



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ensaio de biotransformação e cultura *in vitro* aplicados à valorização do medronheiro (*Arbutus unedo* L.)

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 Maria Teresa Batista (Universidade de Coimbra)

Lucie Domingues De Sousa

2015

Estudo financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, projeto PTDC/AGR-FOR/3746/2012 - *Arbutus unedo* plants and products quality improvement for the agroforestry sector, com apoio do COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade.

Apoios:



AGRADECIMENTOS

Ao terminar este percurso não posso deixar de agradecer a todos os que me acompanharam, apoiaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Um especial agradecimento aos meus orientadores. Ao professor Doutor Jorge Canhoto pela sua disponibilidade e orientação, pela revisão deste trabalho e sobretudo pela confiança e amizade. À professora Doutora Teresa Batista, por todos os conhecimentos transmitidos, pela orientação e revisão de texto e principalmente pela compreensão e simpatia.

Aos meus colegas de laboratório, pelos momentos partilhados ao longo deste ano.

Ao João Martins por toda a ajuda laboratorial, por se ter demonstrado sempre disponível em ajudar e pela sua boa disposição.

À Ana e à Daniela pela amizade, palavras, momentos e sorrisos partilhados. Por todo o apoio e motivação. Por, juntas, termos conseguido superar todas as dificuldades encontradas ao longo deste percurso.

À Rita por ter estado sempre “presente”, mesmo estando longe.

À Sara, Vanessa e Elisa, por toda a preocupação demonstrada, pelo carinho e amizade incondicional.

À Ana Rita, Ana Tavares, Bárbara, Joana, Rúben, Patrick, Zé, por todos os momentos de alegria passados juntos.

Aos meus avós, por todo o afeto e confiança depositada em mim.

Ao Bruno, por toda a paciência demonstrada, mesmo nos momentos mais difíceis. Pela ajuda incansável e por todo o amor e carinho.

Aos meus pais e irmãos, por todo o amor. Por terem sempre acreditado em mim e terem estado ao meu lado nesta fase tão importante. Sem eles, nunca teria conseguido chegar tão longe.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Contextualização do trabalho.....	3
1.2 <i>Arbutus unedo</i> - Medronheiro	3
1.2.1 Taxonomia	3
1.2.2 Descrição botânica.....	4
1.2.3 Distribuição geográfica.....	6
1.2.4 Aspetos ecológicos	7
1.2.5 Interesses na espécie	8
1.3 Biotecnologia e cultura <i>in vitro</i>	10
1.3.1 Princípios e aplicações.....	10
1.3.2 Propagação do medronheiro	11
1.3.3 Cultura de calos	12
1.4 Metabolitos do medronheiro	13
1.4.1 Compostos fenólicos.....	13
1.4.2 Vias metabólicas dos compostos fenólicos	15
1.4.3 Importância dos metabolitos - biotransformação	16
1.4.4 Arbutina	17
1.5 Objetivos	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Material vegetal	23
2.2 Metodologia	23
2.2.1 Propagação <i>in vitro</i> do medronheiro	23

2.2.2	Ensaio de estabelecimento de calo e suspensões celulares.....	24
2.2.2.1	Indução de calo	24
2.2.2.2	Avaliação do perfil de crescimento e otimização das condições de cultura	26
2.2.2.3	Estudos histológicos.....	27
2.2.3	Análise dos compostos fenólicos.....	28
2.2.3.1	Biotransformação	28
2.2.3.2	Extração de compostos fenólicos no material <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	29
2.2.3.3	Determinação do rendimento extrativo.....	30
2.2.3.4	Dosagem de fenóis totais	30
2.2.3.5	Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	31
2.2.4	Enraizamento de plantas - <i>dipping</i>	32
2.2.5	Análise estatística	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1	Ensaio de estabelecimento de calo e suspensões celulares.....	37
3.1.1	Indução de calo	37
3.1.2	Avaliação do perfil de crescimento e otimização das condições de cultura	41
3.1.3	Estudos histológicos	48
3.2	Análise dos compostos fenólicos	50
3.2.1	Determinação do rendimento extrativo no material <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	50
3.2.2	Dosagem dos fenóis totais	52
3.2.3	Cromatografia líquida de alta resolução	54
3.3	Ensaio enraizamento	62
4.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	67
5.	BIBLIOGRAFIA.....	73

RESUMO

Arbutus unedo L, conhecido comumente por medronheiro é um arbusto ou árvore de pequeno porte, da família Ericaceae, típica do clima mediterrânico. É uma planta bastante resistente a condições ambientais difíceis, que aparece muitas vezes associada a outras espécies como pinheiro bravo e sobreiro, formando uma comunidade arbustiva. O medronheiro é uma espécie conhecida desde tempos antigos pelas suas diversas utilidades, não só a nível farmacêutico, pelas propriedades das suas folhas e frutos, mas também a nível ecológico, ornamental, entre outros. Os seus frutos são muitas vezes utilizados na confeção de produtos tradicionais como doces, geleias e a notável aguardente de medronho.

Nos últimos anos esta espécie tem vindo a ganhar interesse científico principalmente em termos de micropropagação mas também a nível do estudo da sua composição fitoquímica.

O presente trabalho surge com o propósito de se explorarem novas áreas de interesse no medronheiro. Pretendeu-se portanto desenvolver um protocolo de indução de calo e otimizar as suas condições de cultura; avaliar a presença de arbutina e hidroquinona em plantas de medronheiro (folhas e frutos) e a capacidade de culturas *in vitro* produzirem arbutina durante o seu metabolismo normal, ou quando sujeitas a um tratamento com hidroquinona; testar um novo método de enraizamento – *dipping*, baseado na indução da formação de raízes por choque auxínico.

