais constituintes isolados,  $\Delta$ -3-careno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, mostraram atividade anti-inflamatória quando testados isoladamente, mas a sua ação foi inferior à do óleo essencial, tendo tal facto sido atribuído à ocorrência de sinergias entre os diversos constituintes dos óleos essenciais.

Num estudo similar efetuado com óleo de *B. frutescens* (Martin *et al.*, 1993), a atividade anti-inflamatória *in vivo* foi avaliada através do modelo de indução de edema por carragenina e por prostaglandina E2 (PGE2). Nestes ensaios o óleo essencial e os seus principais constituintes ( $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno) foram administrados por via oral. Também neste caso tanto o óleo como os principais constituintes apresentaram atividade anti-inflamatória significativa, sendo a atividade do óleo superior à dos constituintes maioritários. Mais recentemente, a atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *B. marginatum* foi avaliada (Ashour *et al.*, 2009). Neste caso foi testada a ação do óleo na produção de 5-lipoxigenase (5-LOX) e prostaglandina E2 (PGE2) em células cancerígenas (MiaPaCa-2). O óleo essencial demonstrou capacidade de inibir a produção de 5-LOX e PGE2.

#### 1.4. Culturas *in vitro*

As primeiras tentativas de estabelecer culturas de tecidos vegetais em condições laboratoriais foram realizadas por Gottlieb Haberlandt no início do século XX. Todavia, só com a descoberta das auxinas e de outros grupos de hormonas vegetais, foi possível manter as primeiras culturas *in vitro* por períodos prolongados (Chawla, 2002; Canhoto, 2010).

A cultura de tecidos de plantas pode ser definida como o cultivo *in vitro* de plantas, sementes ou partes de plantas (incluindo uma única célula, embrião ou um órgão) num meio de cultura em condições assépticas (Chawla, 2002). A cultura *in vitro* é baseada na capacidade de totipotência das células vegetais, sendo possível obter um elevado número de plantas a partir de um único indivíduo num curto espaço de tempo. A cultura de tecidos pode ser distinguida em diferentes tipos dependendo do material utilizado para o efeito, existindo cultura de sementes, de embriões, de órgãos, de calos, de células e de protoplastos. Para se proceder à cultura, o material é colocado num meio de cultura artificial, sólido ou líquido formado por água, uma fonte de carbono (nomeadamente sacarose ou glucose), macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e inositol. A adição de hormonas ou reguladores de crescimento (compostos que apesar de não existirem nos tecidos vegetais provocam respostas análogas às hormonas) ao meio de cultura é também essencial, pois permite obter as respostas desejadas (Tabela 2). Todos os recipientes de cultura, meios e instrumentos a utilizar, assim como material vegetal, são esterilizados e todo o processo de preparação e manuseamento das culturas decorre em ambiente asséptico (Chawla, 2002; Canhoto, 2010).

A micropropagação ou propagação clonal *in vitro* é a multiplicação de indivíduos geneticamente iguais por reprodução assexuada em que cada clone é uma população de plantas derivadas do mesmo indivíduo (Chawla, 2002). No processo de micropropagação podem ser consideradas pelo menos cinco etapas críticas: (I)- seleção e preparação da fonte do explante II – estabelecimento em cultura *in vitro* de explantes viáveis; III – multiplicação dos rebentos ; IV– enraizamento dos rebentos; V- aclimatização e estabelecimento de plântulas *ex vitro* (Loberant & Altman, 2010). Existem basicamente três métodos de micropropagação: cultura ou proliferação de meristemas, através dos meristemas removidos da planta-mãe ou através da multiplicação de meristemas; organogénese, formação de órgãos diretamente no explante ou a partir da cultura de células ou calos induzidos a partir do explante; embriogénese somática, formação de uma estrutura bipolar, com meristema apical e radicular, diretamente a partir do explante ou a partir de cultura de células ou calos induzidos no explante (Chawla, 2002).

A produção dos óleos essenciais na natureza é condicionada pelas condições ambientais e está sujeita aos ciclos de desenvolvimento das plantas. O estabelecimento de culturas *in vitro* pode permitir a seleção e a propagação de linhas mais produtivas e, para além disso, as plantas estão disponíveis em qualquer altura do ano nas mesmas condições de desenvolvimento. Caso

os óleos essenciais de plantas cultivadas *in vitro* apresentem uma composição química semelhante à dos óleos das plantas *in vivo*, pode justificar-se o uso destes métodos para obtenção de culturas em larga escala com fins industriais. A cultura de plantas *in vitro* permite também a diminuição de colheitas massivas de plantas no seu habitat natural, contribuindo para a sua conservação.

**Tabela 2.** Utilização dos principais reguladores de crescimento em culturas *in vitro*.

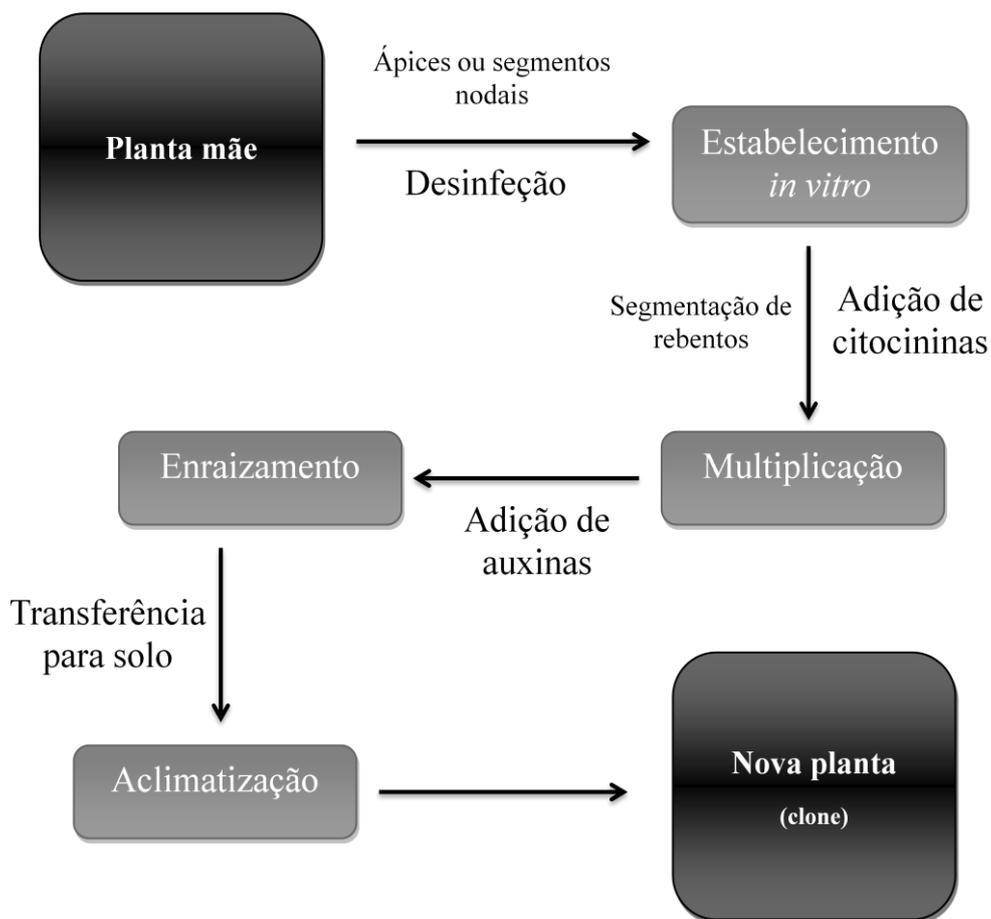
<b>Regulador de crescimento</b>	<b>Funções em culturas <i>in vitro</i></b>	<b>Mais utilizados</b>
<b>Auxinas</b>	Formação e manutenção de calos.	<b>IAA</b> (ácido 3-indol acético)
	Formação e manutenção de suspensões celulares.	<b>IBA</b> (ácido 3-indol butírico)
	Indução do enraizamento.	<b>2,4-D</b> (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)
	Formação de embriões somáticos.	<b>NAA</b> (ácido 1-naftaleno acético)
<b>Citocininas</b>	Formação de meristemas axilares.	<b>BAP</b> (benzilamino-purina.)
	Formação de calos.*	<b>KN</b> (cinetina)
	Formação de meristemas adventícios.*	<b>2iP</b> (isopentenil adenina)
	Formação de embriões somáticos.	<b>Zeatina</b>
<b>Giberelinas</b>	Alongamento de rebentos caulinares. Quebra de dormência nos embriões somáticos.	<b>GA<sub>3</sub></b> (ácido giberélico)
<b>Ácido abscísico</b>	Evitar a germinação precoce de embriões somáticos. Maturação de embriões somáticos.	<b>ABA</b> (ácido abscísico)

\* Na presença de auxinas

### 1.4.1. Proliferação de meristemas

A proliferação de meristemas é a técnica mais simples de micropropagação, pois não ocorre indução de novos meristemas mas apenas o desenvolvimento dos meristemas presentes no explante, sendo somente necessário proceder ulteriormente ao enraizamento dos rebentos caulinares obtidos. Esta técnica envolve diversas etapas (Fig.7): iniciação, multiplicação dos rebentos a partir do explante, transferência dos rebentos para o meio de enraizamento, transferência das plantas para o solo e aclimatização (Canhoto, 2010).

Os principais objetivos da cultura de meristemas são: a propagação em larga escala, a regeneração de plantas isentas de vírus, o estudo do funcionamento do meristema e a preservação do germoplasma. Este método revela-se extremamente vantajoso devido à estabilidade genética das plantas obtidas, à possibilidade de obter uma multiplicação exponencial num curto espaço de tempo, permitir obter plantas com uma elevada qualidade fitossanitária e um acentuado rejuvenescimento. As principais desvantagens deste método são o elevado custo das plantas regeneradas, a dificuldade no estabelecimento de algumas culturas, a obtenção de plantas vitrificadas e a reversão dos meristemas ao estado floral (Canhoto, 2010).



**Figura 7.** Processo de propagação de plantas *in vitro* através de proliferação de meristemas.

Em *Bupleurum* vários trabalhos foram realizados para desenvolver protocolos que permitissem a proliferação de meristemas de algumas espécies deste género. Assim, em *B. fruticosum* foi desenvolvido um protocolo eficiente para a cultura de meristemas a partir de explantes nodais (Fraternale *et al.*, 2002). Neste estudo conclui-se que a adição da combinação de 1,0 mg l<sup>-1</sup> de ácido 3-indol acético (IAA) e 1,5 mg l<sup>-1</sup> de benzilamino-purina (BAP) ao meio MS (Murashige & Skoog, 1962) era a mais eficaz na multiplicação de plantas. O enraizamento foi mais eficiente usando o meio MS sem adição de hormonas vegetais ou o meio MS suplementado com várias concentrações de ácido-1-naftaleno acético (NAA). Por último, a adição de triacontanol (TRIA), na concentração de 2 µg l<sup>-1</sup>, ao meio de cultura na fase de multiplicação, teve um efeito benéfico. Ulteriormente, tendo como base o protocolo anterior, foi possível a propagação de plantas *in vitro* e extração do óleo essencial das suas partes aéreas (Bertoli *et al.*, 2004). A composição química do óleo das plantas *in vitro* foi comparada com a do óleo da planta mãe, tendo-se verificado que a constituição de ambos é bastante semelhante.

Em *B. kanoi*, foi também elaborado um protocolo para a proliferação de meristemas nodais (Chen *et al.*, 2006). Neste caso o meio mais eficiente para a multiplicação dos explantes foi o meio MS suplementado com 0,25 mg l<sup>-1</sup> de BAP. Em *B. distichophyllum* foi igualmente elaborado um protocolo para a proliferação de meristemas nodais e apicais (Karuppusamyand & Pullaiah, 2007). Nesta espécie, o meio mais eficaz para a multiplicação foi o meio MS com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP e o enraizamento foi possível no mesmo meio base suplementado com 2,0 mg l<sup>-1</sup> de ácido 3-indol butírico (IBA). Em *B. falcatum*, foi possível multiplicar meristemas nodais e apicais utilizando o meio MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BA e 0,2 mg l<sup>-1</sup> de NAA (Hsu *et al.*, 1993).

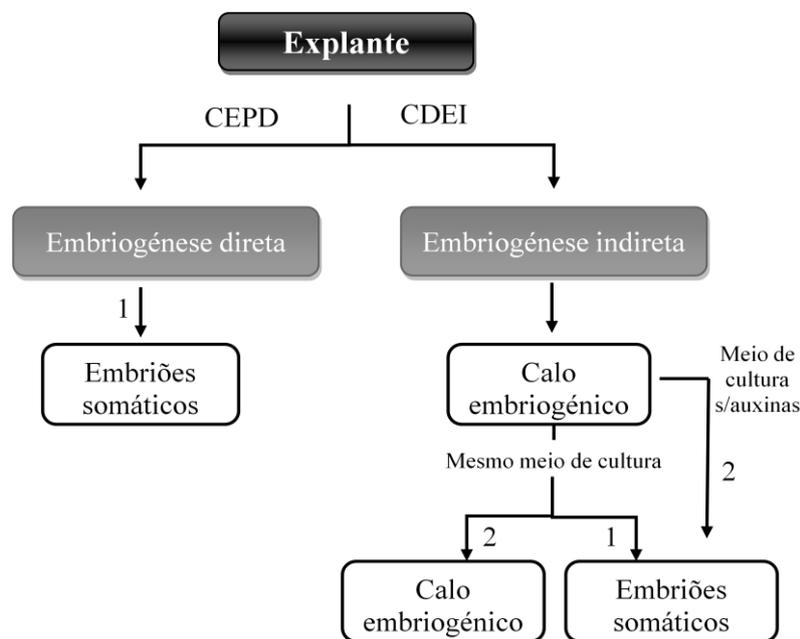
#### **1.4.2. Embriogénese somática**

A embriogénese somática é o processo pelo qual células do soma (corpo) formam embriões somáticos. Estes são, como os embriões zigóticos, estruturas bipolares com um polo radicular e um caulinar, possuem o mesmo genótipo da planta mãe e são, na maioria dos casos, morfologicamente semelhantes aos embriões zigóticos produzidos pela mesma espécie (Canhoto, 2010).

Este processo é sustentado pela capacidade singular que as células vegetais têm de se desdiferenciar originando células totipotentes, ou seja, células com a capacidade de dar origem a todos os tipos de células, que podem ser estimuladas a formar um embrião. O tipo de explante, meio de cultura utilizado, genótipo da planta dadora, condições de cultura, a presença de reguladores de crescimento, geralmente auxinas (a mais utilizada é o 2,4-D), são alguns dos parâmetros que afetam a indução da embriogénese somática (Canhoto, 2010). O estado fisiológico das células é igualmente de grande importância, podendo a embriogénese ocorrer de

forma direta ou indireta dependendo da competência embriogénica das células. Quando a embriogénese é indireta ocorre a formação de uma massa desorganizada de células com características meristemáticas (calo) e diz-se que estas células são determinadas embriogénicamente por indução (CDEI), as células necessitam de uma maior reprogramação atingindo a capacidade de expressão da embriogénese somática ao fim de alguns ciclos celulares. Quando a embriogénese é direta ocorre a formação imediata de embriões somáticos sendo as células designadas por células embriogénicas pré-determinadas, CEPD (Fig.8) (Sharp *et al.*, 1980). Em grande parte das espécies a formação dos embriões somáticos ocorre de forma indireta, podendo os embriões formarem-se no mesmo meio onde se forma a massa proembrionária (embriogénese em uma fase) ou verificar-se a formação de um calo embriogénico e somente num meio de cultura diferente ocorrer o desenvolvimento dos embriões (embriogénese em duas fases, figura 8). A embriogénese em duas fases tem a grande vantagem de se poderem manter os calos embriogénicos em cultura durante períodos alargados de tempo, pois se esses calos forem fragmentados e cultivados no mesmo meio de cultura, estes voltam a crescer e a formar novas massas proembriogénicas (Canhoto, 2010).

Após o completo desenvolvimento dos embriões somáticos, num meio propício, pode ocorrer a germinação e a conversão destes em plantas. A germinação de embriões somáticos é muitas vezes dificultada pelo elevado número de embriões anómalos formados na fase de indução (Arnold *et al.*, 2002; Canhoto, 2010).



**Figura 8.** Vias de indução de embriogénese somática. CEPD- células embriogénicas pré-determinadas. CDEI- células determinadas embriogénicamente por indução. 1- Embriogénese em uma fase. 2- Embriogénese em duas fases.

Em *Bupleurum* foram relatadas algumas investigações em que foi possível a indução da embriogénese somática, em particular em *B. falcatum* e *B. scorzonerifolium* (Hiraoka, 1983; Shon *et al.*, 2004). Em *B. falcatum* foi possível induzir embriogénese de anteras (Shon *et al.*, 2004). Para induzir o processo embriogénico foi feita a cultura de anteras em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e picloram. Os meios mais eficientes foram os que continham 0,075 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D com ou sem 0,075 mg l<sup>-1</sup> de picloram. Para a regeneração de plantas, os calos formados a partir das anteras foram transplantados para um meio MS sem hormonas. Na mesma espécie foi também possível induzir embriogénese a partir de folhas (Hiraoka, 1983). As plantas obtidas por embriogénese somática foram comparadas com plantas propagadas por semente (Hiraoka *et al.*, 1986). As plantas propagadas via embriogénese somática apresentavam características mais uniformes entre elas, no entanto, o peso seco da raiz das plantas propagadas por via sexuada demonstrou ser superior. Também o conteúdo de saponinas nas raízes mostrou ser superior em plantas propagadas via embriogénese somática. Em *B. scorzonerifolium* foi possível induzir embriogénese a partir de protoplastos (Guang-min *et al.*, 1992). Os meios de cultura mais eficazes foram o meio MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,25 mg l<sup>-1</sup> de cinetina (KN) e o meio MS suplementado com 1,5 mg l<sup>-1</sup> NAA + 0,25 mg l<sup>-1</sup> KN.

Para as espécies europeias de *Bupleurum* não foi encontrada nenhuma publicação relacionada com a indução da embriogénese somática.

### 1.5. Objetivos

O presente trabalho visa a valorização das espécies de *Bupleurum* que crescem espontaneamente em Portugal. Para a concretização deste objetivo geral foram delineadas as seguintes tarefas:

1. Extração dos óleos essenciais de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. lancifolium*;
2. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum* e *Bupleurum fruticosum* através da avaliação na inibição de um mediador chave na inflamação (NO);
3. Avaliação da citotoxicidade dos óleos de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum* e *Bupleurum fruticosum* numa linha celular de macrófagos, uma etapa fundamental para a avaliação da segurança do óleo para futuras aplicações farmacêuticas e cosméticas;
4. Desenvolvimento de protocolos efetivos de micropropagação através de proliferação de meristemas e embriogénese somática, para a propagação de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum*, *Bupleurum gerardi* e *Bupleurum fruticosum*, contribuindo para a preservação de habitats naturais;
5. Análise e caracterização das estruturas secretoras de óleos essenciais em plantas *in vitro* e *in vivo*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS



## 2.1. Material Vegetal

As espécies selecionadas para este estudo foram *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi*, *B. lancifolium* e *B. fruticosum*, todas elas espontâneas na flora portuguesa e disponíveis no seu habitat natural na região da Beira Litoral (Tabela 3). *B. rigidum* subsp. *paniculatum* é abundante na natureza e existem sementes disponíveis desta espécie no Banco de Sementes do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra (JBUC). *B. gerardi* tem uma área de distribuição muito restrita e não foi colhido devido à fragilidade da única população conhecida, optando-se por utilizar sementes presentes no Banco de sementes do JBUC. *B. lancifolium* ocorre em abundância em habitat natural na Beira Litoral. *B. fruticosum* encontra-se presente em habitat natural e está presente no JBUC. Todas as espécies obtidas no habitat natural foram colhidas de forma sustentável de maneira a não afetar a dinâmica das populações e foi colhido um exemplar de herbário em todas as colheitas.