No ensaio de indução de calo verificou-se que, de várias combinações hormonais testadas, a combinação de 1 mg/L de 2,4-D e 1 mg/L de tidiazurão apresentou o maior crescimento dos calos. A adição de tidiazurão permitiu estimular o crescimento do calo, o que não foi verificado nos outros meios de cultura. Os calos obtidos foram posteriormente utilizados para a avaliação da sua cinética de crescimento em dois ensaios paralelos, realizados em meio de cultura agarizado e líquido. O ensaio desenvolvido em meio agarizado demonstrou a influência de diferentes tipos de recipientes no incremento em massa dos calos e revelou a essencialidade das trocas gasosas na promoção do crescimento das culturas. A experiência realizada em meio líquido permitiu inferir sobre a razão massa de calo inicial/ volume de meio de cultura mais favorável ao incremento das culturas. Neste estudo constatou-se que massas iniciais mais elevadas foram as responsáveis pelos maiores incrementos dos calos nos dois volumes testados. Os estudos

histológicos realizados em calos com diferentes características permitiram verificar a ocorrência de algumas diferenças histológicas, particularmente entre calos com diferentes taxas de crescimento.

Os ensaios fitoquímicos, realizados neste trabalho demonstraram que as folhas colhidas no campo apresentaram teores fenólicos cerca de 10 vezes superiores aos encontrados nos frutos. No entanto, o estado de desenvolvimento das folhas e de maturação dos frutos não demonstraram ter uma influência significativa no teor de fenóis totais.

A análise por cromatografia líquida de alta resolução hifenada a um detector de fotodíodos (HPLC-PDA) confirmou a presença de arbutina nas plantas de medronheiro crescidas no seu ambiente natural, e também em plantas cultivadas *in vitro*, com ou sem a adição de hidroquinona. Nos ensaios de biotransformação, a concentração de hidroquinona adicionada ao meio de cultura foi responsável pelas maiores diferenças na concentração de arbutina encontrada nas plantas, porém o tempo de exposição também interferiu significativamente.

O enraizamento foi testado *ex vitro* por choque auxínico com uma solução de IBA (9,8 mM) em plantas formadas em meio líquido e sólido. A formação de raízes foi observada 20 dias após o tratamento, mostrando a eficiência deste processo no enraizamento do medronheiro.

Palavras-chave: cultura *in vitro*; calo; compostos fenólicos; arbutina; biotransformação; choque auxínico

ABSTRACT

Arbutus unedo L., commonly known as strawberry tree is a shrub or a small tree from the Ericaceae family, common around the Mediterranean basin. This plant is quite resistant to harsh environmental conditions, and appears to be usually associated with other plant species such as maritime pine and cork oak. Strawberry tree is a well known species since ancient times due to its vast utilities, not only at from a pharmaceutical perspective, but also as an interesting ecological and ornamental plant, among others. Its fruits are generally used in the confection of traditional products such as jams and the distinguishable “Portuguese brandy” usually called as medronheira.

In the last years this species has gained the attention of the scientific community mainly because of its micropropagation abilities but also due to diversity of chemical compounds that have been identified.

The present work emerges from the purpose to explore new areas of interest concerning the strawberry tree. It was intended to develop a protocol of calli induction and optimize its culture conditions; assess the presence of arbutin and hydroquinone in the strawberry tree (leaves and fruits) as well as the ability of *in vitro* culture to produce arbutin during its normal metabolism, or when subjected to a hydroquinone treatment; testing an innovative method of rooting- *dipping* - based on the induction of root development by an auxinic pulse.

In the callus induction assays, the results showed that from the several hormones tested, the combination of 1 mg/L of 2,4-D and 1 mg/L de thidiazuron exhibited the better results .Moreover, thidiazuron allowed the stimulation of callus growth a situation that was not verified on other culture media. The calli obtain were further submitted to a growth kinetic assay in gellified or liquid media. Cultures on agar medium demonstrated that the type of containers affects callus growth probably by affecting the composition of the atmosphere surrounding the tissues. The assay carried out on liquid cultures allowed to establish an appropriate ratio of initial callus mass/ volume of the culture medium most favorable for growth. The results showed that higher initial callus masses were responsible for higher calli increments on both volumes tested. The histological studies performed on calli with distinct characteristics showed the existence of some histological differences, in particular among calli with different growth rates.

The phytochemical trials performed in this work indicated that leaves harvested in the field exhibited phenolic contents about 10 times higher than fruits. Nevertheless, both the state of leaf and fruit development did not show to have a significant influence in the total phenolic content.

The analyses by high performance liquid chromatography with photodiode array (HPLC-PDA) confirmed the presence of arbutin for strawberry tree grown on its natural environment, and also for plants cultivated *in vitro*, with or without the addition of hydroquinone. In the biotransformation assays, the concentration of hydroquinone added to the cultured medium was responsible for the major differences in the concentration of arbutin found in plants; however the exposure time also interfered significantly.

Rooting was tested *ex vitro* by auxinic pulse with a IBA (9,8 mM) on plants formed on liquid and solid medium. The formation of roots was observed 20 days after treatment, showing the efficiency of this process in the strawberry tree rooting.

Palavras-chave: *in vitro* culture; calli; phenolic contents; arbutin; biotransformation; auxinic pulse

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização do trabalho

Nos últimos anos o interesse pelo medronheiro tem aumentado de forma acentuada. Esta situação deve-se, por um lado, ao interesse pelo potencial da própria planta e, por outro, devido aos problemas que algumas espécies florestais apresentam. É o caso do pinheiro-bravo que, devido aos incêndios florestais e à doença do nemátode-do-pinheiro, tem visto a sua área de cultura diminuída consideravelmente.

Apesar deste interesse pelo medronheiro, existe alguma dificuldade em encontrar plantas selecionadas desta espécie, fazendo-se a propagação normalmente a partir de sementes. Nos últimos anos, o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, em colaboração com outras instituições científicas, produtores e outros *stakeholders*, tem desenvolvido uma investigação aprofundada desta espécie no que diz respeito à implementação de protocolos de micropropagação eficazes e ao desenvolvimento de plantas com novas características, através da realização de ensaios de hibridação e de tentativas de obtenção de poliplóides. Para além disso, iniciaram-se outras áreas de investigação sobre esta espécie, nomeadamente a caracterização das estruturas secretoras e o seu eventual papel eco-fisiológico.

Este trabalho é mais um contributo para a valorização desta espécie e resulta da colaboração entre o Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra, a Associação UC InProPlant e a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, instituições que colaboram há muito no estudo de diferentes espécies de plantas, com vista à sua valorização económica, ou com o objetivo de promover o conhecimento científico.

1.2 *Arbutus unedo* - Medronheiro

1.2.1 Taxonomia

Arbutus unedo L., conhecido comumente por medronheiro, é uma planta pertencente à família Ericaceae. Esta família que se inclui na ordem Ericales e classe

Magnoliopsida engloba cerca de 126 géneros e 4010 espécies, distribuídas por todo o mundo (Stevens, 2001).

O género *Arbutus*, juntamente com outros cinco géneros (*Arctostaphylos*, *Arctous*, *Comarostaphylis*, *Ornithostaphylos* e *Xylococcus*), constituem a sub-família Arbutioidea, um grupo distinto e natural da família Ericaceae, baseado na morfologia, anatomia e aspetos fitoquímicos das flores e frutos (Hileman *et al.*, 2001; Stevens, 1971). Este é constituído por cerca de 11 a 20 espécies distribuídas por todo o mundo, sendo o medronheiro a espécie com maior interesse do ponto de vista económico (Gomes *et al.*, 2010).

Na região da bacia mediterrânica podem ser encontradas quatro espécies do género *Arbutus*, *A. unedo*, *A. andrachne*, *A. x andrachnoides* e *A. pavarii pampani* (Hileman *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002). A espécie *A. x andrachnoides* é um híbrido resultante do cruzamento entre *A. unedo* e *A. andrachne*, que coexistem nalguns locais e apresentam muitas semelhanças (Torres *et al.*, 2002). Na região da Macaronésia, especificamente nas Ilhas Canárias, existe uma espécie endémica *A. canariensis* que quando cruzada por fecundação artificial com *A. unedo* dá origem a um híbrido *A. x andrasterilis* Salas, resultante assim de uma simpatria artificial (Pascual *et al.*, 1993; Prada & Arizpe, 2008). As restantes oito espécies do género encontram-se distribuídas na região mediterrânica do hemisfério ocidental (Hileman *et al.*, 2001).

1.2.2 Descrição botânica

O medronheiro é um arbusto ou árvore de pequeno porte que apresenta geralmente uma altura média de 3 metros, podendo ocasionalmente crescer até aos 12 metros (Prada & Arizpe, 2008; Tutin *et al.*, 1972).

O seu tronco apresenta uma casca castanha avermelhada ou acinzentada com fissuras, que se destacam em pequenas escamas (Castroviejo *et al.*, 1993; Pedro, 1994) (Fig. 1A). O medronheiro é constituído por vários ramos muito folhosos cujas folhas, persistentes e coriáceas se dispõem alternadamente nos ramos (Fig. 1B). As folhas são simples, de forma lanceolada, com margens serrilhadas e apresentam uma coloração

verde brilhante na página superior, sendo a página inferior de uma tonalidade verde-clara (González, 2007; Pereira Coutinho, 1913).

O medronheiro floresce no outono, exibindo flores hermafroditas dispostas em panículas terminais pendentes (até 40 flores). A corola é urceolada constituída por 5 pequenas simpétalas de cor branca ou por vezes levemente rosadas ou verdes (Castroviejo *et al.*, 1993; González, 2007) (Fig. 1C). As flores são consideradas uma importante fonte de néctar para as abelhas e são muito decorativas, sendo por isso usadas em arranjos florais (Celikel *et al.*, 2008; Soro & Paxton, 1999).

A. unedo é uma espécie frutífera, caracterizada pelo seu fruto comestível, o medronho (Fig. 1D). Este fruto é uma baya esférica com 2 cm de diâmetro, coberto por papilas cónicas que lhe conferem uma superfície rugosa (Castroviejo *et al.*, 1993; González, 2007; Tutin *et al.*, 1972). Ao longo do processo de maturação, os frutos passam por um gradiente de cores de verde a amarelo, laranja e vermelho intenso. Quando maduros, no outono, apresentam uma polpa com inúmeras sementes pequenas angulares e castanhas (Castroviejo *et al.*, 1993; Piotto & Di Noi, 2001). Apesar do que foi referido, em Portugal e noutros países mediterrânicos, o medronheiro é muitas vezes considerado uma espécie florestal, situação a que não será alheia a sua distribuição por vastas áreas em algumas zonas e a sua capacidade para colonizar solos marginais, muito pobres e normalmente utilizados para a cultura de espécies florestais.

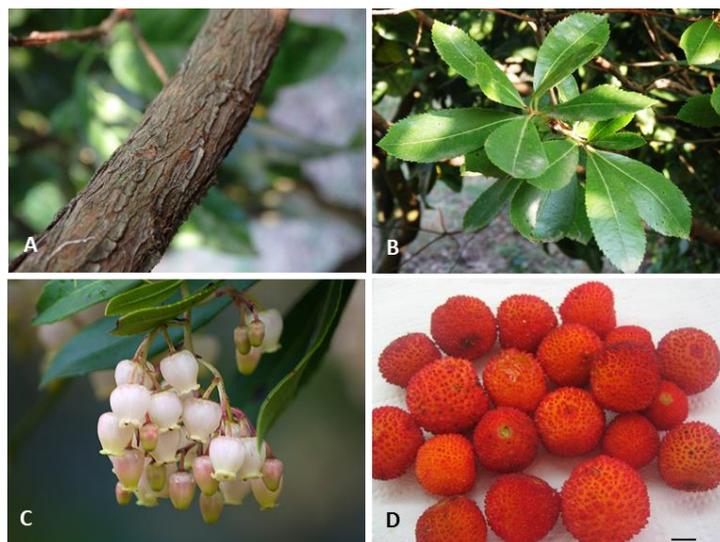


Figura 1 - *Arbutus unedo*. (A) tronco; (B) folhas; (C) flores – panículas pendentes (Fonte: <https://www.flickr.com/photos/21285306@N00/8229810328>); (D) frutos maduros. A linha corresponde a 1 cm.