**Tabela 3.** Proveniência do material utilizado nos diferentes procedimentos laboratoriais.

Espécie	Procedimento	Material	Origem
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i>	Proliferação de meristemas	Segmentos nodais	Serra da Boa Viagem (40°10'57.44"N 8°50'52.73"W) Fonte Coberta (40° 4'27.02"N 8°28'19.80"W) Eiras (40°14'21.85"N 8°25'50.51"W)
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i>	Micropropagação	Sementes	Banco de sementes (JBUC) Eiras (40°14'21.85"N 8°25'50.51"W)
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i>	Micropropagação	Embriões zigóticos	Banco de sementes (JBUC)
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i>	Extração dos óleos essenciais	Partes aéreas em floração s/ semente	Eiras (40°14'21.85"N 8°25'50.51"W)
<i>B. gerardi</i>	Micropropagação	Sementes	Banco de sementes (JBUC)
<i>B. lancifolium</i>	Extração dos óleos essenciais	Partes aéreas em floração Frutos secos	Póvoa das Pegas (40° 4'23.39"N 8°26'54.56"W) Fonte Coberta (40° 4'28.08"N 8°28'20.40"W)
<i>B. fruticosum</i>	Proliferação de meristemas	Segmentos nodais	JBUC

<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i>	Indução de embriogénese somática	Segmentos foliares	Plantas <i>in vitro</i>
<i>B. gerardi</i>	Indução de embriogénese somática	Segmentos foliares	Plantas <i>in vitro</i>
<i>B. fruticosum</i>	Indução de embriogénese somática	Segmentos foliares	Plantas <i>in vitro</i>

## 2.2 Óleos essenciais

### 2.2.1 Extração dos óleos essenciais

Partes aéreas de plantas em floração de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e de plantas em floração e frutos maduros de *B. lancifolium* foram submetidas a um processo de hidrodestilação para isolamento dos óleos essenciais. O material vegetal destinado à extração de óleos essenciais foi submetido a uma secagem moderada, num local arejado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, durante dois dias. Após a secagem foi cuidadosamente selecionado, de forma a descartar contaminações com matéria vegetal de outra proveniência. Os óleos essenciais foram isolados por hidrodestilação durante 3h utilizando um aparelho de tipo Clevenger, de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Europeia (Council of Europe, 1997). Os óleos foram armazenados em frascos escuros, e conservados a 4° C para ensaios ulteriores.

### 2.2.2. Atividade anti-inflamatória

Para testar o potencial anti-inflamatório e a citotoxicidade dos óleos essenciais de *Bupleurum* spp. utilizou-se o modelo *in vitro* da estimulação de macrófagos (Raw 264,7) com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). A ação dos diferentes óleos foi determinada tendo em conta a capacidade de inibir a produção de óxido nítrico (NO) em células estimuladas e o seu efeito na viabilidade das mesmas.

#### 2.2.2.1. Linha celular

A linha celular obtida da American Type Culture Collection (TIB-71) foi cedida pela Dr.ª Otilia Vieira do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra. As células foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado

com 10 % (v/v) de soro bovínico não ativado, 3,02 g l<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio, 100 µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina e 100 U ml<sup>-1</sup> de penicilina, a 37°C, numa estufa com 5% de carbono. As células foram usadas após atingirem 80-90% de confluência. A viabilidade das células foi confirmada por contagem num hematocitômetro com *trypan blue* e a sua morfologia monitorizada, através da observação microscópica, ao longo dos ensaios.

#### **2.2.2.2. Inibição da produção de NO**

Para testar a influência dos óleos essenciais na produção de NO, um importante mediador no processo inflamatório, foi quantificada a presença de nitritos (metabólitos estáveis de NO) no meio de cultura através de um procedimento colorimétrico com base na reação de Griess. As células (Raw 264,7) foram colocadas na concentração de 0,6 x 10<sup>6</sup> células por poço (MW 48) e deixadas a estabilizar nas condições referidas anteriormente durante 12 horas. De seguida as células foram mantidas em meio de cultura sem LPS, ou estimuladas com 1 µg ml<sup>-1</sup> de LPS ou na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial (0,16-0,64 µl ml<sup>-1</sup>) durante 24h. Após os tratamentos, 170 µl do sobrenadante foi pipetado junto com 170 µl de reagente de Griess para uma microplaca Elisa 96 e incubado no escuro durante 30 min. A absorvância foi lida a 570 nm num leitor de microplacas automático (SLT, Áustria). A quantidade de nitritos foi determinada a partir da curva padrão de nitrito de sódio. Todas as experiências foram realizadas 3 vezes de forma independente e em duplicado.

#### **2.2.2.2. Viabilidade celular**

Para testar uma eventual citotoxicidade dos óleos essenciais avaliou-se o seu efeito na respiração celular, um indicador da viabilidade celular, através do método colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), tal como foi descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). As células (Raw 264,7) foram cultivadas na concentração de 0,6 x 10<sup>6</sup> células por poço (MW 48) e deixadas a estabilizar durante 12 horas. De seguida foram incubadas durante 24 horas em meio de cultura (controlo) ou com as diferentes concentrações de óleos essenciais (0,16-0,64 µl ml<sup>-1</sup>). Após os tratamentos, 43 µl da solução de MTT (5mg ml<sup>-1</sup> em tampão fosfato salino) foram adicionados a cada poço e incubados a 37°C durante 15 min com 5% de CO<sub>2</sub>. Após os 15 min, as microplacas foram colocadas em gelo de forma a parar a reação e o sobrenadante foi rejeitado. Para dissolver os cristais resultantes da redução do MTT (cristais de formazano) foram adicionados 300 µl de isopropanol acidificado (0.04 N HCL em isopropanol) a cada poço. A quantificação do formazano foi realizada num leitor de microplacas automático (SLT, Áustria) a 570 nm, com um filtro de comprimento de onda de 620 nm. Todas as experiências foram repetidas 3 vezes de forma independente e em duplicado.

### 2.3. Culturas *in vitro*

#### 2.3.1. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tabela 4) ao qual foi adicionada uma fonte de carbono (sacarose), um agente gelificante (agar) e, por vezes, hormonas ou reguladores de crescimento. O pH foi previamente ajustado a 5.7 - 5.8 com o auxílio de soluções de NaOH ou HCl (0,1 - 1,0 M). Após a distribuição do meio nos recipientes adequados este foi autoclavado a 120°C e 1,1 atm de pressão durante 20 minutos.

**Tabela 4.** Composição do meio MS (Murashige e Skoog, 1962).

Constituintes	mg/l	Solução stock	
<b>Macronutrientes</b>			
KNO <sub>3</sub>	1900	20x	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub>	440		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170		
<b>Micronutrientes</b>			
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	100x	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2		
KI	0,83		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025		
<b>Fonte de Ferro (FeEDTA)</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3		40x
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8		
<b>Compostos Orgânicos</b>			
Glicina	2	50x	
Ácido nicotínico	0,5		
Piridoxina – HCl (vit.B6)	0,5		
Tiamina – HCl (vit.B1)	0,1		
Mioinositol	100		

#### 2.3.2. Desinfecção do material vegetal

Todo o material vegetal utilizado no decurso do trabalho foi previamente desinfetado e somente depois inoculado no meio de cultura. Utilizou-se um protocolo de esterilização no qual o material foi lavado com água corrente, colocado num recipiente com uma solução de etanol

70% durante 1 minuto, decantado e lavado 3 vezes com água bidestilada. De seguida, o material vegetal foi colocado num recipiente com uma solução de hipoclorito de cálcio (7-10%) ao qual foi adicionado Tween-20 (uma gota por cada 100 ml de solução) e foi agitado durante 20 minutos. Após o último passo todas as manipulações foram feitas em condições assépticas (numa câmara de fluxo laminar) e todo o material de laboratório que entrou em contacto com o material vegetal foi previamente esterilizado. Após 20 minutos, a solução de hipoclorito foi decantada e o material lavado 3 vezes com água bidestilada e esterilizada. No caso das sementes, estas foram deixadas em embebição durante a noite, à temperatura ambiente, no dia seguinte foram sujeitas a uma esterilização com uma solução com 5 % de hipoclorito de cálcio durante 20 minutos, seguida de três lavagens com água esterilizada e bidestilada. Os explantes nodais provenientes de plantas *in vivo* sofreram um passo adicional de desinfeção que consistiu na sua emersão numa solução filtrada de 0,3 g l<sup>-1</sup> do fungicida benlato durante 2 minutos sob agitação. Após este tempo, os explantes foram decantados e lavados novamente 3 vezes com água bidestilada, seguindo-se a desinfeção com hipoclorito de cálcio (10%) durante 30 minutos. Após a esterilização o material vegetal foi inoculado no meio de cultura.

### **2.3.3. *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum***

#### 2.3.3.1. Germinação de sementes

Nos ensaios de germinação de sementes foram usadas sementes fornecidas pelo Banco de sementes do JBUC e sementes colhidas em Setembro numa população em habitat natural na zona de Eiras, perto de Coimbra (Tabela 3). Após a desinfeção (ver secção 2.3.2.) foram testados dois procedimentos diferentes de germinação: (1) 2 sementes por tubo de ensaio, foram inoculadas em meio MS (Tabela 4), diluído a metade da concentração e suplementado com 1% (p/v) de sacarose. A amostra foi dividida em três grupos iguais e os tubos colocados nas seguintes condições: a) numa estufa a 25°C no escuro; b) a 4°C no escuro e c) a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro; (2) As sementes foram colocadas em caixas de Petri esterilizadas (10 cm de diâmetro), com o fundo revestido com um disco de papel de filtro e algodão, previamente humedecidos com água bidestilada esterilizada. Em cada caixa de Petri foram colocadas 10 sementes e cada tratamento replicado três vezes. As caixas do grupo controlo foram colocadas numa estufa a 20°C no escuro, enquanto as restantes foram mantidas a 4°C durante 5, 10, 15, 20 e 25 dias, e só depois transferidas para a estufa a 20°C. A formação de plântulas foi registada ao longo de 40 dias e a percentagem de germinação calculada.

### 2.3.3.2. Cultura de embriões zigóticos

Para a extração dos embriões zigóticos foram utilizadas sementes (Tabela 3). As sementes foram esterilizadas (ver secção 2.3.2). Após a esterilização, os embriões foram removidos numa câmara de fluxo laminar horizontal e todo o material que entrou em contacto com as sementes foi previamente esterilizado. A extração foi realizada com o auxílio de uma lupa binocular, a qual foi devidamente desinfetada com etanol 95% (v/v). No ensaio foram apenas usados embriões inteiros e cujos cotilédones tinham completado o desenvolvimento. Os embriões isolados foram inoculados em tubos de ensaio com o meio de cultura MS (Tabela 4), diluído a metade da concentração, com 1% (p/v) de sacarose e mantidos a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. A formação de plântulas foi registada ao longo de 30 dias e a percentagem de germinação calculada.

### 2.3.3.3. Proliferação de meristemas

Para a proliferação de meristemas foram isolados segmentos, com meristemas axilares, diretamente de plantas presentes em habitat natural na região da Beira Litoral (Tabela 3) e os ápices (1 a 2 cm) de plântulas resultantes da germinação de embriões zigóticos. As partes aéreas das plantas colhidas foram colocadas num recipiente com água durante 1 dia. Após esse período foram seccionados segmentos nodais com o comprimento entre 1 a 2 cm. Os segmentos foram esterilizados de acordo com o procedimento indicado na secção 2.3.2.. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com meio MS, com 3% (p/v) de sacarose, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0; 0,25; 0,5; 1 e 2 mg l<sup>-1</sup>) e num meio com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg l<sup>-1</sup> de IAA. O meio base MS foi usado como controlo e as culturas foram mantidos numa câmara de cultura a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz /8h escuro. Para avaliar o efeito dos reguladores de crescimento na multiplicação dos explantes, o número de explantes que produziram rebentos caulinares bem como o número de rebentos produzidos por explante foram registados após 30 dias de cultura. De forma a testar o efeito do ácido ascórbico na oxidação dos explantes, estes foram submetidos a um tratamento em que foram emergidos numa solução 100 mg l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico durante uma hora e de seguida inoculados em meio de cultura MS suplementado com 0,5 mg l<sup>-1</sup> BAP e com 3% (p/v) de sacarose.

O enraizamento foi testado inoculando, durante 2 semanas, as plantas resultantes da multiplicação de meristemas em meio de cultura MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de ácido 3-indol butírico (IBA) e durante outras 2 semanas no meio de cultura MS, diluído a metade da concentração, com 1% (p/v) de sacarose. Foi também testado o enraizamento diretamente em meio de cultura MS, diluído a metade da concentração, com 1% (p/v) de sacarose, durante 4 semanas.

### 2.3.4. *Bupleurum gerardi*

#### 2.3.4.1. Germinação de sementes

Nos ensaios de germinação de sementes foram usadas sementes de *B. gerardi* fornecidas pelo Banco de sementes do JBUC (Tabela 3). Após a esterilização (ver secção 2.3.2.), foram inoculadas 2 sementes por tubos de ensaio com o meio de cultura MS diluído a metade da concentração e 1% (p/v) de sacarose. A amostra foi dividida em dois grupos iguais, um foi colocado numa estufa a 25°C no escuro e outro a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro. A formação de plântulas foi registada ao longo de 30 dias e a percentagem de germinação calculada.

#### 2.3.4.2. Proliferação de meristemas

Os ápices caulinares (1 a 2 cm) das plantas obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes (secção 2.3.4.1.) foram inoculados em tubos de ensaio com meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 mg l<sup>-1</sup>) e 3% (p/v) de sacarose. O meio base MS foi usado como controlo e as culturas foram mantidas numa câmara de cultura a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Para avaliar o efeito de BAP na multiplicação dos explantes, o número de explantes que produziram rebentos caulinares bem como o número de rebentos produzidos por explante foram registados após 30 dias de cultura.

#### 2.3.4.4. Floração *in vivo*

Na micropropagação via proliferação de meristemas de *B. gerardi* ocorreu floração *in vitro*. De forma a testar a influência dos reguladores de crescimento neste processo de organogénese foi registada a ocorrência de floração em meios de cultura suplementados com BAP (0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg l<sup>-1</sup>) e para testar a influência do carvão ativado (AC) adicionou-se 2 g l<sup>-1</sup> de carvão ativado a um meio de cultura suplementado com 0,25 mg l<sup>-1</sup> de BAP. A percentagem de floração *in vitro* nos diferentes meios de cultura foi registada.

### 2.3.5. *Bupleurum fruticosum*

#### 2.3.5.1. Proliferação de meristemas

Os explantes utilizados para a proliferação de meristemas foram segmentos, com meristemas axilares, obtidos a partir de ramos de um arbusto presente no JBUC (Tabela 3). Os ramos de *B. fruticosum* foram colocados num recipiente com água durante 1 dia e após esse

período foram seccionados fitómeros com comprimento entre 1 a 2 cm. Os explantes foram desinfetados de acordo com o procedimento indicado na secção 2.3.2. e foram inoculados em tubos de ensaio com meio MS suplementado com 1,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg l<sup>-1</sup> IAA, com 3% (p/v) de sacarose. O meio base MS foi usado como controlo e as culturas foram mantidas numa câmara de cultura a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Para avaliar o efeito dos reguladores de crescimento na multiplicação dos explantes, o número de explantes que produziram rebentos bem como o número de rebentos produzidos por explante foram registados após 30 dias de cultura.

O enraizamento foi testado inoculando durante 2 semanas as plantas resultantes da multiplicação de meristemas em meio de cultura MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de IBA e durante outras 2 semanas no meio de cultura MS, diluído a metade da concentração, com 1% (p/v) de sacarose. Foi também testado o enraizamento diretamente em meio de cultura MS, diluído a metade da concentração, com 1% (p/v) de sacarose.

### **2.3.6. Embriogénese somática**

A indução da embriogénese somática foi realizada da mesma forma para as 3 espécies (*B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum*). Os explantes utilizados foram secções foliares obtidas a partir de plantas estabelecidas previamente *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com meio MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e 0,2 mg l<sup>-1</sup> de cinetina (KN). Os tubos de ensaio, com 3 secções de folha cada, foram colocados numa estufa a 25°C, no escuro, durante 8 semanas. Após esse período foi registada a formação de calos embriogénicos e calculada a percentagem de indução de calos na amostra. Subculturas dos calos foram mantidas em meios de cultura com a mesma composição. Algumas porções de calo embriogénico foram cultivadas em meio MS diluído a metade da concentração e 1% (p/v) de sacarose, de forma a testar a capacidade do calo embriogénico formar embriões somáticos. Registou-se a quantidade de calos que formaram embriões somáticos bem como o número de plantas formadas a partir do calo embriogénico.

## **2.4. Microscopia**

### **2.4.1 Caracterização das estruturas secretoras**

A análise das cavidades secretoras foi realizada a partir de plantas *in vivo* (raízes, caules, folhas, flores e frutos) de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. fruticosum* e de plantas *in vitro* de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Tipos de explante e técnicas utilizadas na caracterização das estruturas secretoras em *Bupleureum* spp.

<b>Taxon</b>	<b>Explante</b>	<b>Origem</b>	<b>Técnicas</b>
<i>B. fruticosum</i>	Caule	<i>in vivo</i>	Histologia (MO*)
			Histoquímica (MO)
			SEM**
		<i>in vitro</i>	Histoquímica (MO)
	Flores	<i>in vivo</i>	SEM
			Histologia (MO)
	Folhas	<i>in vivo</i>	Histologia (MO)
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i>	Caule	<i>in vivo</i>	Histologia (MO)
			Histoquímica (MO)
			SEM
		<i>in vitro</i>	Histoquímica (MO)
	Folhas	<i>in vivo</i>	Histologia (MO)
	Raiz		
Flores			
<i>B. gerardi</i>	Caule	<i>in vivo</i>	Histologia (MO)

\*MO- Microscopia ótica. \*\*SEM- Microscopia eletrônica de varrimento

#### 2.4.1.1. Microscopia ótica

##### 2.4.1.1.1. Cortes histológicos

Para a observação da anatomia das estruturas secretoras, segmentos de caules, folhas e flores de *B. fruticosum* e segmentos de raízes, caules, folhas e flores de *B. rigidum subsp. paniculatum* foram fixados em formalina-aceto-álcool (FAA; 1:1:8) durante 2 dias, sendo depois transferidos para etanol a 70% (v/v). De seguida foram embebidos em parafina e as secções (10-12 mm) foram coradas pela técnica de Mirande (9 partes de carmim aluminado de Grenacher e 1 parte de verde iodo). As preparações foram observadas num microscópio ótico Nikon Eclipse E400 e fotografadas com uma máquina fotográfica digital Nikon Digital Sight DS-U1 e o software Act-2U

#### 2.4.1.1.2. Caracterização histoquímica

Os explantes usados na análise histológica (Tabela 5) foram seccionadas à mão usando medula de sabugueiro e uma lâmina ou obtidos com um seccionador de tecidos (após inclusão numa matriz de agar 2%). As secções foram imersas em diversas soluções corantes, dependentes do tipo de metabolitos presentes (descrito abaixo), durante o período de tempo recomendado. Ulteriormente as secções foram colocadas numa lâmina de vidro sobre uma gota de glicerina, observadas e fotografadas (tal como indicado na secção 2.4.1.1.1.). Os estudos histoquímicos tiveram como objetivo a identificação dos compostos secretados, nomeadamente terpenóides e lípidos totais. Para identificação destes compostos procedeu-se aos tratamentos a seguir indicados:

(i) Para a deteção dos lípidos totais usaram-se soluções saturadas em etanol 70% de negro Sudão B e vermelho de Sudão B (Pearse, 1968). As secções foram primeiro imersas em etanol 70% e depois transferidas para as soluções corantes durante 5 a 10 minutos. Antes de serem montadas na lâmina foram diferenciadas rapidamente com etanol a 70% e lavadas em água bidestilada. Para o controlo extraíram-se os lípidos com uma solução de metanol:clorofórmio (1:1), durante 24 horas, a 45°C, tratando depois as secções de tecido como anteriormente referido.