O ciclo reprodutivo do medronheiro é longo, prolongando-se por quase dois anos. A floração inicia-se em Junho chegando à sua fase final no outono ou início do inverno. Após ocorrer a fecundação, a maturação dos frutos estende-se por um ano, finalizando apenas no outono do ano seguinte, altura em que se dá a colheita. Assim, no outono e início do inverno é possível encontrar simultaneamente na mesma árvore as primeiras flores e os frutos do ano anterior (Gomes & Canhoto, 2009; Özcan & Haciseferoğulları, 2007).

1.2.3 Distribuição geográfica

A. unedo é uma espécie nativa da região Mediterrânica ocidental, do sul da Europa e da Irlanda (Celikel *et al.*, 2008; Piotto & Arcadu, 2001). Encontra-se amplamente distribuído em áreas com clima mediterrânico, sendo uma das espécies de frutos carnudos mais comum dessa região (Molina *et al.*, 2011). Pode ser encontrado em vários locais, ao longo da bacia mediterrânica, como na Península Ibérica (Portugal e Espanha) e noutros países do sul da Europa como França, Itália, Croácia e algumas ilhas do Mediterrâneo (Ilhas Baleares, Córsega e Sardenha). Esta espécie também aparece no norte de África (Tunísia, Argélia, Marrocos), nas ilhas Canárias e na região mais ocidental da Ásia (Turquia), principalmente em zonas costeiras e interiores onde não se fazem sentir muito a geada e a seca (Prada & Arizpe, 2008; Torres *et al.*, 2002) (Fig. 2). Apresenta ainda uma distribuição mais a norte, na região atlântica (Molina *et al.*, 2011), que se estende do norte da Península Ibérica, costa oeste de França, até ao noroeste da Irlanda (Torres *et al.*, 2002).



Figura 2- Distribuição de *Arbutus unedo* na bacia mediterrânica e costa Atlântica. (Fonte: http://fieldart.blogspot.pt/2010_12_01_archive.html)

Em Portugal, o medronheiro é uma espécie espontânea que aparece de forma dispersa em todo o território, principalmente a sul do rio Tejo na região do Algarve (Pedro, 1994). As formações de medronhal ocupam uma área de cerca de 1500 hectares e correspondem a 0,5% da área florestal do País (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005).

A sua atual distribuição neotropical e holártica demonstra evidências da antiga união dos continentes americano e europeu que se separaram durante o Oligoceno e Mioceno, nas duas regiões mediterrânicas e “Madrean” (Aguiar & Pinto, 2007; Torres *et al.*, 2002). Além disso pode ser considerado uma relíquia da flora tropical ou subtropical existente no Terciário, tendo sido uma das poucas espécies que conseguiu sobreviver às mudanças climáticas e aos períodos de glaciações do Quaternário, persistindo em refúgios térmicos (Aguiar & Pinto, 2007; Gratani & Ghia, 2002).

1.2.4 Aspetos ecológicos

A. unedo é uma planta com grande interesse ecológico que aparece geralmente associada a outras espécies vegetais, principalmente da família Fagaceae, como o sobreiro (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005) e em bosques ou florestas de outros *Quercus* e *Pinus*. Forma raramente povoamentos dominantes, crescendo em comunidades arbustivas juntamente com outras espécies dos maquis mediterrânicos (Correia & Oliveira, 1999) com uma flora sub-arbustiva de tojos, urzes, estevas, carquejas, formando um sub-bosque muito fechado (Godinho-Ferreira *et al.*, 2005).

Do ponto de vista climático, tem preferência por climas temperados com invernos suaves, uma temperatura média anual superior a 12,5 °C e precipitação entre os 500 e 1400 mm (Ferreira *et al.*, 2001). Apesar de suportar temperaturas baixas, até aos -12 °C (Mereti *et al.*, 2002) é muito sensível às geadas que queimam os gomos novos, flores e folhas (Ferreira *et al.*, 2001). Sendo comumente encontrado em locais com altitudes que variam desde o nível do mar até aos 1200 m (Blanco *et al.*, 2005).

No que diz respeito às condições edáficas, o medronheiro cresce espontaneamente em solos siliciosos - rochosos e arenosos - bem drenados e frescos (Correia & Oliveira, 1999). Este apresenta alguma plasticidade quanto ao solo onde prospera e embora cresça em solos relativamente alcalinos, mostra uma preferência por solos ácidos (Celikel *et al.*,

2008; Ferreira *et al.*, 2001). No entanto, surge também em solos calcários como o atesta a sua ocorrência na Serra de Aire e Candeeiros.

O medronheiro é uma espécie que ajuda a estabilização de solos, contribuindo para a diminuição dos riscos de erosão e apresenta uma forte capacidade de resistência a condições ambientais difíceis. Tem a capacidade de se regenerar e recolonizar terrenos após a ocorrência de incêndios florestais e é de uma grande tolerância à seca (Piotto & Arcadu, 2001). Tais características devem-se à sua capacidade de crescimento em solos empobrecidos, regeneração por toixa e disseminação de sementes em épocas com baixo risco de incêndio (Konstantinidis *et al.*, 2006), o que faz dele uma espécie “alvo” nos programas de reflorestamento em países do sul da Europa onde os incêndios são comuns durante a estação seca (Gomes *et al.*, 2010).

1.2.5 Interesses na espécie

O medronheiro é uma planta com grande interesse, que tem despertado a atenção não só pelas suas aplicações alimentares, farmacêuticas como também ecológicas e ornamentais (Celikel *et al.*, 2008). Embora seja uma planta ainda pouco estudada e considerada uma espécie NUC (cultura negligenciada ou subutilizada), (www.underutilized-species.org) tem ganho importância e um maior interesse científico nos últimos anos (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011).

Em Portugal é muito procurado pelos seus frutos, utilizados na produção de produtos tradicionais como doces, geleias, compotas, mas também na confeção de bebidas alcoólicas (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Pawlowska *et al.*, 2006; Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2011). A aguardente de medronho – medronheira, é uma bebida muito aromática produzida principalmente no Algarve e centro de Portugal que pode ser considerada como o “produto de eleição” e principal aplicação do medronho (Gomes *et al.*, 2010). Esta bebida é produzida em pequena escala por agricultores e constitui um negócio agro-sustentável. Apesar dos seus altos custos de produção, o seu elevado preço de mercado torna-a rentável, valorizando por isso o medronheiro a nível social e económico (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Santo *et al.*, 2012)

Os frutos, quando comidos frescos, são uma grande fonte de açúcares (42 a 52 % do peso seco), minerais, ácidos orgânicos mas também compostos antioxidantes tais como vitaminas e compostos fenólicos (Oliveira *et al.*, 2011). Estes, tal como as folhas, têm sido usados na medicina tradicional por várias das suas propriedades terapêuticas como antissépticas, diuréticas, adstringentes e também antioxidantes (Celikel *et al.*, 2008).

Por sua vez, as folhas têm na sua composição vários compostos fenólicos entre os quais taninos, flavonóides e glicósidos fenólicos (Malheiro *et al.*, 2012), nomeadamente a arbutina. Segundo González (2007), a atividade antisséptica das vias urinárias atribuída ao medronheiro deve-se à presença da arbutina.

Trata-se de uma espécie melífera, cujo mel produzido a partir do néctar das flores é bastante conhecido e apreciado pelo seu sabor característico, amargo. O mel monofloral é um produto característico de várias regiões mediterrânicas, produzido em pequena escala no final de outono e pode atingir valores 4 a 8 vezes superiores aos méis multiflorais. Além do seu uso na alimentação, este mel é ainda utilizado para fins medicinais desde tempos antigos (Tuberoso *et al.*, 2010).

Além disso, o medronheiro é valorizado a nível ecológico pelo seu papel na manutenção da biodiversidade da fauna, servindo de alimento a diversos animais como aves e mamíferos e por ser uma fonte de pólen para os insetos que polinizam as suas flores (Piotto *et al.*, 2001; Soro & Paxton, 1999).

Encontra-se igualmente presente na cultura das populações sendo muitas vezes referenciado em livros, músicas, histórias populares e romances e aparece no símbolo da cidade de Madrid (Gomes, 2011).

Do ponto de vista ornamental é uma planta que pode ser usada em arranjos florais pela beleza das suas flores brancas rosadas e pelo facto destas e dos frutos aparecerem simultaneamente (Mereti *et al.*, 2002). A casca e as folhas têm sido utilizadas no curtimento de peles devido ao seu conteúdo em taninos, e a sua madeira é usada como combustível (González, 2007).

1.3 Biotecnologia e cultura *in vitro*

1.3.1 Princípios e aplicações

A cultura de plantas é uma das atividades mais antigas e com maior importância para o Homem (Lindsey & Jones, 1992). Com o crescente aumento populacional e a consequente redução das áreas de cultivo, o número de pessoas com fome no mundo atingiu os mil milhões de habitantes, em 2009 (www.fao.org). Apesar das medidas implementadas no Objetivo de Desenvolvimento do Milénio (ODM) e dos recentes dados demonstrarem uma tendência positiva da diminuição da fome no mundo, cerca de 805 milhões de pessoas continuam desnutridas (FAO *et al.*, 2015).

A fim de contrariar esta dura realidade e outros problemas relacionados com a produção agrícola, surgiu a necessidade de se apostar em tecnologias mais eficazes, que promovam uma maior produtividade e resistência das culturas. Isto é, adotar técnicas que promovam o melhoramento vegetal. O melhoramento de plantas teve a sua origem na antiguidade sendo iniciado por agricultores que, por cruzamentos seletivos procuravam obter novos cultivares e fixar as características mais vantajosas e desejáveis. Acabando, deste modo por, voluntariamente ou involuntariamente, alterar a genética das suas culturas (Acquaah, 2009; Canhoto, 2010; Chawla, 2009)

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas novas metodologias, ferramentas valiosas na investigação e no conhecimento científico na área da botânica cujas aplicações vieram dar um contributo decisivo no melhoramento vegetal (Chawla, 2009; Lindsey & Jones, 1992). Estas metodologias inserem-se na área da Biotecnologia, que pode ser definida como o conjunto de aplicações tecnológicas que utilizam ou modificam organismos vivos ou sistemas biológicos para a obtenção de novos produtos com utilidades práticas ou industriais (Canhoto, 2010; Chawla, 2009).

A cultura *in vitro* é uma das áreas da biotecnologia que teve um papel essencial no melhoramento vegetal. Esta consiste no estabelecimento e manutenção de células, tecidos, órgãos vegetais, plantas ou massa de células (calos) em condições de assepsia num meio nutritivo adequado (George *et al.*, 2008; Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006). O seu surgimento deu-se no início do século 20 impulsionado pelos trabalhos de G. Haberlandt e, posteriormente, pela descoberta das auxinas e dos outros grupos hormonais (Canhoto, 2010). Desde então, tem sido amplamente utilizada como

ferramenta biotecnológica, na clonagem de plantas, produção de metabolitos secundários, transformação genética, fusão de protoplastos e na obtenção de plantas haplóides (Canhoto, 2010; Lindsey & Jones, 1992).