(ii) A presença de terpenóides foi detetada através de uma solução recém-preparada do reagente de Nadi (David & Carde, 1964) durante 1 hora, no escuro, seguindo-se uma lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2. Os explantes controlo foram processados de forma semelhante ao referido para os lípidos totais.

#### 2.4.1.2 Microscopia eletrónica de varrimento

Os explantes (Tabela 5) foram seccionadas à mão com uma lâmina e medula de sabugueiro e em seguida fixados durante 1,5 h, à temperatura ambiente, numa solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,8, contendo umas gotas de solução de cloreto de cálcio 0,01 M. O material foi depois submetido a três lavagens de 15 min cada, no mesmo tampão, seguindo-se uma pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (p/v) preparado no mesmo tampão, durante 2 h, à temperatura ambiente. Após 3 lavagens de 15 min em água destilada, as amostras foram desidratadas numa série crescente de etanol (70, 80, 90, 95 e 100 %; v/v). De seguida as amostras foram submetidas a uma secagem por ponto crítico, substituindo-se gradualmente o etanol por CO<sub>2</sub> num aparelho CPD020 (Balzers). De modo a dar condutibilidade à superfície, procedeu-se à metalização das amostras com uma película de ouro-paládio, num metalizador JEOL JFC-1100 (1200V, 6mA, 10 minutos). As amostras foram

depois observadas num microscópio eletrônico de varrimento, JEOL JSM-5400 a 15 kV, tendo-se captado as imagens com interesse.

#### **2.4.2. Caracterização da floração *in vitro***

Com o auxílio da microscopia eletrônica de varrimento (SEM) foram observadas as inflorescências de *B. gerardi*. As inflorescências foram seccionadas a partir de plântulas cultivadas *in vitro* durante 0, 5, 10, 15, 20 dias em meio MS suplementado com 0,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 3% (p/v) de sacarose. Após seccionados os explantes foram fixados utilizando o mesmo protocolo usado para a fixação das estruturas secretoras (secção 2.4.1.2) e de modo a dar condutibilidade à superfície, procedeu-se à metalização das amostras com uma película de ouro-paládio, num metalizador JEOL JFC-1100 (1200V, 6mA, 10 minutos). As amostras foram depois observadas num microscópio eletrônico de varrimento, JEOL JSM-5400 a 15 kV, tendo-se captado as imagens com interesse.

#### **2.5. Análise estatística**

Na análise da atividade anti-inflamatória foram realizadas três experiências independentes, em duplicado. A análise estatística entre mais de dois tratamentos foi efetuada através da análise de variâncias, ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett. A análise entre dois tratamentos foi realizada usando o Teste t.

Nas culturas *in vitro* em cada tratamento um mínimo de 10 tubos de ensaio foram utilizados e as experiências foram realizadas três vezes. Após uma análise de dados através de médias, desvios-padrão e percentagens, os resultados obtidos sob a forma de percentagem sofreram uma transformação pelo arcoseno e a análise estatística dos resultados obtidos foi realizada. A comparação entre mais do que dois tratamentos foi realizada com base na análise de variâncias (ANOVA) seguida de um pós-teste de Tukey. A comparação entre dois tratamentos foi realizada recorrendo ao Teste t.

### **3. RESULTADOS**



### 3.1 Extração dos óleos essenciais

A extração do óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* foi realizada a partir de 1379g de partes aéreas em flor colhidas em Eiras (secção 2.1) e foi possível obter 5,4 ml de óleo, sendo o rendimento da extração cerca de 0,39% (p/v) (Tabela 6). A composição do óleo foi analisada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra através da combinação de técnicas de cromatografia gás-líquido de alta resolução (CGL) e de cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (CGL-EM). Os constituintes maioritários identificados foram  $\alpha$ -pineno (36%),  $\beta$ -pineno (26%) e limoneno (10.5%) (Tabela 7).

A partir das partes aéreas em flor e de frutos secos de *B. lancifolium* não foi possível obter óleo essencial através da metodologia utilizada (secção 2.2.1).

**Tabela 6.** Rendimento do óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*.

Recipiente	Massa de material vegetal (g)	Volume de óleo essencial (ml)	Rendimento (ml / 100g)
Balão n°1 (Colo estreito 2 litros)	130	0,64	0,49
Balão n°2 (Colo estreito 4 litros)	250	0,99	0,40
Balão n°3 (Colo estreito 4 litros)	300	1,15	0,38
Balão n°4 (Colo largo 4 litros)	410	1,5	0,37
Balão n°5 (Colo estreito 4 litros)	289	1,12	0,39
<b>Total</b>	1379	5,4	0,39

### 3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

De forma a avaliar a atividade anti-inflamatória foram utilizadas quatro amostras diferentes de óleos essenciais, duas de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* (BRI e II, Tabela 7) e duas de *B. fruticosum* (BF I e II, Tabela 7). O óleo essencial BR II é a amostra obtida na secção 3.1; BRI, BFI e BFII são amostras da coleção do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Tabela 7).

**Tabela 7 .** Óleos essenciais utilizados na avaliação da atividade anti-inflamatória. BR- óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, BF- óleo essencial de *B. fruticosum*.

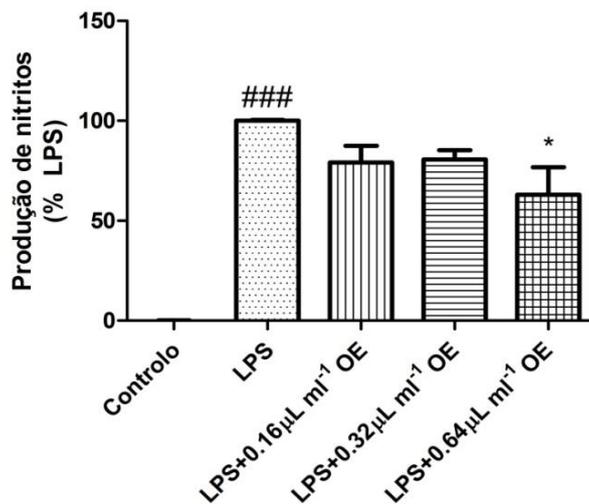
<b>Taxon</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Compostos principais</b>	<b>Origem</b>
<b>BR I *</b>	Partes aéreas com flores e sementes maduras	$\alpha$ -pineno: 27,5% $\beta$ -pineno: 34% limoneno:13,5%	Fátima
<b>BR II</b>	Partes aéreas com flores sem sementes maduras	$\alpha$ -pineno: 36% $\beta$ -pineno: 26% limoneno:10.5%	Coimbra
<b>BF I *</b>	Partes aéreas com flores sem sementes maduras	$\alpha$ - pineno: 37% $\beta$ - pineno: 32% $\beta$ - phellandrene:8,5%	Coimbra
<b>BF II *</b>	Partes aéreas com flores e sementes maduras	$\alpha$ -pineno: 41% $\beta$ -pineno: 3,5% $\beta$ -phellandrene:7,5%	Coimbra

\* - óleo essencial da coleção do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia

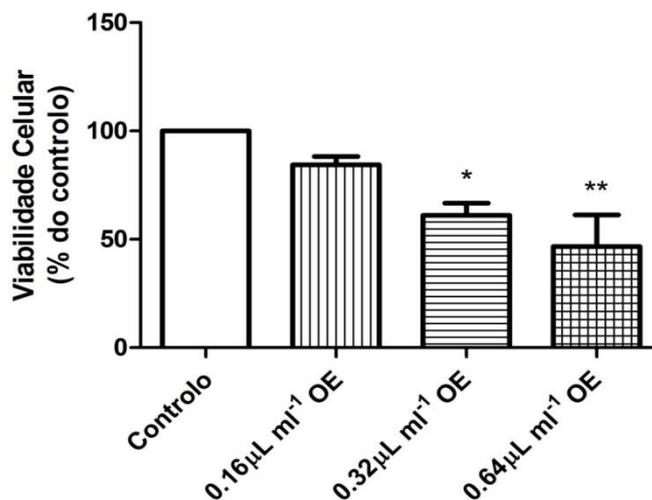
Os resultados provenientes da análise da inibição da produção de NO e da viabilidade celular serão apresentados em conjunto de forma a facilitar a análise dos resultados da atividade anti-inflamatória das diferentes amostras. Em todos os ensaios foi demonstrado que em comparação ao controlo o LPS estimula a produção de nitritos ( $p < 0,001$ ) (Fig. 8, 10, 12, 14).

### 3.2.1 Óleo essencial de *Bupleurum fruticosum* I (BF I)

Nos ensaios com BF I verificaram-se apenas diferenças significativas na produção de nitritos em células com a concentração  $0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$  na presença de LPS ( $63,03 \pm 13,72\%$ ) em relação às células estimuladas com LPS (100%),  $p < 0,05$  (Fig.8). Verificou-se também uma ligeira diminuição da viabilidade celular, constatada pela redução do MTT, nas células inoculadas com óleo essencial em relação às células cultivadas sem a presença deste. A viabilidade foi menor nas células com maior concentração de óleo essencial, nomeadamente,  $61,03 \pm 5,66\%$  ( $p < 0,05$ ) nas células com  $0,32 \mu\text{l ml}^{-1}$  de óleo e  $46,65 \pm 14,64\%$  ( $p < 0,01$ ) nas células com  $0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$  de óleo essencial (Fig.9).



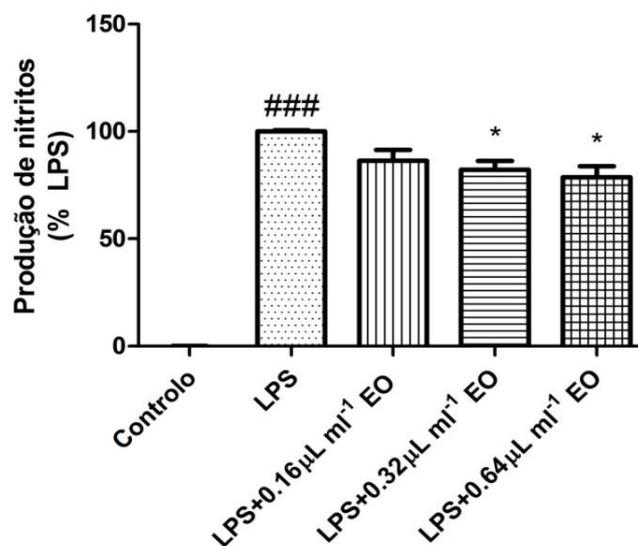
**Figura 8.** Efeito de BF I na produção de nitritos em macrófagos. Os macrófagos ( $0,6 \times 10^6$  células poço<sup>-1</sup>) foram mantidos em meio de cultura (controlo), ou estimulados com  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de LPS ou na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,16-0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado. (\*  $p < 0,05$ , em relação a LPS; ###  $p < 0,001$ , em relação ao controlo).



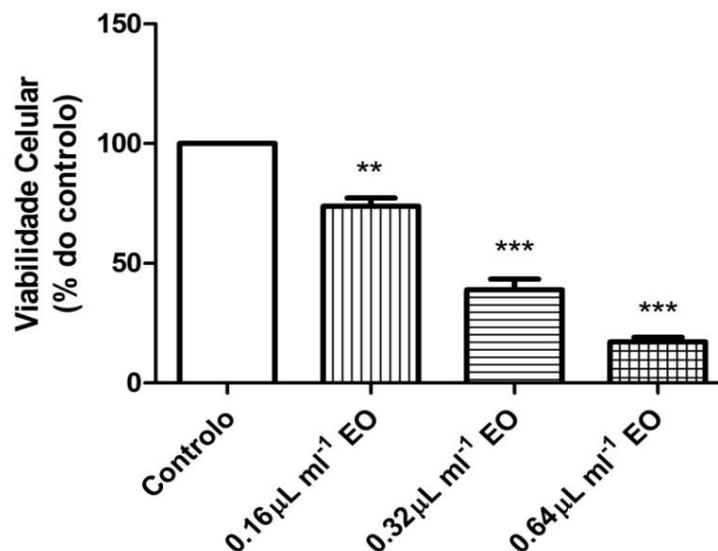
**Figura 9.** Efeito de BF I na viabilidade de macrófagos (ensaio do MTT). Células RAW 264,7 foram expostas a diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,16-0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), por 24 horas. Os resultados estão expressos em percentagem da redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à percentagem média  $\pm$  SEM de três experiências independentes realizadas em duplicado. (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , em relação ao controlo).

### 3.2.2. Óleo essencial de *Bupleurum fruticosum* II (BFII)

No que respeita a BFII verificaram-se diferenças significativas na produção de nitritos em células com  $0,64\mu\text{l ml}^{-1}$  e  $0,32\mu\text{l ml}^{-1}$  de óleo essencial na presença de LPS ( $78,63\pm 5,20\%$  e  $82,13\pm 4,18\%$ , respetivamente) em relação às células com LPS sem a presença de óleos essenciais (100%),  $p<0,05$ ) (Fig.10). Verificou-se também uma diminuição da viabilidade celular, constatada pela redução do MTT, nas células inoculadas com óleo essencial em relação às células cultivadas sem a presença deste. Tendo sido maior nas células com maior concentração de óleo essencial, nomeadamente,  $73,84\pm 3,45\%$  ( $p<0,01$ ) nas células com  $0,16\mu\text{l ml}^{-1}$ ,  $38,99\pm 4,41\%$  ( $p<0,001$ ) nas células com  $0,32\mu\text{l ml}^{-1}$  e  $17,23\pm 1,78\%$  ( $p<0,001$ ) nas células com  $0,64\mu\text{l ml}^{-1}$  de óleo essencial (Fig.11).



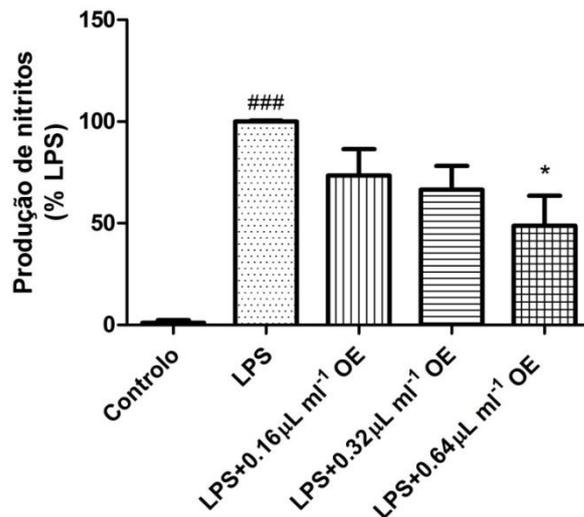
**Figura 10.** Efeito de BF II na produção de nitritos em macrófagos. Os macrófagos ( $0,6 \times 10^6$  células poço<sup>-1</sup>) foram mantidos em meio de cultura (controlo), ou estimulados com  $1\mu\text{g ml}^{-1}$  de LPS ou na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,16$ - $0,64\mu\text{l ml}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado. (\*  $p<0,05$ , em relação a LPS; ###  $p<0,001$ , em relação ao controlo).



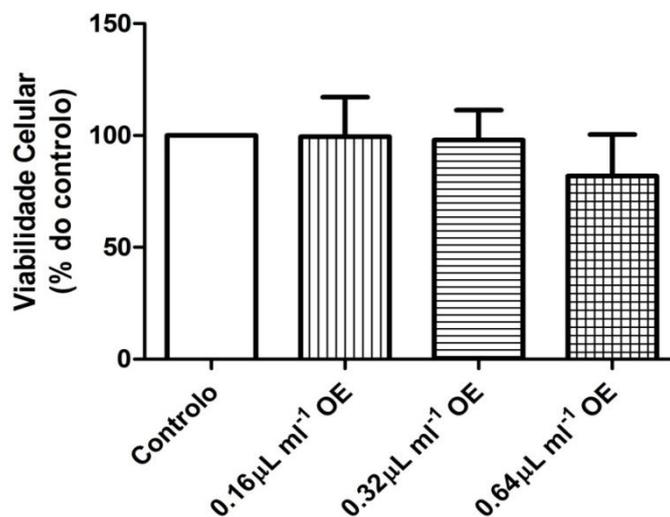
**Figura 11.** Efeito de BF II na viabilidade de macrófagos (ensaio do MTT). Células RAW 264,7 foram expostas a diferentes concentrações de óleo essencial (0,16-0,64  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ), por 24 horas. Os resultados estão expressos em percentagem da redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à percentagem média  $\pm$  SEM de três experiências independentes realizadas em duplicado. (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , em relação ao controlo).

### 3.2.3. Óleo essencial de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum* I (BRI)

Nos ensaios com BF I observaram-se diferenças significativas nas células com 0,64  $\mu\text{l ml}^{-1}$  na presença de LPS (48,86 $\pm$ 14,64%) em relação às células com LPS sem óleo essencial (100%),  $p < 0,05$  (Fig.12). Não se verificaram alterações significativas na viabilidade celular das células inoculadas com óleo essencial em relação às células cultivadas sem a presença deste. Obtiveram-se resultados muito próximos dos do controlo (100%), 99,48 $\pm$ 17,74 nas células com 0,16  $\mu\text{l ml}^{-1}$ , 97,97 $\pm$ 13,32% nas células com 0,32  $\mu\text{l ml}^{-1}$  e 81,86 $\pm$ 18,58% nas células com 0,64  $\mu\text{l ml}^{-1}$  de óleo essencial (Fig.13).



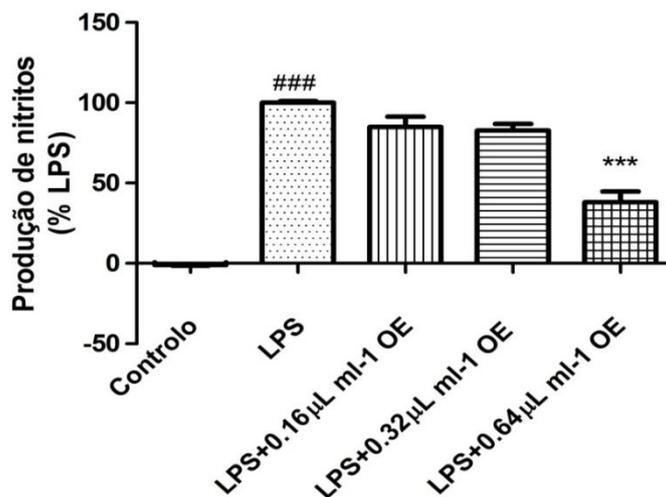
**Figura 12.** Efeito de BR I na produção de nitritos em macrófagos. Os macrófagos ( $0,6 \times 10^6$  células poço<sup>-1</sup>) foram mantidos em meio de cultura (controlo), incubados com  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  de LPS e na presença de diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,16$ - $0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado. (\*  $p < 0,05$ , em relação a LPS; ###  $p < 0,001$ , em relação ao controlo).