1.3.2 Propagação do medronheiro

A propagação do medronheiro no seu meio ambiente pode ser feita, por reprodução sexuada através da dispersão das suas sementes. Embora seja um processo bastante vantajoso uma vez que promove diversidade genética também apresenta algumas limitações do ponto de vista da propagação de árvores selecionadas (Gomes, 2011). A viabilidade das sementes, o seu estado de dormência (Vasques *et al.*, 2014) e as restrições impostas pelas condições abióticas (ex: estratificação) e bióticas (atividade de animais, bactérias ou fungos) são alguns fatores limitativos da germinação e propagação por sementes (Smiris *et al.*, 2006).

Além da reprodução sexuada, o medronheiro exibe uma estratégia de regeneração vegetativa por rebentação da toiça que promove a regeneração vigorosa de novos rebentos caulinares adventícios o que acontece geralmente após a ocorrência de incêndios florestais ou do corte de plantas (Bond & Midgley, 2001; Konstantinidis *et al.*, 2006).

Os métodos convencionais como a enxertia e estacaria são igualmente utilizados na propagação do medronheiro, no entanto não têm demonstrado grande eficácia, devido às baixas taxas de enraizamento e à dificuldade na indução manual de regeneração por toiça (Prada & Arizpe, 2008).

Face a estas limitações, as técnicas de cultura *in vitro*, como a micropropagação, surgiram como uma alternativa aos métodos convencionais, sendo cada vez mais utilizadas. A micropropagação traduz-se na rápida produção e multiplicação de um grande número de plantas, geneticamente iguais à planta mãe – clonagem. Esta é caracterizada como “true to type propagation” de genótipos selecionados através de técnicas de cultura *in vitro* (George *et al.*, 2008).

A micropropagação é muitas vezes utilizada, em detrimento dos métodos convencionais, pelas inúmeras vantagens que apresenta, tais como: pouco material necessário para iniciar as culturas; pouco espaço requerido; condições controladas

(assepsia; luminosidade, temperatura); qualidade fitossanitária (plantas livres de doenças, fungos, bactérias); produção contínua (livre de sazonalidade); armazenamento do material vegetal por longos períodos (banco de germoplasma); propagação de espécies difíceis de propagar *in vivo* (Chawla, 2009; Lindsey & Jones, 1992).

Atualmente, os métodos de micropropagação mais utilizados são a proliferação de meristemas, a indução de organogênese e a formação de embriões somáticos (George *et al.*, 2008). A proliferação de meristemas axilares é o método de micropropagação, mais simples e utilizado a nível comercial e também o mais utilizado na família Ericaceae. Baseia-se no desenvolvimento de meristemas pré-existentes e, por isso, é uma replicação do desenvolvimento em condições naturais. Os rebentos são depois enraizados, originando plantas geneticamente iguais à planta mãe (Canhoto, 2010; Chawla, 2009). Esta técnica tem sido utilizada na propagação do medronheiro (Mereti *et al.*, 2002) (Gomes & Canhoto, 2009) mas também de outras ericáceas como *Arbutus andrachne* L. (Mostafa *et al.*, 2010); *Arbutus xalapensis* (Mackay, 1996); *Rhododendron ponticum* L. (Almeida *et al.*, 2005); *Vaccinium pahalae* e *Vaccinium myrtillus* (Shibli & Smith, 1996).

1.3.3 Cultura de calos

O calo é um tecido amorfo e uniforme formado por uma massa de células indiferenciadas, resultante da divisão ativa e desordenada das células vegetais que lhe deram origem e da sua desdiferenciação (George *et al.*, 2008). *In vitro* é geralmente induzido a partir de um explante cultivado num meio suplementado com reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) e *in vivo* pode ser induzido pelo stresse ou por agentes biológicos (Ikeuchi *et al.*, 2013).

Os calos podem apresentar uma morfologia bastante variável, não só a nível da sua consistência, que pode ser friável ou compacta conforme as suas células possuam um menor ou maior grau de agregação entre si, (Lindsey & Jones, 1992) mas também a nível da sua coloração que pode apresentar tons de verde, amarelo ou esbranquiçado. Tais características encontram-se relacionadas com o explante inicial utilizado, mas também dependem das condições de cultura (Canhoto, 2010).

Quando cultivados em meio sólido, os calos crescem formando massas de células agrupadas. No entanto, em meio líquido, as massas celulares tendem a desagregar-se

formando suspensões de células isoladas ou de pequenos agregados (Canhoto, 2010; Dixon, 1985). De um modo geral, as culturas de células em suspensão são iniciadas a partir de uma massa inicial de calo friável num meio de cultura líquido, em agitação (Dixon, 1985). Assim, este sistema de cultura oferece uma melhor distribuição das células no meio, bem como uma maior oxigenação e por isso permite um acesso rápido e uniforme a nutrientes e reguladores de crescimento (Lindsey & Jones, 1992; Mustafa *et al.*, 2011). É muitas vezes utilizado com vista à produção de compostos de interesse em grande escala e ao estudo dos processos celulares e moleculares das plantas, por ser um modelo de cultura simples de crescimento rápido e de fácil manuseamento (Mustafa *et al.*, 2011; Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2012).