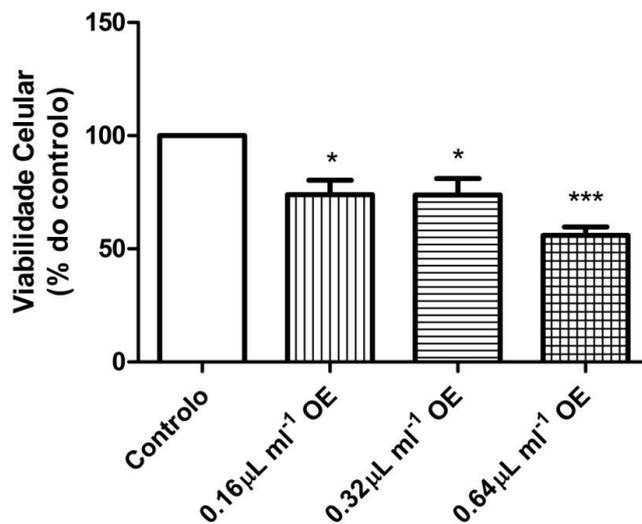
**Figura 13.** Efeito de BR I na viabilidade de macrófagos (ensaio do MTT). Células RAW 264,7 foram expostas a diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,16$ - $0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$ ), por 24 horas. Os resultados estão expressos em percentagem da redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde à percentagem média  $\pm$  SEM de três experiências independentes realizadas em duplicado.

3.2.4. Óleo essencial de *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum* II (BRII)

No ensaio com óleo essencial de *B. rigidum* II verificaram-se diferenças significativas nas células com a concentração de  $0,64\mu\text{l ml}^{-1}$  de óleo essencial na presença de LPS ( $55,97\pm 5,63\%$ ) em relação às células com LPS sem óleos essenciais (100%),  $p<0,001$  (Fig.14). Verificou-se também uma ligeira diminuição da viabilidade celular, constatada pela redução do MTT, nas células inoculadas com óleo essencial em relação às células cultivadas sem a presença deste. A mortalidade foi maior nas células com maior concentração de óleo essencial, em comparação com o controlo. A viabilidade das células com óleo essencial foi de  $73,97\pm 6,30\%$  ( $p<0,05$ ) nas células com  $0,16\mu\text{l ml}^{-1}$ ,  $73,75\pm 7,28\%$  ( $p<0,05$ ) nas células com  $0,32\mu\text{l ml}^{-1}$  e  $55,97\pm 5,63\%$  ( $p<0,001$ ) nas células com  $0,64\mu\text{l ml}^{-1}$  de óleo essencial (Fig.15).



**Figura 14.** Efeito de BR II na produção de nitritos em macrófagos. Os macrófagos ( $0,6 \times 10^6$  células poço<sup>-1</sup>) foram mantidos em meio de cultura (controlo), ou estimulados com  $1\mu\text{g ml}^{-1}$  de LPS ou na presença de LPS com diferentes concentrações de óleo essencial ( $0,16-0,64\mu\text{l ml}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em percentagem de produção de nitritos por célula na presença de LPS. Cada valor corresponde à média  $\pm$  SEM de três experiências independentes, realizadas em duplicado. (\*\*\*)  $p<0,001$ , em relação a LPS; ###  $p<0,001$ , em relação ao controlo).



**Figura 15.** Efeito de BR II na viabilidade de macrófagos (ensaio do MTT). Células RAW 264,7 foram expostas a diferentes concentrações de óleo essencial (0,16-0,64  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ), por 24 horas. Os resultados estão expressos em percentagem da redução do MTT por células cultivadas na presença de meio de cultura (controlo). Cada valor corresponde às médias  $\pm$  SEM de três experiências independentes realizadas em duplicado. (\* $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 3.3 Culturas *in vitro*

De forma a proceder à propagação *in vitro* de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum* foram utilizados diversos procedimentos incluindo a germinação de sementes, extração e germinação de embriões zigóticos, proliferação de meristemas, organogénese e embriogénese somática (secção 2.3). Como o principal objetivo da cultura *in vitro* das diferentes espécies é a multiplicação em larga escala e num curto espaço de tempo, procedeu-se de forma a privilegiar procedimentos que permitissem a rápida multiplicação das espécies estudadas. Os resultados obtidos são referentes a dados relacionados com a multiplicação e enraizamento das diferentes espécies estudadas.

#### 3.3.1 *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum*

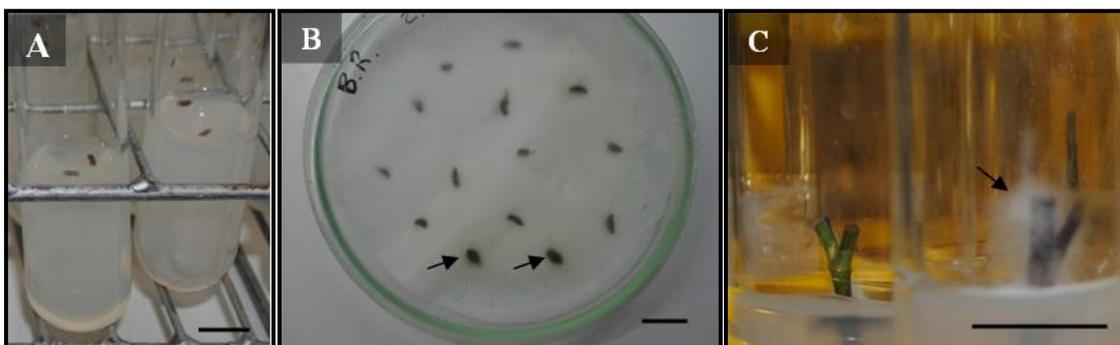
##### 3.3.1.1. Germinação de sementes

Na propagação *in vitro* desta espécie a principal limitação foi a falta de resposta dos explantes escolhidos para iniciar a cultura *in vitro*. Tanto as sementes (Tabela 3) como os meristemas axilares de plantas *in vivo* (Tabela 3) não se desenvolveram quando inoculados nos respetivos meios de cultura e submetidos aos diferentes tratamentos.

A germinação de sementes foi inicialmente testada em meio de cultura MS (Tabela 4), diluído a metade da concentração e suplementado com 1% (p/v) de sacarose (secção 2.3.3.1). Foram testadas diversas condições de cultura: 40 dias a 25°C no escuro; 40 dias com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro a 25°C e 15 dias a 4° C no escuro seguido de um período de 40 dias a 25°C no escuro (Fig.16A). A germinação das sementes não ocorreu em nenhuma das condições testadas. De forma a ultrapassar a dormência das sementes procedeu-se de acordo com um protocolo anteriormente testado com eficácia no Laboratório de Biotecnologia Vegetal para outras espécies. As sementes foram colocadas em caixas de Petri com papel de filtro embebido em água e sujeitas a 4°C durante vários períodos de tempo (secção 2.3.3.1). Também neste caso não se observou germinação das sementes e, além disso, ocorreu uma elevada taxa de contaminação das mesmas (Fig.16B).

### 3.3.1.2. Proliferação de meristemas

Para o estabelecimento de culturas *in vitro* desta espécie procedeu-se também à proliferação de meristemas axilares de plantas colhidas no seu habitat natural (Tabela 3). Após a desinfecção (secção 2.3.2), os explantes foram colocados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (secção 2.3.3.3). A propagação de meristemas axilares foi dificultada pela grande percentagem de explantes infetados, pela sua oxidação e falta de resposta (Fig.16C). A oxidação dos explantes ocorreu mesmo após o tratamento com ácido ascórbico e a inclusão de carvão ativado e ácido ascórbico no meio. Devido à impossibilidade de continuar a proliferação de meristemas a partir de meristemas axilares a investigação prosseguiu recorrendo-se ao uso de ápices caulinares provenientes da germinação de embriões zigóticos.



**Figura 16.** Estabelecimento das culturas *in vitro* de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*. **A-** Sementes inoculadas em tubos de ensaio. **B-** Sementes inoculadas em caixas de Petri. **C-** Segmentos nodais, com meristemas axilares, inoculados em meio de cultura suplementado com BAP. As **setas** indicam locais onde ocorreram contaminações fúngicas. Barra= 1cm.

3.1.1.2.1 Proliferação de meristemas provenientes da germinação de embriões zigóticos

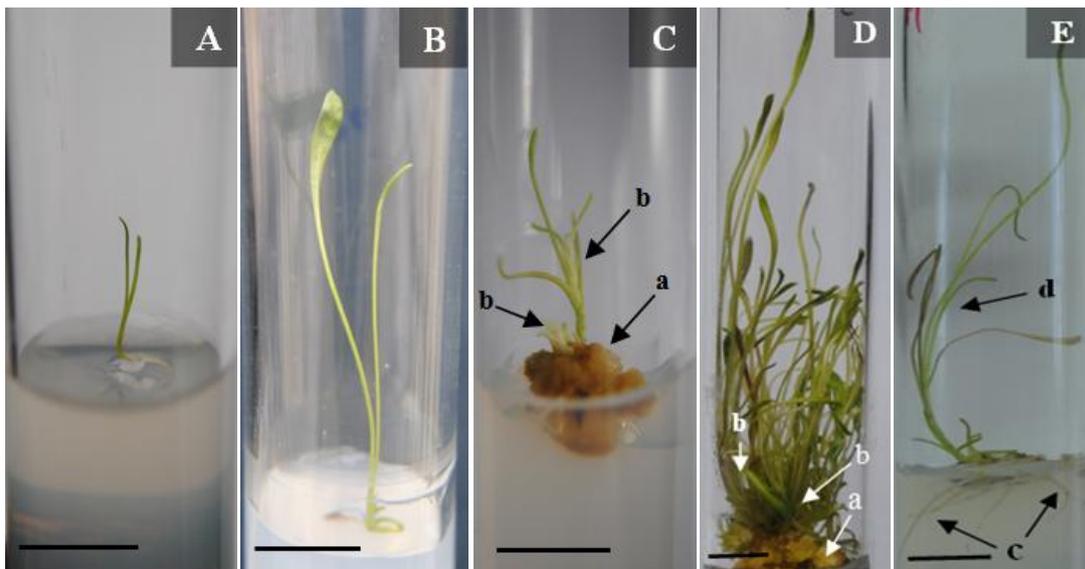
O estabelecimento das culturas *in vitro* com sucesso foi possível recorrendo à germinação de embriões zigóticos (secção 2.3.3.2), extraídos de sementes semelhantes às testadas anteriormente (Fig.17A). A percentagem de embriões germinados foi em média  $70,5 \pm 0,71\%$  (Tabela 8). Após 30 dias de cultura, no meio de germinação, os ápices caulinares das plantas provenientes da germinação dos embriões foram utilizados na micropropagação via proliferação de meristemas.

Para induzir a multiplicação dos meristemas dos ápices caulinares, foram adicionados ao meio de cultura MS diferentes concentrações de citocininas (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP) e um dos meios de cultura foi suplementado com uma combinação de auxinas e citocininas (1,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg l<sup>-1</sup> de IAA). Nos meios de cultura com BAP, após 30 dias de cultura, não ocorreu a formação de novos rebentos caulinares, ocorrendo somente o desenvolvimento das folhas dos ápices caulinares inoculados inicialmente (Fig.17B). No meio de cultura suplementado com BAP e IAA, após 30 dias de cultura, formou-se um tecido caloso com uma tonalidade amarelada (Fig.17C) na base de todos os explantes, verificando-se a formação de novos rebentos a partir do tecido caloso. Para avaliar a resposta do calo, o explante foi mantido no mesmo meio de cultura por mais duas semanas. Ao fim desse período verificou-se a formação de novos rebentos caulinares a partir do calo e os rebentos presentes anteriormente desenvolveram-se (Fig.17D).

As plântulas formadas foram separadas em dois grupos iguais de forma a testar a sua capacidade de enraizamento, um grupo foi mantido em meio MS sem reguladores de crescimento e no outro foi testada a influência de IBA no enraizamento (secção 2.3.2.4). Nas plantas mantidas em meio MS sem reguladores de crescimento não se verificou a formação de raízes, nas plantas inoculadas no meio de cultura com IBA (Fig.17E) observou-se a formação de raízes em  $60,0 \pm 5,0\%$  dos explantes (Tabela 8).

**Tabela 8-** Micropropagação de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*.

	Meio de cultura	Resultado (%)
Germinação de embriões zigóticos	MS	$70,5 \pm 0,71$
	MS + 1mg l <sup>-1</sup> IBA (2 semanas)	
Enraizamento	+	$60,0 \pm 5,0$
	MS (2 semanas)	



**Figura 17.** Cultura *in vitro* via proliferação de meristemas de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*. **A-** Plântula proveniente da germinação de um embrião zigótico. **B-** Plântula proveniente da proliferação do meristema apical, cultivado em meio MS suplementado com 0,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP durante 4 semanas. **C-** Calo com rebentos caulinares formados a partir da proliferação de um meristema apical, cultivado em meio MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg l<sup>-1</sup> de IAA durante 4 semanas. **D-** Calo com rebentos caulinares formados a partir da proliferação de um meristema apical, cultivado em meio MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg l<sup>-1</sup> de IAA durante 6 semanas. **E-** Planta enraizada. **a-** calo. **b-** rebentos caulinares. **c-** raízes. **d-** parte aérea da planta. Barra= 1cm.

### 3.3.2 *Bupleurum gerardi*

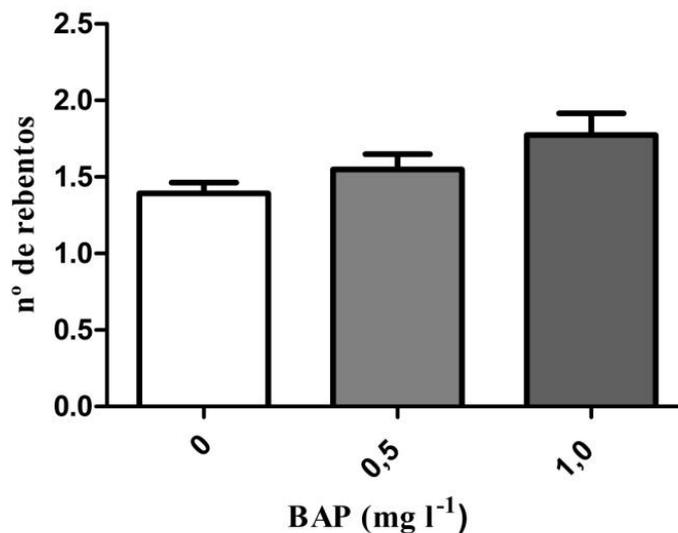
#### 3.3.2.1. Germinação de sementes

A cultura *in vitro* de *B. gerardi* foi iniciada por via seminal, sendo a germinação das sementes testada em meio MS diluído a metade da concentração e suplementado com 1% (p/v) de sacarose (secção 2.3.4.1). Metade das sementes foram colocadas a 25°C no escuro e a outra metade a 25°C com um fotoperíodo de 16h luz / 8h escuro. Apenas as sementes mantidas no escuro germinaram. As sementes começaram a germinar quatro dias após o início da cultura, no entanto a germinação foi bastante descoordenada e ao fim de 30 dias em média 39,43 ± 1,37 % das sementes germinaram (Fig.20A).

#### 3.3.2.2. Proliferação de meristemas

A proliferação de meristemas foi uma das técnicas escolhidas para a propagação desta espécie, os explantes utilizados para tal foram os ápices caulinares da plantas formadas via germinação das sementes (Fig.20C). Para induzir a multiplicação dos ápices caulinares foram

adicionadas ao meio de cultura MS diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 mg l<sup>-1</sup>). Após 30 dias verificou-se a formação de novos rebentos caulinares e a ocorrência de floração *in vitro*. No meio de cultura sem adição de BAP formaram-se em média 1,39 ± 0,12 novos rebentos por ápice caulinar, no meio de cultura com 0,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP, a taxa de multiplicação foi de 1,55 ± 0,17 e no meio com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP foi de 1,77 ± 0,24. Não se verificaram diferenças significativas no número de rebentos obtidos nos diferentes meios de cultura testados (Fig.18).



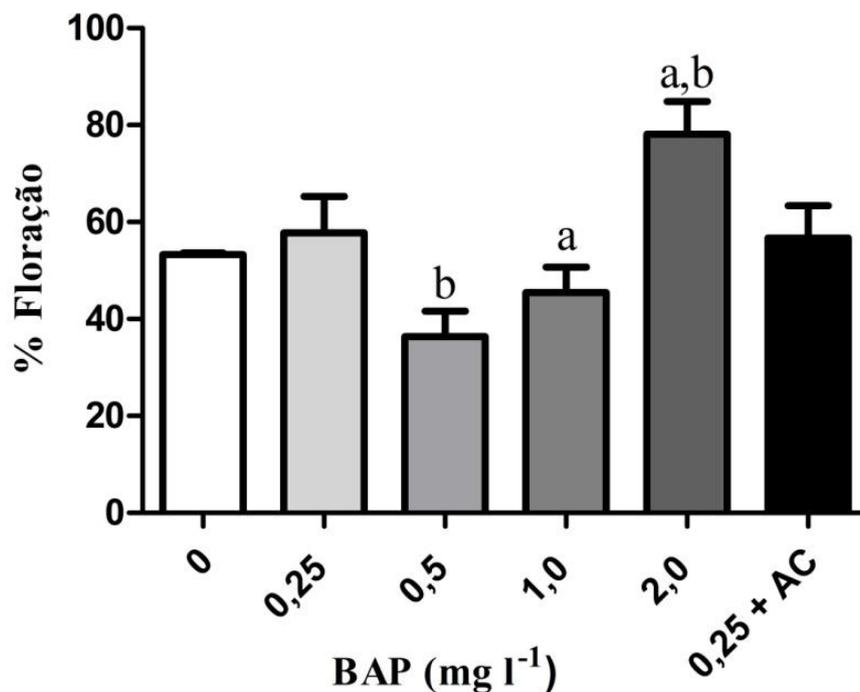
**Figura 18.** Efeito da concentração de BAP no número de rebentos caulinares formados por proliferação de meristemas de *B. gerardi*, durante 4 semanas de cultura. O meio sem BAP é o meio de controlo. Cada valor corresponde à média ± SEM de três experiências.

### 3.3.2.3. Floração *in vitro*

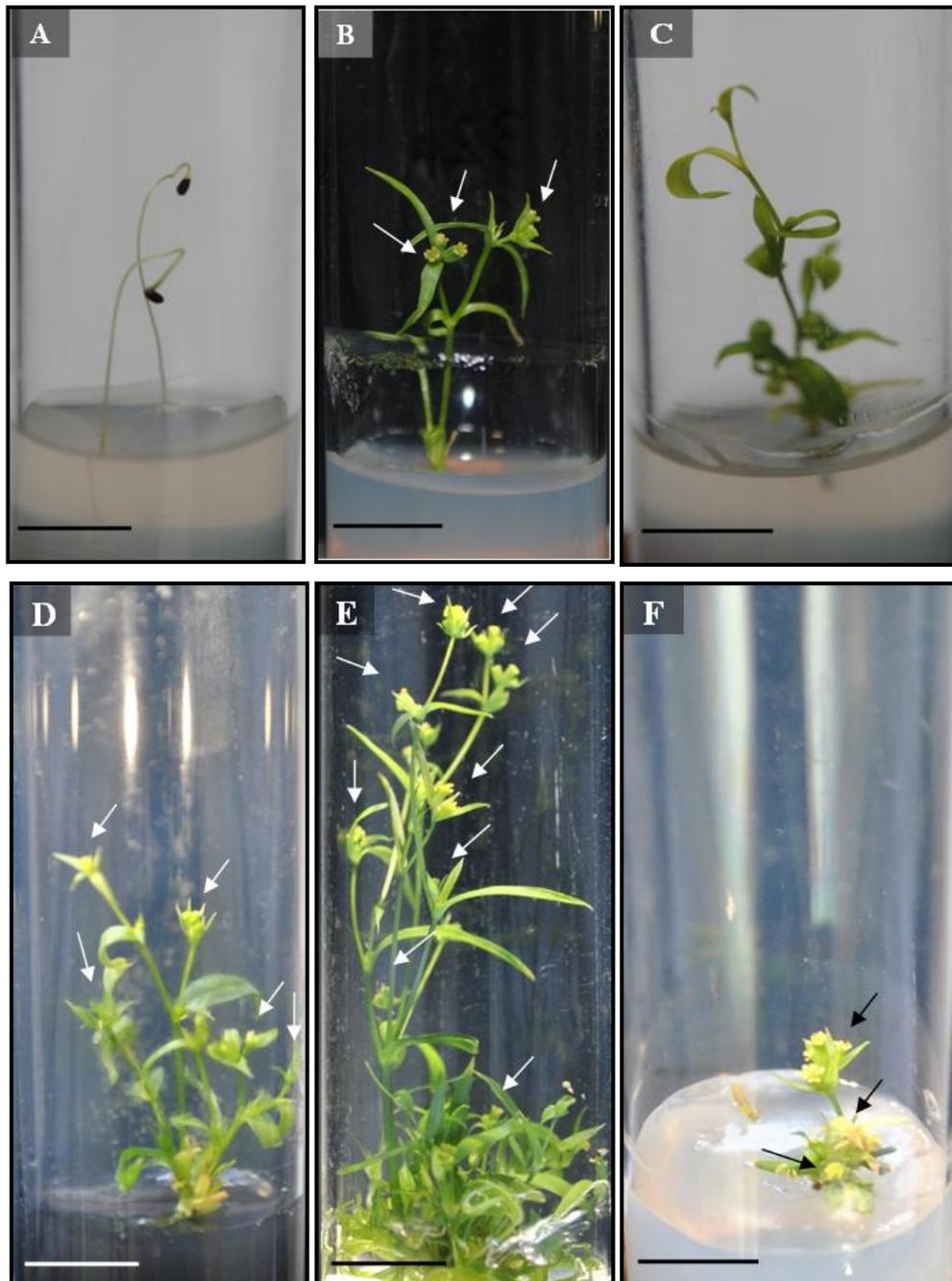
Verificou-se a formação de inflorescências em alguns ápices caulinares, após 3 semanas de cultura. De forma a testar a influência de BAP na floração *in vitro*, adicionaram-se diferentes concentrações da hormona ao meio de cultura MS (0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP). Para testar a influência do carvão ativado (AC), este foi adicionado ao meio de cultura com 0,25 mg l<sup>-1</sup> de BAP (Fig.20D). Após 30 dias de cultura, registou-se o número de explantes que floriram. O meio de cultura onde ocorreu maior percentagem de floração foi o meio suplementado com 2,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP (Fig.20E) tendo-se verificado diferenças significativas entre este e os meios com 0,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP (Fig.20B) (p<0,01) e com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de BAP (p<0,05) (Fig.19). Não se verificaram diferenças significativas na percentagem de floração entre o meio de cultura com AC e o meio com a mesma concentração de BAP sem AC (Fig.19). Observou-se também que

com o aumento do número de subculturas, a floração *in vitro* ocorre com maior precocidade o que dificulta a multiplicação desta espécie, mesmo no meio de cultura com 0,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP (Fig.20F) onde se observou inicialmente uma menor percentagem de floração (Fig.19).

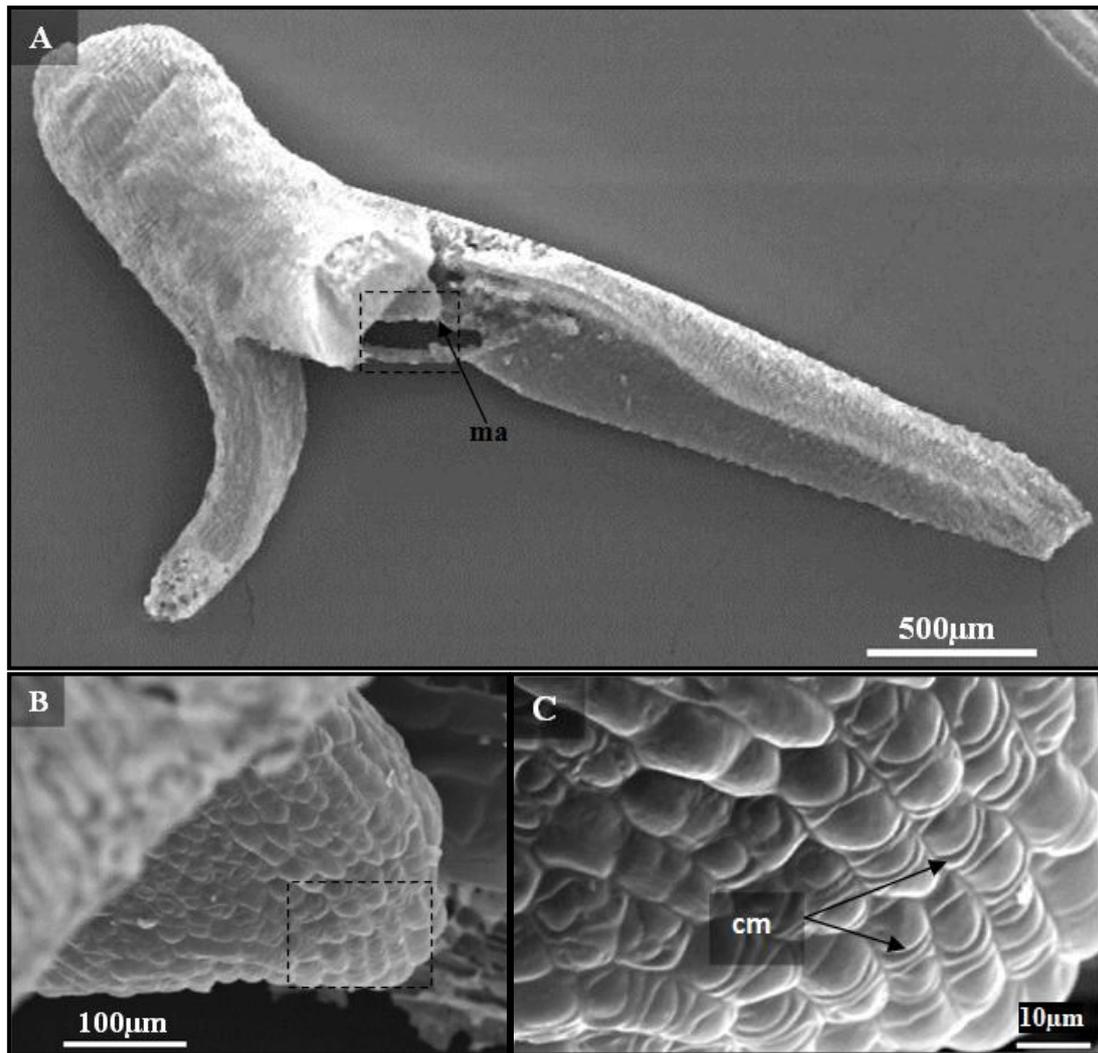
As inflorescências de *B. gerardi* foram também observadas ao microscópio eletrónico de varrimento (Figs. 21, 22, 23), para tal utilizaram-se secções de inflorescências de plântulas cultivadas *in vitro* durante 0, 5, 10, 15 e 20 dias em meio MS suplementado com 0,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 3% (p/v) de sacarose (secção 2.4.2). A análise microscópica permitiu observar a formação de meristemas florais nos explantes com 15 dias de cultura (Fig.22) e a formação de flores completamente desenvolvidas após 20 dias de cultura (Fig.23).



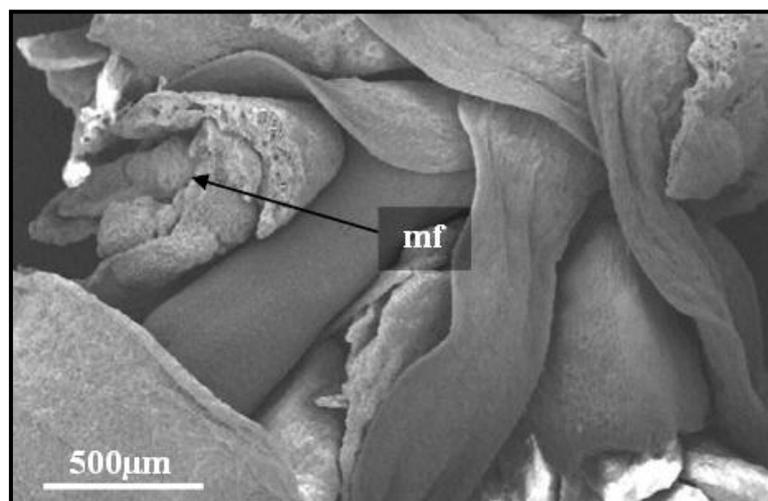
**Figura 19.** Efeito da concentração de BAP na floração *in vitro* via proliferação de meristemas de *B. gerardi*. O meio sem BAP é o meio controlo. O meio 0,25 + AC contém 0,25 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 2 g l<sup>-1</sup> de AC. Cada valor corresponde à média ± SEM de três experiências. **a=** (p<0.05). **b=** (p<0.05), diferenças significativas segundo o teste de Tukey.



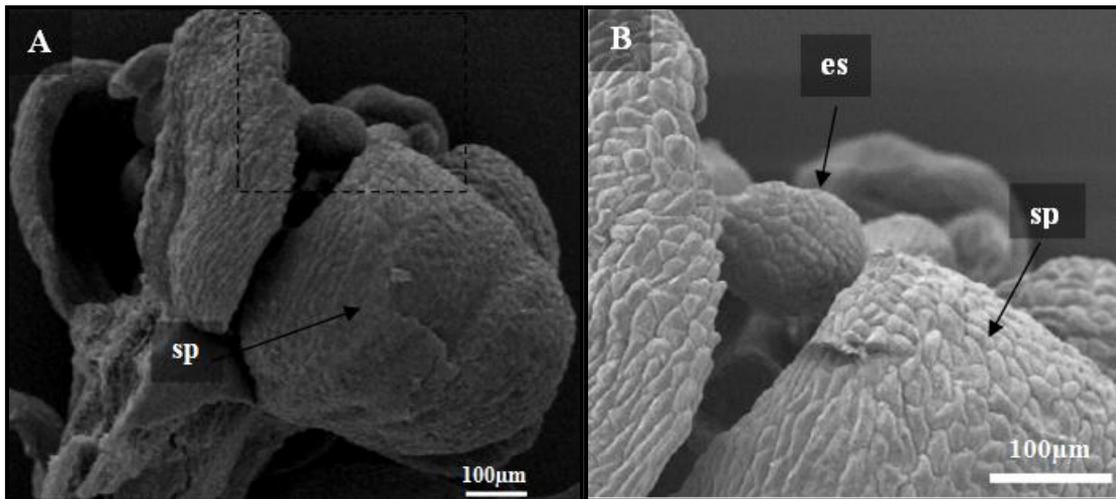
**Figura 20.** Cultura *in vitro* de *B. gerardi* via proliferação de meristemas. **A-** Plântulas provenientes da germinação de sementes. **B e C-** Proliferação de meristemas apicais, cultivado em meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP durante 4 semanas. **D-** Proliferação do meristema apical, cultivado em meio MS suplementado com  $0,25 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP e  $2 \text{ g l}^{-1}$  de AC durante 4 semanas. **E-** Proliferação do meristema apical, cultivado em meio MS suplementado com  $2 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP durante 4 semanas. **F-** Subcultura da proliferação de meristemas, cultivado em meio MS suplementado com  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP durante 4 semanas. As **setas** indicam formação de flores. Barra= 1cm.



**Figura 21.** Floração *in vitro* de *B. gerardi*, SEM. **A**- Ápice caulinar após 5 dias de cultura. **B e C** - Pormenores da zona meristemática de um ápice caulinar após 5 dias de cultura **ma**- meristema apical. **cm**- células meristemáticas em divisão.



**Figura 22.** Ápice caulinar de *B. gerardi* após 15 dias de cultura, SEM. **mf**- meristema floral.



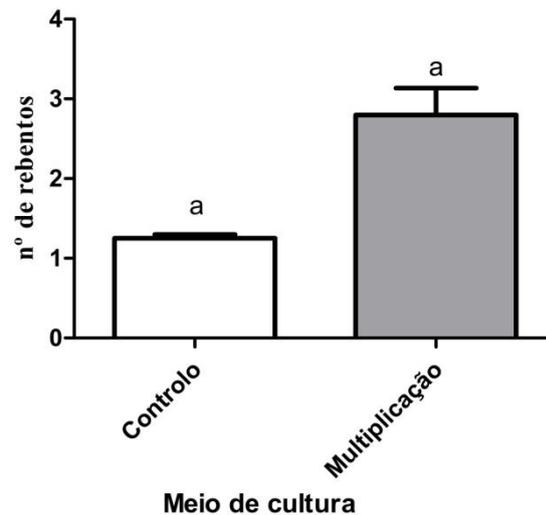
**Figura 23.** Floração *in vitro* de *B. gerardi*, SEM. **A**-Flor formada após 20 dias de cultura. **B**- Pormenor de uma flor formada após 20 dias de cultura **sp**- sépala. **es**- estigma.

### 3.3.3 *B. fruticosum*

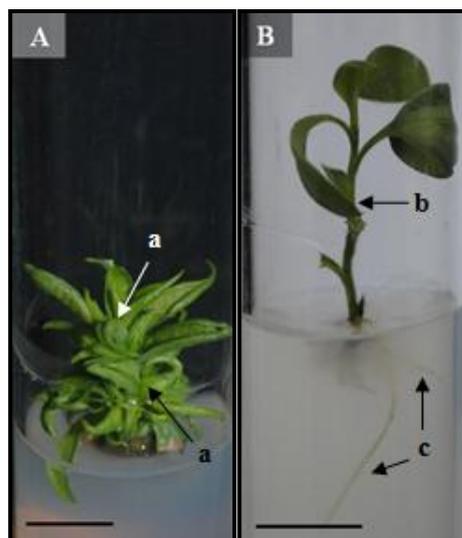
#### 3.3.3.1. Proliferação de meristemas

A cultura *in vitro* desta espécie foi realizada a partir da proliferação de meristemas axilares de uma planta presente no JBU. Apesar de se observarem algumas infeções fúngicas obteve-se uma resposta positiva dos explantes inoculados. O número de rebentos formados por explante (os explantes infetados foram excluídos) foi registado após 4 semanas de cultura e observaram-se diferenças significativas na multiplicação dos explantes inoculados no meio de controlo ( $1,25 \pm 0,07$ ), ( $p < 0,05$ ) (Fig.24) em comparação com o meio de multiplicação ( $2,8 \pm 0,67$ ) (Fig.25A).

Procedeu-se ao enraizamento das plântulas obtidas na fase de multiplicação e após 4 semanas de cultura a formação de raízes foi registada. Observou-se apenas a formação de raízes nas plântulas inoculadas no meio de cultura suplementado com  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  de IBA (Fig. 25B) e a percentagem de formação de raízes foi em média  $36,0 \pm 4,58 \%$ .



**Figura 24.** Influência dos meios de cultura (controlo e multiplicação) no número de rebentos caulinares formados por proliferação de meristemas de *B. fruticosum*, durante 4 semanas de cultura. O meio controlo, é o meio MS suplementado com 3% (p/v) de sacarose; o meio de multiplicação é o meio MS suplementado com 1,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP, 1,0 mg l<sup>-1</sup> de IAA e 3% (p/v) de sacarose. Cada valor corresponde à média ± SEM de três experiências. **a**=(p<0.05), diferenças significativas segundo o teste de Tukey.



**Figura 25.** Cultura *in vitro* de *B. fruticosum* via proliferação de meristemas. **A-** Rebentos caulinares resultantes da proliferação de meristemas axilares, cultivados em meio MS suplementado com 1,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP, 0,5 mg l<sup>-1</sup> de IAA e 3% de sacarose durante 4 semanas. **B-** Planta com raízes, cultivada durante 2 semanas em meio MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de IBA e 2 semanas em meio MS, diluído a metade da concentração e suplementado com 3% de sacarose. **a-** rebento caulinar. **b-** parte aérea da planta. **c-** raízes. Barra= 1cm.

3.3.4. Embriogênese somática

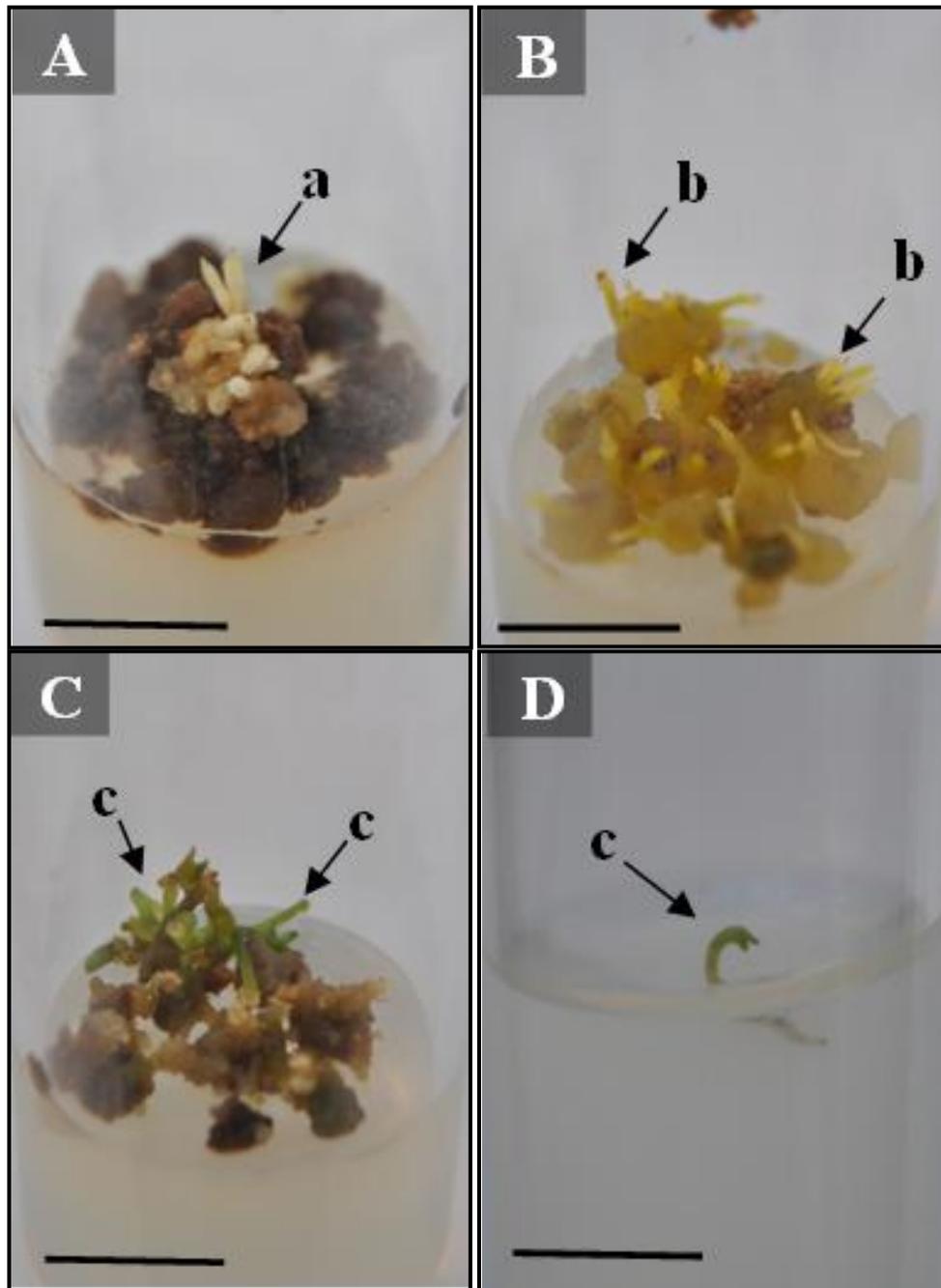
A micropropagação das espécies estudadas foi igualmente testada via embriogênese somática. Em *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. gerardi* observou-se a formação de calos em todos os explantes inoculados no meio com reguladores de crescimento (Tabelas 9). Na cultura de *B. fruticosum* 63,64 % dos tubos de ensaio foram contaminados por fungos (Tabela 9) , no entanto observou-se a formação de calos em todos os tubos de ensaio sem contaminações fúngicas. No meio de controlo não se observou a formação de calos.