O crescimento relativo dos calos e das culturas de células em suspensão pode ser quantificado por diferentes processos, sendo o mais comum a quantificação do aumento do peso fresco, peso seco ou do número de células, ao longo de um período de tempo conhecido (Mustafa *et al.*, 2011) A sua dinâmica de crescimento é caracterizada por uma curva sigmóide com três estados de desenvolvimento. Inicialmente ocorre uma fase de latência que se caracteriza por uma série de processos metabólicos (síntese de ATP, proteínas, ácidos nucleicos) que preparam as células para a mitose. Posteriormente, segue-se uma fase de divisão celular ativa. Esta fase inicia-se com o crescimento exponencial dos calos, onde a taxa de divisão celular atinge o seu máximo, seguindo-se de um crescimento linear, com uma diminuição da divisão e aumento da taxa de expansão celular. Por fim, quando um dos fatores se torna limitante a cultura apresenta uma fase estacionária onde ocorre uma diminuição progressiva da divisão celular e cessação do crescimento (Lindsey & Jones, 1992).

1.4 Metabolitos do medronheiro

1.4.1 Compostos fenólicos

As plantas apresentam na sua constituição uma grande variedade de compostos com as mais diversas funções. Estas substâncias, conhecidas por metabolitos resultam da atividade metabólica das plantas e podem ser classificados em primários e secundários (Taiz & Zeiger, 2015). Por oposição aos metabolitos primários, que apresentam uma distribuição universal nas plantas, alguns metabolitos secundários são frequentemente

associados a um conjunto restrito de espécies. Estes não desempenham nenhum papel direto no crescimento e desenvolvimento das plantas (fotossíntese, respiração, biossíntese) mas sim funções importantes e adaptativas, na interação com outros organismos e com o meio ambiente (Dixon, 2001; Harborne, 2001; Verpoorte & Memelink, 2002)

Durante muitos anos, os metabolitos secundários foram considerados como produtos laterais resultantes do metabolismo primário, sem qualquer função importante nas plantas. Contudo, com o avanço científico e a maior compreensão do metabolismo das plantas chegou-se à conclusão de que muitos deles são cruciais para o normal funcionamento dos organismos vegetais (Bourgaud *et al.*, 2001; Harborne, 2001).

Estes metabolitos secundários incluem-se essencialmente em três grupos quimicamente distintos, conhecidos como terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os compostos fenólicos são os metabolitos secundários mais abundantes e amplamente distribuídos nas plantas contudo o seu modo de ação e funcionalidade ecológica têm sido difíceis de definir (Lokvam & Kursar, 2005). A sua estrutura química compreende um anel aromático benzénico ao qual se encontra ligado um grupo hidroxilo (Harborne, 1998). Esta estrutura corresponde à forma mais simples dos compostos fenólicos e é designada por fenol simples. Quando constituídos por mais do que um grupo fenol, estes são designados por polifenóis (Bravo, 1998) e apresentam uma estrutura bastante diversa.

No interior das células vegetais, os compostos fenólicos encontram-se raramente na sua forma livre. Aparecem maioritariamente conjugados com açúcares ou ácidos orgânicos, frequentemente na forma de glicósidos (maioritariamente β -D-glucósidos) (Dixon & Paiva, 1995; Jones & Vogt, 2001). A conjugação confere-lhes proteção contra a degradação, redução da sua toxicidade, facilita o seu armazenamento e o seu transporte através das membranas, pelo aumento da sua solubilidade (Jones & Vogt, 2001).

São atribuídas a estes compostos diversas funções nas plantas, na defesa contra herbívoros ou patógenos, na atração de polinizadores e dispersores de sementes, na absorção da radiação ultravioleta ou em funções alelopáticas (Cheynier, 2012). Além disso possuem diversas propriedades como antialérgicas, antimicrobianas, cardioprotetoras, entre outras, sendo a ação antioxidante a principal propriedade que lhes é atribuída (Bravo, 1998).

1.4.2 Vias metabólicas dos compostos fenólicos

A biossíntese dos compostos fenólicos é bastante complexa e pode ser feita por várias vias metabólicas. A via do ácido chiquímico e a via do ácido malónico são duas vias metabólicas envolvidas na síntese dos compostos fenólicos. A via do ácido chiquímico é responsável pela síntese da maior parte dos compostos fenólicos existentes nas plantas enquanto a via do ácido malónico é responsável pela síntese nos fungos e bactérias, sendo de menor importância nas plantas superiores (Taiz & Zeiger, 2015).

A via do ácido chiquímico deve o seu nome ao primeiro composto intermediário identificado, o ácido chiquímico (Maeda & Dudareva, 2012). É uma via particularmente importante nas plantas uma vez que conduz à síntese de três aminoácidos aromáticos, a fenilalanina, o triptofano e a tirosina (Herrmann, 1995), precursores da síntese de numerosos metabolitos secundários, entre os quais compostos fenólicos, pigmentos e auxinas (Herrmann, 1995).

Esta via inicia-se pela conversão de dois carboidratos simples, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, precursores da glicólise e da via das pentoses fosfato, respetivamente, em ácido chiquímico (Maeda & Dudareva, 2012). Este processo é iniciado pela enzima DAHP sintase (3-desoxi-arabinoheptulonato-7-fosfato) que catalisa a condensação aldólica dos dois precursores em 2-dehidro-3-desoxiarabinoheptulonato-7-fosfato. Posteriormente, ocorre uma cadeia de reações de desfosforilação, desidratação, redução, de uma série de compostos que conduz à formação do ácido chiquímico (Gleason & Chollet, 2011; Vermerris & Nicholson, 2007). O ácido chiquímico é convertido em chiquimato 3-fosfato, pela chiquimato quinase e posteriormente em PEPS (5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato) pela sua condensação com o PEP (fosfoenolpiruvato). Por fim, a corismato sintase, catalisa a reação de conversão do PEPS em corismato (Maeda & Dudareva, 2012; Vermerris & Nicholson, 2007), que é o precursor dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptofano e tirosina (Herrmann, 1995) (Fig. 3).