De forma a clarificar a natureza dos calos formados no meio de indução, inocularam-se porções de calos em meio de cultura MS diluído a metade da concentração com 1% (p/v) de sacarose, ao fim de 60 dias registou-se a formação e o desenvolvimento de embriões. Em *B. rigidum* subsp. *paniculatum* apenas se observou desenvolvimento de estruturas esbranquiçadas semelhantes a embriões em dois 2 explantes (6,06%) (Tabela 9), essas estruturas foram mantidas no mesmo meio de cultura de forma a completarem o seu desenvolvimento (Fig.26A). Em *B. gerardi* observou-se a formação de um grande número de estruturas de tonalidade amarela em 52,94 % dos explantes (Tabela 9). Porções dessas estruturas foram mantidas no mesmo meio de cultura de forma a completarem o seu desenvolvimento (Fig.26B). Em *B. fruticosum*, observou-se a formação de embriões a partir dos calos e em 58,33% (Tabela 9), destes observou-se a germinação dos embriões (Fig.26C). No total desenvolveram-se 47 plantas, as quais foram inoculadas no mesmo meio de cultura de forma a finalizarem o seu desenvolvimento (Fig.26D).

**Tabela 9-** Indução de embriogênese em segmentos foliares de *Bupleurum* spp.

Espécie	Meio de cultura	Indução (%)	Formação de embriões ( %) *
<i>B. rigidum</i> subsp. <i>paniculatum</i>	1,0 mg l <sup>-1</sup> de 2-4 D + 0,2 mg l <sup>-1</sup> de KN	100	6,1
<i>B. gerardi</i>	1,0 mg l <sup>-1</sup> de 2-4 D + 0,2 mg l <sup>-1</sup> de KN	100	52,9
<i>B. fruticosum</i>	1,0 mg l <sup>-1</sup> de 2-4 D + 0,2 mg l <sup>-1</sup> de KN	36,4	58,3

\* Meio de cultura MS suplementado com 1% (p/v) de sacarose.



**Figura 26.** Indução de embriogênese somática em *Bupleurum* spp. **A-** *B. rigidum* subsp. *paniculatum*. **B-** *B. gerardi*. **C e D-** *B. fruticosum*. **a e b-** embriões somáticos de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. gerardi*, respectivamente. **c-** embriões somáticos germinados. Barra= 1cm.

### 3.4. Estruturas secretoras de *Bupleurum* spp.

De forma a identificar as estruturas onde são sintetizados e acumulados os óleos essenciais foram feitas observações microscópicas (MO e SEM) de secções de diferentes órgãos das plantas em estudo (secção 2.4.1).

#### 3.4.1 *B. rigidum* subsp. *paniculatum*

Para a análise das estruturas secretoras desta espécie foram realizados cortes histológicos de caules, folhas e flores (Tabela 5).

Foram efetuados cortes histológicos transversais de secções de caules (Fig.27A, B) obtidos a partir de plantas colhidas no seu habitat natural (secção 2.4.1.1). A observação ao MO permitiu a identificação de 8 a 9 canais secretores por secção localizados entre a zona vascular e a zona cortical (Fig.27A). Estruturas semelhantes às identificadas nos caules foram observadas igualmente em secções de folhas ( com 1 canal na nervura central e 1 em cada nervura secundária) (Fig.27C, D) e de flores (11 a 12 canais em cada secção floral) (Fig.27E). A observação por SEM de secções transversais de caules permitiu igualmente identificar estruturas semelhantes às observadas anteriormente (Fig.27G, H), permitindo observar em pormenor as células que limitam o lúmen do canal (Fig.27H).

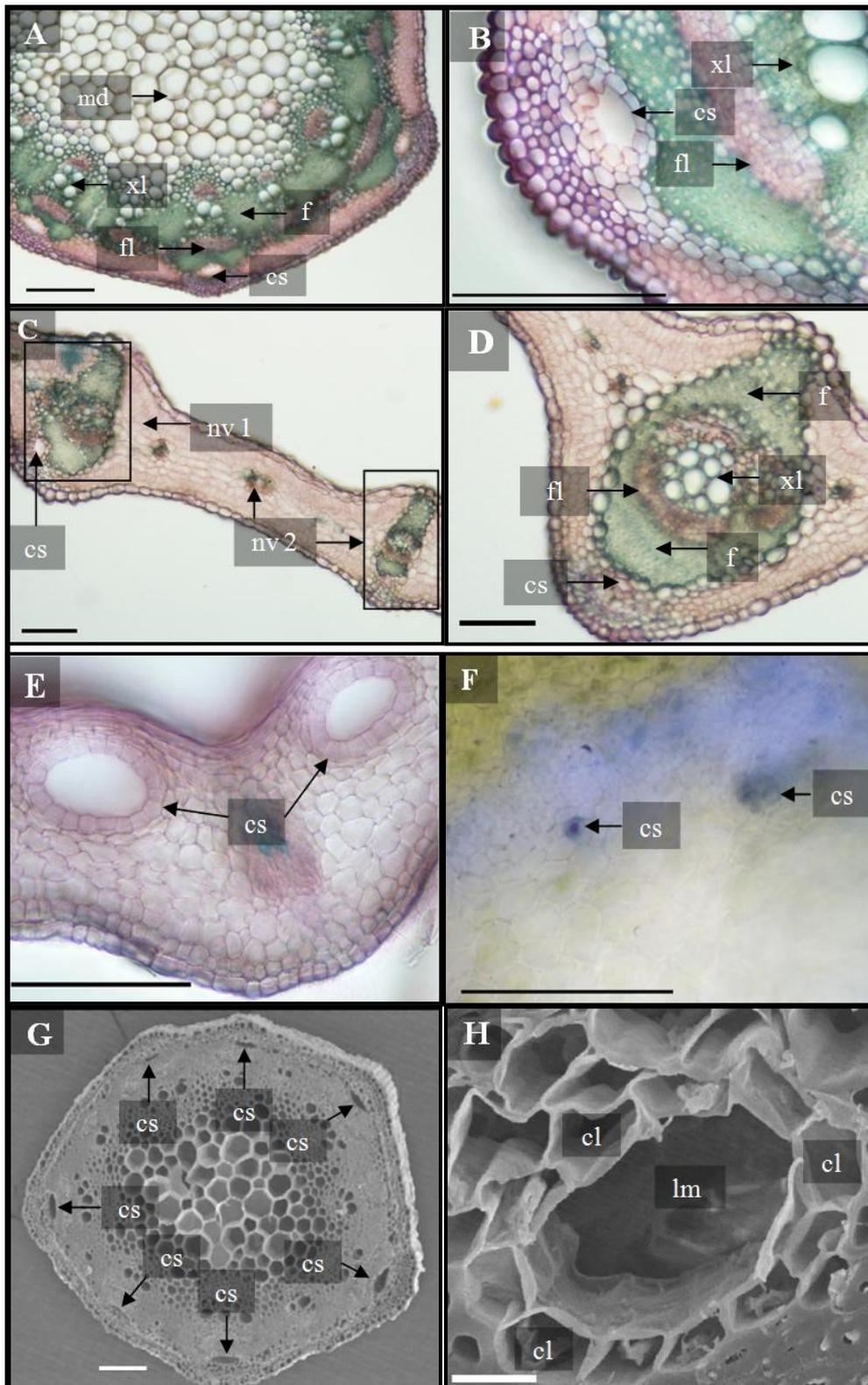
Para analisar as estruturas secretoras de plantas cultivadas *in vitro* utilizaram-se secções de caules de plântulas cultivadas *in vitro* durante 4 semanas, completamente desenvolvidas. Observações ao MO permitiram identificar canais semelhantes aos observados nas plantas *in vivo* e a análise histoquímica de secções transversais do caule permitiu identificar os secretados contidos nos canais como compostos terpénicos (Fig.27F).

#### 3.4.2 *B. fruticosum*

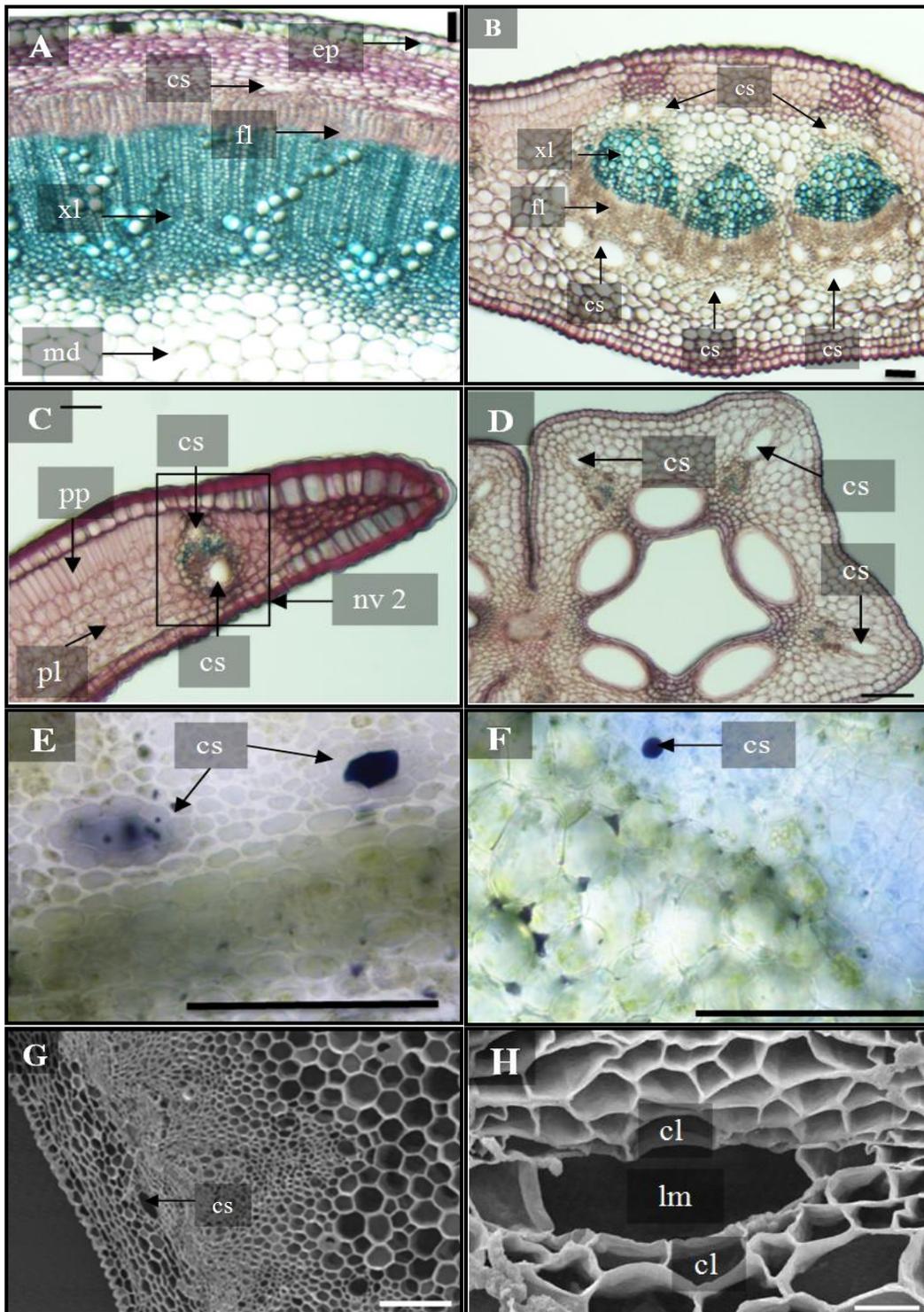
Para a análise das estruturas secretoras foram realizados cortes histológicos de caules, folhas e flores (Tabela 5).

Nos cortes histológicos transversais de secções do caule colhidos a partir da planta existente no JBU (secção 2.4.1.1), foi possível identificar 21 a 24 canais secretores por secção localizados na zona intermédia entre o floema secundário e a zona cortical (Fig.28A). A análise histoquímica permitiu identificar a natureza dos secretados inclusos nos canais como sendo compostos terpénicos (Fig.28E). Estruturas semelhantes às identificadas nos caules foram observadas igualmente em secções de folhas (entre 21 e 23 canais na nervura central e 2 em cada nervura secundária, Fig.28 B, C) e em secções de flores (entre 8 a 10 canais, Fig.28D). A observação de secções transversais de caules em SEM permitiu igualmente identificar estruturas semelhantes às observadas anteriormente (Fig.28G), permitindo observar as células que limitam o lúmen do canal (Fig.28H).

A caracterização das estruturas secretoras em plantas cultivadas *in vitro* foi realizada utilizando secções de caules de plântulas completamente desenvolvidas. A partir da observação destas secções em MO foi possível identificar canais semelhantes aos observados nas plantas *in vivo* e a análise histoquímica de secções transversais do caule permitiu identificar os secretados contidos nos canais como compostos terpénicos (Fig.28F).



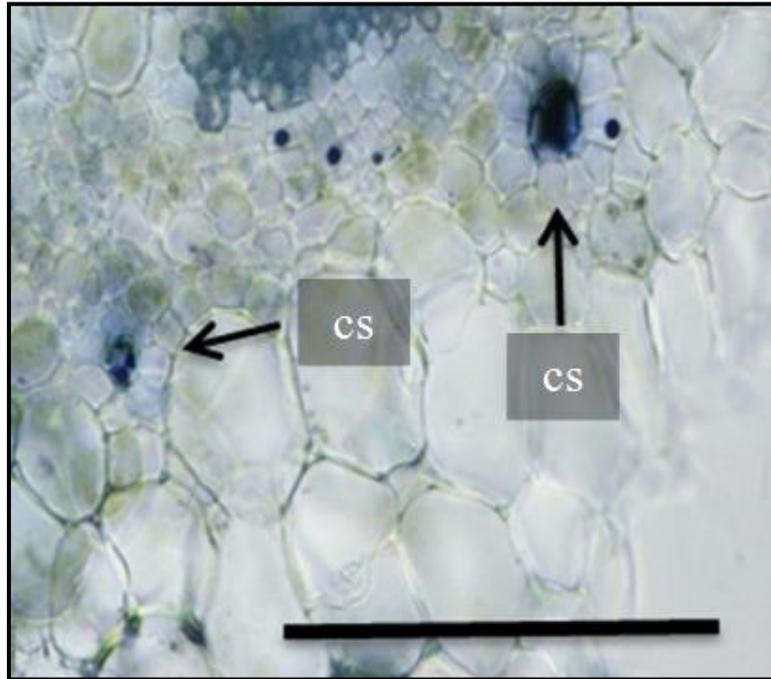
**Figura 27.** Canais secretores de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*. **A e B-** Secções transversais de um caule. **C e D-** Secções transversais de uma folha. **E-** Secção transversal de uma flor. **F-** Secção transversal de um caule, de uma planta estabelecida *in vitro*, corado com o reagente de NADI. **G e H-** Secções transversais observadas em SEM. **fl-** Floema. **xl-** Xilema. **cs-** Canal secretor. **f-** Fibras. **md-** Medula. **nv1-** Nervura principal. **nv2-** Nervuras secundárias. **lm-** Lúmen do canal secretor. **cl-** Célula secretora. Barra= 100 μm.



**Figura 28.** Canais secretores de *B. fruticosum*. **A-** Seção transversal de um caule. **B e C-** Seções transversais de uma folha. **D-** Seção transversal de uma flor. **E-** Corte histológico de um caule de uma planta colhida no seu habitat natural, corado com o reagente de NADI. **F-** Corte histológico de um caule de uma planta estabelecida *in vitro*, corado com o reagente de NADI. **G e H-** Cortes histológicos observados em SEM. **fl-** Floema. **xl-** Xilema. **cs-** Canal secretor. **md-** Medula. **pp-** Parênquima em paliçada. **pl-** Parênquima lacunoso. **nv2-** Nervuras secundárias. **lm-** Lúmen do canal secretor. **cl-** Célula secretora. Barra= 100 µm.

3.4.3 *B. gerardi*

Para a análise das estruturas secretoras desta espécie foram utilizadas secções de caules de plantas estabelecidas *in vitro*. A partir da observação destas secções ao MO foi possível identificar canais semelhantes aos observados nas outras espécies estudadas. A análise histoquímica de secções transversais do caule permitiu, também, identificar os secretados contidos nos canais como sendo compostos terpénicos (Fig.29).



**Figura 29.** Secção transversal de um caule de uma planta estabelecida *in vitro*, corada com o reagente de NADI. cs- Canais secretores. Barra= 100  $\mu$ m.

## 4. DISCUSSÃO



#### 4.1 Extração dos óleos essenciais

*B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. lancifolium* foram as espécies selecionadas para a extração dos óleos essenciais, pois foi possível encontrar populações que permitiram a colheita de material vegetal suficiente sem colocar em risco a preservação destas.

O óleo essencial das partes aéreas floridas sem sementes maduras de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* foi extraído com um rendimento de 0,39% (p/v). O óleo mostrou ser maioritariamente constituído por hidrocarbonetos monoterpénicos sendo os principais constituintes  $\alpha$ - pineno (36%),  $\beta$ - pineno (26%) e limoneno (10,5%). Num estudo prévio realizado no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, o óleo essencial extraído das partes aéreas floridas da planta com sementes maduras mostrou a presença dos mesmos constituintes maioritários, mas com ligeiras variações quantitativas. No único trabalho publicado sobre a composição do óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, os autores analisaram os óleos de plantas colhidas nos Montes Toledo, mostrando também a presença dos constituintes maioritários,  $\alpha$  e  $\beta$ - pinenos (Palá-Paúl *et al.*, 1999). Adicionalmente teores elevados de mircenos (26,2%) foram identificados nessa amostra e o limoneno foi encontrado em teores semelhantes ao do óleo português (12,5%). As diferenças observadas entre os 3 óleos isolados da mesma espécie mas provenientes de populações diferentes comprovam que plantas da mesma espécie sob influência de diferentes fatores abióticos podem biossintetizar óleos essenciais com composições distintas. O óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* extraído neste trabalho foi utilizado ulteriormente na avaliação da sua atividade anti-inflamatória e citotoxicidade.

O óleo essencial das partes aéreas floridas e dos frutos secos de *B. lancifolium* apresentou um rendimento muito baixo, não sendo possível a recolha do óleo essencial para estudos de bioatividade. No entanto, num trabalho anterior foi possível a extração de óleo, utilizando a mesma metodologia (hidrodestilação), os constituintes maioritários encontrados foram espatulenol (15,4%) e  $\alpha$ -pineno (10,8%) em flores e hexacosano (13,0%) e pentacosano (12,0%) em frutos (Saraçoğlu *et al.*, 2012). O diminuto teor de óleo essencial nas plantas utilizadas no presente trabalho poderá ser justificado pela eventual influência de fatores intrínsecos ou das condições ambientais em que as plantas se desenvolveram (Figueiredo *et al.*, 2008).

## 4.2. Atividade anti-inflamatória

O efeito anti-inflamatório do óleo essencial de diversas espécies de *Bupleurum* tem sido reportado usando modelos *in vitro* e *in vivo* (Ashour & Wink, 2011). Considerando as espécies alvo no presente trabalho, somente para *B. fruticosum* foi reportado o potencial anti-inflamatório do óleo, em edemas de rato induzidos por carragenina (Lorente *et al.*, 1989).

No presente estudo foi selecionado um modelo *in vitro* (linha celular de macrófagos), otimizado para o efeito, como método de avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos. O parâmetro anti-inflamatório analisado foi a inibição da produção de NO em células estimuladas por LPS. O NO é um mediador pró-inflamatório produzido em elevada quantidade durante os processos inflamatórios. As linhas celulares de macrófagos de ratos após estimulação com LPS (simula uma infecção) expressam a principal enzima envolvida neste processo, a óxido nítrico sintase induzível, iNOS (Calixto *et al.*, 2003). A inibição desta enzima e a consequente diminuição dos níveis de NO tem sido vista como uma estratégia na busca de novos agentes anti-inflamatórios (Vallance & Leiper, 2002). Paralelamente a citotoxicidade dos óleos foi analisada de forma a determinar concentrações bioativas e seguras dos mesmos.

Nos testes efetuados com óleos essenciais de *B. fruticosum* ambas as amostras evidenciaram diminuições significativas na produção de nitritos pelos macrófagos na concentração de  $0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$ , em comparação com os macrófagos estimulados somente com LPS (controle). Na amostra II também se verificou uma diminuição significativa na concentração de  $0,32 \mu\text{l ml}^{-1}$ . Apesar de se constatar a diminuição da produção de nitritos nas células em contacto com as concentrações anteriormente referidas, verificou-se igualmente, através do ensaio do MTT, que estas concentrações eram citotóxicas. Tais resultados evidenciam que a diminuição da produção de nitritos está relacionada com a morte celular. Ou seja, a menor produção de nitritos deve-se à diminuição do número de células e não à inibição da produção de nitritos causada pelo óleo essencial.

Lorente demonstrou a atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *B. fruticosum* (Lorente *et al.*, 1989), no entanto como utilizou um modelo *in vivo* não se sabe qual o mecanismo de ação. Tendo por base os presentes resultados, o mecanismo de ação não estará relacionado com inibição da produção de NO mas com outro mecanismo, como por exemplo o efeito nos metabolitos da via do ácido araquidónico (LOX, COX) ou na produção de citocinas pro-inflamatórias (Issa *et al.*, 2006; Miguel, 2010).

Apesar dos dois óleos de *B. fruticosum* não mostrarem atividade anti-inflamatória, foi possível determinar as concentrações seguras destes óleos. A amostra I mostrou ser menos tóxica comparativamente à amostra II. Apesar de as duas amostras apresentarem os mesmos

constituintes maioritários ( $\alpha$  e  $\beta$  pineno), os óleos essenciais são uma mistura complexa de compostos, podendo a diferente toxicidade ter origem em compostos minoritários presentes em diferentes concentrações nas duas amostras, bem como nas variações quantitativas dos principais compostos. As diferenças quantitativas na composição dos óleos devem-se ao facto das plantas terem sido colhidas em alturas diferentes, com estados de desenvolvimento distintos. Lorente *et al.* (1989) comprovaram que a atividade anti-inflamatória de *B. fruticosum* se deve em grande parte aos seus dois principais constituintes,  $\alpha$  e  $\beta$  pineno. No entanto a atividade dos compostos isolados demonstrou ser relativamente menor que a do óleo essencial o que demonstra a existência de sinergias entre os diversos constituintes dos óleos.

Ambos os óleos essenciais de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, mostraram diminuições significativas na produção de nitritos pelos macrófagos na concentração de  $0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$  em comparação com os macrófagos estimulados somente com LPS (controlo). Na amostra II, apesar de se constatar a diminuição da produção de nitritos nas células em contacto com óleo essencial, verificou-se igualmente, através do ensaio do MTT, que esta concentração é citotóxica para as células. Tais resultados evidenciam, mais uma vez, que a diminuição da produção de nitritos deve-se à morte celular. A amostra I, por sua vez, mostrou potencial anti-inflamatório pois não apresentou toxicidade para as células na concentração bioativa ( $0,64 \mu\text{l ml}^{-1}$ ). Mais uma vez ficou patente que amostras da mesma espécie podem apresentar resultados distintos. As duas amostras foram obtidas de duas populações diferentes, cujos óleos essenciais apesar de apresentarem os mesmos constituintes maioritários demonstram alguma variabilidade em termos quantitativos.

Outros autores demonstraram, também, a eficácia de óleos essenciais com elevados teores de  $\alpha$  ou  $\beta$ -pineno na inibição da produção de NO, nomeadamente os óleos de *Artemisia capillaris* (Cha *et al.*, 2009), *Abies koreana* (Yoon *et al.*, 2009) e *Juniperus oxycedrus* (Neves *et al.*, 2010).

### 4.3 Culturas *in vitro*

No presente trabalho foram estabelecidos, pela primeira vez, protocolos de cultura *in vitro*, eficientes para a multiplicação em larga escala de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum* da flora portuguesa e para tal foram utilizados diversos procedimentos incluindo a germinação de sementes, extração e germinação de embriões zigóticos, proliferação de meristemas, organogénese e embriogénese somática.

A propagação das espécies em estudo por via seminal foi realizada com o objetivo de obter material vegetal para a proliferação de meristemas, em alternativa à utilização de meristemas provenientes de plantas colhidas no habitat natural. Apesar de não permitir a

manutenção do genótipo das plantas propagadas esta técnica demonstrou ser bastante importante no estabelecimento inicial das culturas de *B. gerardi* e *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, que foram propagadas pela primeira vez por esta via. De facto, a propagação via seminal de *Bupleurum* spp. é limitada devido à rápida perda de viabilidade das sementes e à presença frequente de dormência (Fraternale *et al.*, 2002). Por outro lado, fatores como a temperatura e as condições de luz também podem influenciar diretamente a germinação das sementes (Madakadze *et al.*, 1993).

Para além da proliferação de meristemas apicais de plantas formadas por via seminal, referida anteriormente, foram também estabelecidas culturas *in vitro* usando meristemas axilares obtidos a partir de plantas de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. fruticosum* colhidas no seu habitat natural. A micropropagação via proliferação de meristemas axilares é uma metodologia vantajosa em relação à micropropagação com meristemas provenientes da germinação de sementes, pois permite a conservação do genótipo e a obtenção de clones geneticamente iguais à planta-mãe. No entanto neste tipo de cultura *in vitro* é necessário prestar especial atenção à desinfeção dos explantes devido à grande suscetibilidade destes a contaminações, neste caso adicionou-se ao protocolo de desinfeção um antifúngico sistémico (0,3 g l<sup>-1</sup> Benlato). Apesar de ocorrerem algumas infeções a metodologia utilizada permitiu o estabelecimento de um elevado número de culturas assépticas.

Finalmente, foi igualmente avaliada a propagação das espécies via embriogénese somática. Nesta técnica apesar de existir maior probabilidade de ocorrência de variações genéticas, a subcultura de calos com capacidade embriogénica é possível durante um alargado período de tempo e as plantas geradas não necessitam de uma etapa de enraizamento.

#### 4.3.1 *Bupleurum rigidum* subsp. *paniculatum*

*B. rigidum* subsp. *paniculatum* existe em relativa abundância da Beira Litoral, onde foram identificadas 3 populações (Serra da Boa Viagem, Fonte coberta e Eiras) de grande dimensão. No entanto a propagação de meristemas provenientes de plantas colhidas nestas populações não foi eficaz, a adição de BAP ao meio de cultura não influenciou o desenvolvimento de novos rebentos caulinares. Nos explantes axilares para além de não se desenvolverem novos rebentos verificou-se a ocorrência de uma elevada taxa de oxidação, mesmo após o tratamento dos explantes com um antioxidante (ácido ascórbico). Adicionalmente, a inclusão de carvão ativado ao meio de cultura não influenciou a proliferação de meristemas axilares apesar deste composto ser frequentemente utilizado com êxito em algumas espécies devido a sua capacidade de absorção de substâncias inibidoras da proliferação (Pan & Staden, 1998).

Em alternativa testou-se a propagação de meristemas apicais provenientes da germinação de sementes. A propagação via seminal revelou-se igualmente ineficiente nesta espécie apesar das diversas condições testadas, nomeadamente luz e temperatura variáveis. Desta forma, a obtenção de plantas apenas foi possível após a extração dos embriões zigóticos das sementes e a germinação destes em meio MS diluído a metade da concentração e suplementado com 1% (p/v) de sacarose, com um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro a 25°C. Uma possível explicação para o facto das sementes não germinarem quando sujeitas às mesmas condições onde ocorreu a germinação dos embriões zigóticos extraídos das sementes da mesma colheita, é a existência de uma dormência fisiológica pouco profunda destas, provavelmente devido à grande impermeabilidade da testa ou à presença de substâncias que inibam a sua da germinação (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Utilizando os meristemas apicais como explantes, verificou-se o alongamento e desenvolvimento das folhas, no entanto não ocorreu a indução de novos rebentos. Apesar de a adição de BAP ter sido reportada eficazmente na fase de multiplicação de outras espécies de *Bupleurum*, nomeadamente, *B. kanoi* (Chen *et al.*, 2006) e *B. distichophyllum* (Karuppusamyand & Pullaiah, 2007), a forte dominância apical em *B. rigidum* subsp. *paniculatum* poderá ser responsável pela ausência de desenvolvimento de novos meristemas, mesmo após a adição de BAP (Canhoto, 2010). A adição de auxinas e citocininas, em simultâneo no meio de cultura, tem demonstrado ser mais eficiente na proliferação de meristemas em algumas espécies de *Bupleurum* em contraste com a adição de citocininas isoladas (Fraternali *et al.*, 2002; Bertoli *et al.*, 2004). De forma a testar o efeito combinado destas hormonas na proliferação de meristemas apicais desta espécie, adicionou-se 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP e 0,5 mg l<sup>-1</sup> IAA ao meio de cultura. Após 4 semanas de cultura, verificou-se a formação de calos na zona de contacto entre o explante e o meio. Os calos formados originaram novos rebentos que aumentaram consideravelmente de número após 6 semanas de cultura. A formação de novos rebentos a partir do calo denomina-se organogénese e difere da proliferação de meristemas, pois neste tipo de propagação ocorre a formação de um novo meristema a partir de células diferenciadas (Canhoto, 2010; Geneve, 2011). Tal como verificado noutras espécies, a formação de novos rebentos adventícios por esta via de propagação foi fortemente influenciada pela presença de uma elevada relação citocininas/auxinas. No entanto, plantas regeneradas a partir de rebentos adventícios têm maior probabilidade de apresentarem variações somaclonais, em comparação com plantas formadas via proliferação de meristemas (Geneve, 2011). Apesar das desvantagens desta técnica, a propagação via organogénese foi a única forma eficiente de propagar *B. rigidum* subsp. *paniculatum* *in vitro*. Os rebentos formados foram enraizados e a formação de raízes ocorreu em 60±5% dos rebentos, após 2 semanas em cultura em meio MS suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> IBA, seguido de 2 semanas de cultura em meio MS sem reguladores de crescimento. Por último, a indução de embriogénese somática foi também avaliada nesta espécie (secção 4.3.4).

#### 4.3.2 *Bupleurum gerardi*

*B. gerardi* apesar de ter uma ampla distribuição geográfica (Europa e Sudoeste Asiático), as suas populações são de dimensões muito reduzidas e dispersas (Neves *et al.*, 2009), sendo difícil efetuar colheitas sem comprometer a biodiversidade das populações naturais. Na única população referenciada na Beira Litoral, Serra da Boa Viagem, não foi possível identificar nenhuma planta desta espécie nas deslocamentos efetuados ao local, impossibilitando a colheita de material vegetal. Devido à sua escassez e à impossibilidade de colheita de plantas para o estabelecimento das culturas *in vitro* recorreu-se ao uso de sementes cedidas pelo banco de sementes do JBU. A germinação das sementes *in vitro* foi realizada em meio MS diluído a metade da concentração e suplementado com 1% (p/v) de sacarose, no escuro a 25°C. Após 30 dias de cultura a taxa de germinação foi de 39,43±1,37%. Os meristemas axilares das plantas obtidas foram utilizados como explantes para a propagação desta espécie via proliferação de meristemas, ultrapassando a limitação da ausência de plantas no habitat natural. Na proliferação de meristemas apicais de *B. gerardi* observou-se o desenvolvimento de rebentos axilares e a formação de inflorescências após 3 semanas de cultura. A adição de diferentes concentrações de BAP ao meio de cultura não influenciou significativamente a multiplicação desta espécie, no entanto verificou-se uma correlação entre a concentração de BAP e a indução da floração.

A maior percentagem de floração foi obtida no meio de cultura testado com maior concentração de BAP, 2,0 mg l<sup>-1</sup>. A influência desta hormona na indução da floração *in vitro*, foi também demonstrada em *Fortunella hindsi* (Jumin & Nito, 1996), *Boronia megastigma* (Roberts *et al.*, 1993), *Murraya paniculata* (Jumin & Ahmad, 1999) e *Bambusa edulis* (Lin *et al.*, 2003). A ação de BAP na floração está geralmente relacionada com a sua influência nas divisões celulares do meristema apical e posterior formação de meristemas florais (Corbesier *et al.*, 2003; Mahesh & Jeyachandran, 2013). Na análise da floração *in vitro* através de microscopia foi possível observar células meristemáticas de um meristema apical, cultivado durante 5 dias num meio de cultura com 0,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP, em divisão celular. Na cultura *in vitro* de *B. gerardi* a floração ocorre nos meios de cultura com e sem a presença de BAP, no meio de cultura sem a adição de BAP a floração pode ser justificada pela ação de reguladores de crescimento endógenos, tal como acontece reportado para outras espécies (Mahesh & Jeyachandran, 2013). Observações ao SEM permitiram observar o desenvolvimento de meristemas florais após 15 dias de cultura, bem como o completo desenvolvimento de uma flor após 20 dias de cultivo.

A floração *in vitro* pode ser usada como uma ferramenta importante para o estudo da indução e desenvolvimento floral mas revela-se prejudicial na multiplicação *in vitro* pois, após

várias subculturas, os explantes perdem a capacidade de formar novos rebentos privilegiando a floração, que ocorre precocemente. Tal facto poderá ser explicado pelo acumular de reguladores de crescimento nos tecidos das plantas cultivadas *in vitro*. A propagação via embriogénese somática foi testada nesta espécie como alternativa à propagação via proliferação de meristemas (4.3.4).

#### 4.3.3 *Bupleurum fruticosum*

A proliferação de meristemas de *B. fruticosum* foi testada usando meristemas axilares provenientes de um arbusto presente no JBUC. Em trabalhos anteriores, Fraternali *et al.* (2002) e Bertoli *et al.* (2004) concluíram que a multiplicação desta espécie era beneficiada pela adição de BAP e IAA em simultâneo ao meio de cultura. Nesse sentido, o meio de multiplicação usado no presente trabalho foi suplementado com 1,5 mg l<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg l<sup>-1</sup> de IAA, verificando-se um efeito positivo na formação de rebentos axilares.

O enraizamento das plântulas formadas durante a fase de multiplicação foi possível após 2 semanas de cultura em meio suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> IBA, seguido de mais 2 semanas de cultura em meio sem reguladores de crescimento, registando-se uma taxa de enraizamento de 36% ( $\pm 4,58$ ) dos explantes. Foi igualmente testada a propagação desta espécie via embriogénese somática (4.3.4).

#### 4.3.4 Embriogénese somática

A indução de embriogénese somática efetuou-se a partir de secções foliares de plantas estabelecidas *in vitro* de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum*. A adição de 2,4-D e de 2,4-D em associação com KN tem sido eficaz na indução de embriogénese somática em diversas espécies de *Bupleurum*, particularmente *B. falcatum* (Hiraoka, 1983; Hiraoka *et al.*, 1986; Shon *et al.*, 2004) e *B. scorzonerifolium* (Guang-min *et al.*, 1992). Nesse sentido, a capacidade de indução de embriões somáticos foi testada utilizando meio de cultura com a adição de 1,0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg l<sup>-1</sup> de KN. Após 8 semanas de cultura no escuro, todos os explantes de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. gerardi* formaram massas proembriogénicas (calos). Na cultura de *B. fruticosum* verificou-se a indução em 36,36% dos explantes. Os explantes que não formaram calos embriogénicos apresentavam contaminações, provavelmente de natureza fúngica, o que poderá ter ocorrido durante a inoculação ou durante a cultura *in vitro*. Nos calos formados durante este processo não se observou a formação de embriões somáticos. Os embriões somáticos nas espécies estudadas, bem como na generalidade das espécies (Canhoto, 2010; Loberant & Altman, 2010), formaram-se num processo de duas fases, primeiro desenvolveram-se os calos induzidos que proliferaram na presença da auxina e os embriões

somáticos desenvolveram-se somente quando os calos foram transferidos para um meio de cultura sem reguladores de crescimento. Assim, após 8 semanas de cultura em meio sem reguladores de crescimento, observou-se a formação de embriões somáticos em todas as espécies e a germinação dos embriões formados em *B. fruticosum*. Paralelamente, porções de calos foram mantidas no mesmo meio de cultura onde ocorreu a indução, verificando-se uma contínua proliferação dos mesmos.

A embriogênese somática pode revelar-se uma técnica de propagação vantajosa para a micropropagação das espécie em estudo, pois permite, após indução e em alternativa a propagação via proliferação de meristemas, a manutenção da cultura durante um alargado período de tempo e consequente formação de um grande número de plantas.

#### 4.4 Estruturas secretoras

As estruturas secretoras de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum* foram caracterizadas recorrendo a várias técnicas de microscopia. As estruturas secretoras envolvidas na produção e acumulação dos óleos essenciais foram identificadas como sendo canais secretores, tal como observado por outros autores em espécies do género *Bupleurum* (Manunta *et al.*, 1992) e na família Apiaceae (Svoboda & Svoboda, 2000).

As observações microscópicas permitiram também identificar canais secretores em plantas estabelecidas *in vitro* e identificar os secretados contidos nestas estruturas como sendo de origem terpénica. A identificação de compostos terpénicos em plântulas cultivadas *in vitro* comprova que as técnicas de cultura *in vitro* não interferem na biossíntese destes compostos que se encontram presentes mesmo em etapas iniciais do desenvolvimento das plantas (rebentos formados *in vitro*). Vários trabalhos têm mostrado que os óleos essenciais produzidos por plantas propagadas *in vitro* apresentam uma composição química semelhante aos óleos isolados das respetivas plantas-mãe (Arikati *et al.*, 2004; Avato *et al.*, 2005; Zuzarte *et al.*, 2010), incluindo um estudo realizado em *B. fruticosum* (Bertoli *et al.*, 2004).

## **5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS**



### 5.1. Conclusões

No presente trabalho, com base numa abordagem multidisciplinar e visando a valorização das espécies de *Bupleurum* spp. que crescem espontaneamente em Portugal, foi possível estudar as potencialidades de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. lacifolium* ao nível da produção de óleo essencial, investigar o efeito do óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. fruticosum* na inibição de NO (um mediador chave da inflamação) bem como avaliar a citotoxicidade destes e desenvolver protocolos de micropropagação para *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. fruticosum* e *B. gerardi*.

Foram identificadas, na região da Beira Litoral, várias populações espontâneas de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. lancifolium*, as quais permitiram a colheita de material vegetal de forma a proceder-se à extração dos seus óleos essenciais. A extração por hidrodestilação do material vegetal colhido, permitiu a obtenção de óleo de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*. O rendimento do óleo essencial foi de 0,39% (p/v) e os constituintes maioritários do óleo foram identificados como sendo  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e limoneno.

O efeito do óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* e *B. fruticosum* no processo inflamatório foi avaliado com base na inibição de NO. O óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* obtido de partes aéreas de plantas em flor e sementes maduras colhidas em Fátima apresentou propriedades anti-inflamatórias, pois na concentração de 0,64  $\mu\text{l ml}^{-1}$  inibiu a produção de nitritos e não revelou toxicidade. As outras amostras não inibiram a produção de nitritos e, exceto o óleo de *B. fruticosum* de partes aéreas de plantas com flores e sem sementes maduras na concentração 0,16  $\mu\text{l ml}^{-1}$ , todas mostraram toxicidade.

O estabelecimento de culturas *in vitro* foi testado via proliferação de meristemas e por embriogénese somática de *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum*. Nos ensaios de propagação de meristemas de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* apenas os explantes provenientes da germinação de embriões zigóticos permitiram a propagação desta espécie, no entanto a propagação deu-se via organogénese e não a partir de proliferação de meristemas. Os ápices caulinares cultivados em meio de cultura MS suplementado com 1,0  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP e 0,5  $\text{mg l}^{-1}$  de IAA permitiram o desenvolvimento indireto de um grande número de rebentos adventícios, o enraizamento destes ocorreu quando cultivados durante 2 semanas em meio suplementado com 1,0  $\text{mg l}^{-1}$  IBA e mais 2 semanas em meio de cultura sem reguladores de crescimento. Na proliferação de meristemas apicais, provenientes de plantas obtidas via seminal, de *B. gerardi* verificou-se o desenvolvimento de rebentos caulinares em meio de cultura com e sem BAP, no entanto, observou-se a floração *in vitro* dos explantes, o que prejudicou a propagação desta espécie por esta via ao fim de algumas subculturas. Em *B. fruticosum* a proliferação de meristemas axilares, provenientes de segmentos colhidos num arbusto presente no JBUC, em meio de cultura suplementado com 1,5  $\text{mg l}^{-1}$  de BAP e 1,0  $\text{mg l}^{-1}$

de IAA permitiu o desenvolvimento de rebentos caulinares e a multiplicação desta espécie *in vitro*. O enraizamento das plântulas ocorreu quando cultivadas durante 2 semanas em meio suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> IBA e mais 2 semanas em meio de cultura sem reguladores de crescimento. A indução de embriogénese, a partir de segmentos foliares de plantas estabelecidas *in vitro*, das três espécies ocorreu em duas fases. Observou-se a formação de uma massa pro-embriogénica nos explantes cultivados no meio de cultura suplementado com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg l<sup>-1</sup> de KN e somente quando estes foram transferidos para um meio de cultura sem reguladores de crescimento observou-se o desenvolvimento de embriões somáticos. Os embriões de *B. fruticosum* germinaram no mesmo meio onde se desenvolveram formando plantas completamente desenvolvidas. As massas pro-embriogénicas mantidas em meio de cultura com 1,0 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg l<sup>-1</sup> de KN continuaram a desenvolver-se, possibilitando a manutenção da cultura das espécies por esta via.

A análise das estruturas secretoras permitiu identificar canais secretores em *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. gerardi* e *B. fruticosum* e identificar compostos terpénicos nos secretados contidos nos canais de plântulas estabelecidas *in vitro* e de plantas *in vivo*.

### 5.2 Perspetivas futuras

O género *Bupleurum* apresenta grande biodiversidade na região Mediterrânica e em Portugal estão representados 10 taxa deste género, *B. acutifolium*, *B. fruticosum*, *B. gerardi*, *B. lancifolium*, *B. rigidum* subsp. *paniculatum*, *B. rigidum* subsp. *rigidum*, *B. rotundifolium*, *B. salicifolium*, *B. semicompositum* e *B. tenuissimum*. Apesar da grande diversidade a investigação nestas espécies em Portugal é muito residual, pelo que seria importante dar continuidade aos estudos fitoquímicos nestes taxa.

Atendendo aos resultados positivos obtidos na avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *B. rigidum* subsp. *paniculatum* poderá ser igualmente interessante testar o efeito deste óleo noutros mediadores importantes no processo inflamatório, bem como avaliar as possíveis atividades biológicas de outros óleos essenciais, extratos e compostos deste género.

O estabelecimento de culturas *in vitro* poderá permitir a seleção e a propagação em larga escala de espécies de *Bupleurum* spp., tendo em conta o grande potencial como plantas ornamentais de algumas espécies do género.

No caso da produção de óleos essenciais, caso os óleos essenciais de plantas cultivadas *in vitro* apresentem uma composição química semelhante à dos óleos das plantas *in vivo*, os métodos de propagação *in vitro* poderão permitir a obtenção de culturas em larga escala e de linhas mais produtivas, o que poderá possibilitar a produção industrial. A cultura de plantas *in vitro* poderá permitir também a propagação de plantas não disponíveis em habitat natural, por

exemplo *B. gerardi*, bem como a diminuição de recolhas massivas de plantas, contribuindo para a sua conservação.

## Referencias bibliográficas

- Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S., Shibli, R. A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100, 193–202.
- Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66, 233–249.
- Ascensão, L. (2007). Estruturas secretoras em plantas. Uma abordagem Morfo-Anatómica. In *In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático, 3ª Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa - Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa, Port* (pp. 19–28).
- Ashour, M. L., El-Readi, M., Youns, M., Mulyaningsih, S., Sporer, F., Efferth, T., Wink, M. (2009). Chemical composition and biological activity of the essential oil obtained from *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1079–1087.
- Ashour, M. L., Wink, M. (2011). Genus *Bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 305–321.
- Avato, P., Fortunato, I. M., Ruta, C., D'Elia, R. (2005). Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Science*, 169, 29–36.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Benítez, G., González-Tejero, M. R., Molero-Mesa, J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 87–105.
- Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Fraternali, D., Giamperi, L., Ricci, D. (2004). Volatile constituents of micropropagated plants of *Bupleurum fruticosum* L. *Plant Science*, 167, 807–810.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales* (2<sup>o</sup> ed.). Technique et Documentation-Lavoisier, Paris.
- Calixto, J. B., Otuki, M. F., Santos, A. R. S. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Medica*, 69, 973–983.
- Canhoto, J. (2010). *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Cha, J., Moon, S., Kim, H., Lee, J., Lee, K. (2009). The Essential Oil Isolated from *Artemisia capillaris* Prevents LPS-Induced Production of NO and PGE2 by Inhibiting MAPK-Mediated Pathways in RAW 264.7 Macrophages. *Immunological Investigations*, 38, 483–497.

- Chawla, H. S. (2002). *Introduction to Plant Biotechnology* (2nd ed.). Science Publishers, Inc., Enfield.
- Chen, U.-C., Hsia, C.-N., Yeh, M.-S., Chandra Agrawal, D., Tsay, H.-S. (2006). In vitro micropropagation and ex vitro acclimation of *Bupleurum kanoi*- an endangered medicinal plant native to Taiwan. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 42, 128–133.
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacquard, A., Lejeune, P., Van Onckelen, H., Périlleux, C., Bernier, G. (2003). Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2511–2517.
- Council of Europe. (1997). *European Pharmacopoeia* (3rd ed.). Council of Europe, Strasbourg.
- David, R., Carde, J. P. (1964). Coloration différentielle des pseudophylles de Pin maritime au réscitif de Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 258, 1338–1340.
- Fahn, A. (1990). *Plant anatomy* (4<sup>a</sup> ed.). Pergamon Press., Oxford.
- Fernández-Ocaña, A. M., Gómez-Rodríguez, M. V., Velasco-Negueruela, A., Camacho-Simarro, A. M., Fernández-López, C., Altarejos, J. (2004). In vivo antifungal activity of the essential oil of *Bupleurum gibraltarium* against *Plasmopara halstedii* in sunflower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6414–6417.
- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L. (2007). Plantas aromáticas e medicinais. Factores que afectam a produção. In *In: Figueiredo AC, JG Barroso, LG Pedro (Eds), 2007, Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático, pp. 3<sup>a</sup> Ed., Edição da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.* (pp. 1–18).
- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 213–226.
- Finch-Savage, W., Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 501–523.
- Fraternale, D., Giamperi, L., Ricci, D., & Rocchi, M. B. L. (2002). Micropropagation of *Bupleurum fruticosum*: The effect of triacontanol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 135–140.
- Geneve, R. (2011). Propagation from Nonmeristematic Tissues: Organogenesis. In R. Trigiano D. Gray (Eds.), *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology* (pp. 245–258). CRC Press.
- Guang-min, X., Zhongyi, L., Guang-qin, G., Hui-min, C. (1992). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. *Plant Cell Reports*, 11, 155–158.

- Guinea, M. C., Parellada, J., Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H. (1994). Biologically active triterpene saponins from *Bupleurum fruticosum*. *Planta Medica*, 60, 163–167.
- Herbal Pharmacology in the People's Republic of China, T. (1975). *A trip report of the American Herbal Pharmacology delegation*. Washington D.C, National Academy of Sciences.
- Herbert, R. (1989). *The Biosynthesis of Secondary Metabolites* (2nd. ed.). Springer, London.
- Hiraoka, N. (1983). *Bupleurum falcatum* L.: Embryogenesis and the Production of Saikosaponins. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 7, 69–81.
- Hiraoka, N., Kodama, T., Oyanagi, M., Nakano, S., Tolnita, Y., Yamada, N., Satake, M. (1986). Characteristics of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. *Plant Cell Reports*, 5, 319–321.
- Hsu, J., Liu, S., Tsay, H. (1993). Studies on tissue culture of *Bupleurum falcatum* L. *J. Agric. Res.*, 42, 245–252.
- Issa, A. Y., Volate, S. R., Wargovich, M. J. (2006). The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: new directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 405–419.
- Jumin, H. B., Ahmad, M. (1999). High-frequency in vitro flowering of *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Plant Cell Reports*, 18, 764–768.
- Jumin, H., Nito, N. (1996). In vitro flowering of *Fortunella hindsii* flowering of (Champ.). *Plant Cell Rep.*, 15, 484–488.
- Karuppusamyand, S., Pullaiah, T. (2007). In vitro Shoot Multiplication of *Bupleurum distichophyllum* Wight - A Native Medicinal Plant of Southern India. *Plant Tissue Cult. & Biotech.*, 17, 115–124.
- Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J. Y., Tan, R. X. (2005). In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 329–33.
- Lin, C., Chang, W. (2003). In vitro flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 71–78.
- Liu, K. (2008). *La rmn du carbone-13, outil d'analyse etude phytochimique de Clinopodium ascendens, Bupleurum fruticosum et Santolina corsica*. These. Université de Corse Pascal Paoli.
- Loberant, B., Altman, A. (2010). Micropropagation of plants. In Flickinger M. (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Lorente, M. A., Ocete, A., Cabo, M., & Jimenez, J. (1989). Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *Journal of Natural Products*, 52, 267–272.

- Madakadze, R., Chirco, E., Khan, A. (1993). Seed Germination of Three Flower Species following Matriconditioning under Various Environments. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118, 330–334.
- Mahesh, A., Jeyachandran, R. (2013). Influence of plant growth regulators on micropropagation and in vitro flowering of *Trichodesma indicum* (Linn) R. Br. *Plant Biosystems*, 147, 493–499.
- Manunta, A., Tirillini, B., Fraternali, D. (1992). Secretory tissues and essential oil composition of *Bupleurum fruticosum* L. *J. Essent. Oil Res.*, 4, 461–466.
- Martin, S., Padilla, E., Ocete, M. A., Galvez, J., Jiménez, J., Zarzuelo, A. (1993). Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *Planta medica*, 59, 533–536.
- Matsuda, H., Murakami, T., Ninomiya, K., Inadzuki, M., Yoshikawa, M. (1997). New hepatoprotective saponins, bupleurosides iii, vi, ix, and xiii, from chinese bupleuri radix : structure-requirements for the cytoprotective activity in primary cultured rat hepatocytes, 7, 2193–2198.
- Maxia, A., Frau, M. A., Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Salgueiro, L. (2011). Biological Assays and Chemical Composition of Volatile Oils of *Bupleurum fruticosum* L. (Apiaceae). *Academy of Chemistry of Globe Publications*, 2, 92–99.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15, 9252–9287.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Navarro, P., Giner, R. M., Recio, M. C., Máñez, S., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J.-L. (2001). In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. *Life Sciences*, 68, 1199–1206.
- Neves, A., Rosa, S., Gonçalves, J., Rufino, A., Judas, F., Salgueiro, L., Mendes, A. F. (2010). Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced Nf-kappaB activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of alpha-pinene. *Planta Medica*, 76, 303–8.
- Neves, S. (2003). *Bupleurum* L. In S. Castroviejo (Ed.), *Flora iberica: Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares Vol. X Araliaceae-Umbelliferae* (pp. 240–265). Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Neves, S. S., Weakley, A. S., Cox, P. B. (2009). *Bupleurum gerardii* All. (Apiaceae), an Addition to the North American Flora, With Comments on the Treatment of Aliens in Floras. *Castanea*, 74, 424–433.
- Neves, S., Watson, M. F. (2004). Phylogenetic relationships in *Bupleurum* (apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA its sequence data. *Annals of Botany*, 93, 379–398.

- Ocete, M. A., Risco, S., Zarzuelo, A., Jimenez, J. (1989). Pharmacological activity of the essential oil of *Bupleurum gibraltarium*: Anti-inflammatory activity and effects on isolated rat uteri. *Journal of Ethnopharmacology*, 25, 305–313.
- Palá-Paúl, Jesús Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A. (1999). Volatile Constituents Isolated from the Essential Oil of *Bupleurum rigidum* ssp. *paniculatum* (Brot.) H. Wolff. *Journal of Essential Oil Research*, 11, 456–458
- Pan, M., Staden, J. (1998). The use of charcoal in in vitro culture – A review. *Plant Growth Regulation*, 26, 155–163.
- Pearse, A. G. E. (1968). *Histochemistry - Theoretical and Applied* (3rd ed.). Churchill Livingstone. Edinburgh.
- Pistelli, L., Bertoli, A., Bilia, A. R., Morell, I. (1996). Minor constituents from *Bupleurum fruticosum* roots. *Phytochemistry*, 41, 1579–1582.
- Prieto, J. M., Ogunsina, M. O., Novak, A., Joshi, A., Kokai, J., Rocha, C., Santayana, M. P. (2012). Comparative study of the in vitro bioactivities of *Bupleurum rigidum* and *B. frutescens*. *Natural Product Communications*, 7, 757 – 760.
- Proença da Cunha, A. (2005). *Farmacognosia e fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Roberts, J., Luckman, G., Menary, R. (1993). In vitro flowering of *Boronia megastigma* Nees. and the effect of 6- benzylaminopurine. *J. Plant Growth Regul.*, 12, 117–122.
- Saraçoğlu, H., Zengin, G., Akin, M., Aktümsek, A. (2012). A comparative study on the fatty acid composition of the oils from five *Bupleurum* species collected from Turkey. *Turk J Biol*, 36, 527–532.
- Seigler, D. (1998). *Plant secondary metabolism*. Springer. Boston.
- Sell, C. (2010). Chemistry of essential oils. In Baser K., Buchbauer G. (Eds.), *Handbook of essential oils. Science, Technology, and Applications*. (pp. 121–151). Press, CRC.
- Shafaghat, A. (2011). Antioxidant , antimicrobial activities and fatty acid components of leaf and seed of *Bupleurum lancifolium*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 3758–3762.
- Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S., Maraffa, S. B. (1980). The Physiology of in Vitro Asexual Embryogenesis. In J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews*, 2 (pp. 268–310). John Wiley & Sons, Inc.
- Shon, T.-K., Kim, S.-K., Acquah, D., Lee, S.-C. (2004). Haploid Plantlet Production through Somatic Embryogenesis in Anther-Derived Callus of *Bupleurum falcatum*. *Plant Prod. Sci.*, 7, 204 – 211.
- Svoboda, K. P., Svoboda, T. G. (2000). *Secretory Tissues of Aromatic and Medicinal Plants - A Review and Atlas of Micrographs*. Microscopix Publications. UK.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2002). *Plant physiology* (3rd ed.). Sinauer Associates, Inc.
- The Japanese Pharmacopoeia*. (2011) (Sixteenth.). Ministry of Health, Labour and Welfare.

- Vallance, P., Leiper, J. (2002). Blocking no synthesis: how, where and why?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 939-950.
- WHO. (1999). *Monographs on Selected Medicinal Plants*. World Health Organization Geneva.
- WHO, IUCN, & WWF. (1993). *Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants* (pp. 1–38).
- Wink, M. (2010). Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. In *ANNUAL Plant Reviews*, 39 (2nd ed.). Blackwell Publishing Ltd.
- Yen, M.-H., Weng, T.-C., Liu, S.-Y., Chai, C.-Y., Lin, C.-C. (2005). The hepatoprotective effect of *Bupleurum kaoi*, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 442–448.
- Yoon, W.-J., Kim, S.-S., Oh, T.-H., Lee, N. H., Hyun, C.-G. (2009). *Abies koreana* essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and LPS-induced inflammatory effects of murine macrophage. *Lipids*, 44, 471–476.
- Zhu, Z., Liang, Z., Han, R. (2009). Saikosaponin accumulation and antioxidative protection in drought-stressed *Bupleurum chinense* DC. plants. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 326–333.
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44, 97–103.
- Zuzarte, M. R., Dinis, A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., Canhoto, J. M. (2010). Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 32, 580–587.