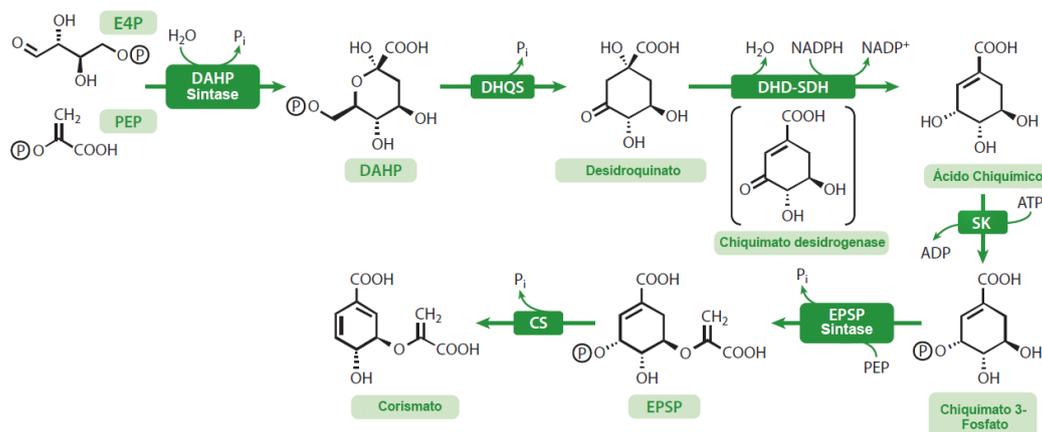


Figura 3- Via biossintética do ácido chiquímico, adaptado de Maeda & Dudareva (2012).

Na maior parte das espécies vegetais, a classe mais abundante de compostos fenólicos deriva da fenilalanina e depende da sua conversão em ácido cinâmico, pela remoção de uma molécula de amónia pela enzima fenilalanina-amónia-liase (PAL) (Taiz & Zeiger, 2015).

Após a ação da enzima PAL, as reações seguintes, consistem na adição de grupos hidroxilos e outros grupos químicos que levam à formação de compostos designados por fenilpropanóides, por serem constituídos por um anel de benzeno e uma cadeia lateral de 3 carbonos. Estes compostos incluem fenóis simples como fenilpropanóides simples (ácido cafeico, ácido *trans*-cinâmico), cumarinas, e derivados do ácido benzóico, mas também polifenóis como lenhinas, flavonóides e taninos (Taiz & Zeiger, 2015).

1.4.3 Importância dos metabolitos - biotransformação

Os metabolitos secundários são compostos de grande interesse utilizados pelo Homem desde os tempos primordiais, pela sua ampla atividade biológica (Bourgaud *et al.*, 2001). Muitos destes metabolitos têm sido utilizados a nível farmacêutico e médico mas também na área da cosmética, indústria alimentar e agronómica, para a produção de compostos de interesse como medicamentos, cosméticos, aromatizantes, especiarias, corantes, pesticidas, entre outros (Kirakosyan *et al.*, 2009; Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2012; Seigler, 1998).

Graças ao surgimento da biotecnologia foi possível a exploração de novos métodos de cultura como a cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos, que após manipulação das

condições de cultura têm permitido a obtenção de compostos de interesse (Kirakosyan *et al.*, 2009; Rao & Ravishankar, 2002). Muitos investigadores consideram que a cultura de células e tecidos vegetais pode ser utilizada como um caminho alternativo à produção de metabolitos secundários por síntese química ou por extração de compostos em plantas espontâneas ou cultivadas (Bourgau *et al.*, 2001; Canhoto, 2010). A utilização de tais técnicas, não só elimina as restrições climáticas, ambientais e sazonais como possibilita uma maior garantia de qualidade e rendimento; permite a produção de novos compostos não presentes naturalmente nas plantas, mas também reduz as colheitas de plantas permitindo a conservação da diversidade biológica (Canhoto, 2010; Rao & Ravishankar, 2002). Além disso, estas técnicas podem ser utilizadas como um sistema modelo para melhor compreender os processos de biossíntese de metabolitos nas plantas e assim aumentar a sua produtividade (Ara, 2006).

Para aumentar o rendimento da produção dos metabolitos podem ser utilizadas várias metodologias, como a biotransformação, a adição de precursores, a elicitação, e a seleção de linhas celulares mais produtivas.

A biotransformação pode ser definida como um processo através do qual células de organismos vivos conseguem transformar, por reações enzimáticas, um composto, noutra de maior valor (Rao & Ravishankar, 2002; Stafford & Warren, 1991). Usa-se normalmente para a produção de novos compostos, não sintetizados naturalmente pelas células mas que podem ser obtidos por processos de transformação, o que é particularmente importante aquando da produção de determinados compostos que são de obtenção difícil ou impossível quer por síntese química ou por microrganismos (Alfermann & Petersen, 1995).

1.4.4 Arbutina

A arbutina (4-hidroxifenol β -D-glucopiranosídeo) é um derivado natural da hidroquinona (benzeno-1,4-diol) que pertence ao grupo dos fenóis simples (Rychlinska & Nowak, 2012). A estrutura da arbutina corresponde à forma mono-glucosilada da hidroquinona e é produzida através de uma reação de glucosilação (Fig. 4). Esta reação é catalisada por uma enzima específica, a glucosiltransferase que promove a glucosilação

da hidroquinona e pela intervenção da uridina difosfato glucose (UPDG - molécula de alta energia, dadora da molécula de glucose) (Skrzypczak-Pietraszek *et al.*, 2005).

A arbutina ocorre naturalmente em certas plantas e é encontrada em grande quantidade nalgumas famílias como Ericaceae, Lamiaceae, Saxifragaceae e Rosaceae (Rychlinska & Nowak, 2012). Na família Ericaceae, a arbutina é produzida por diversas espécies entre as quais *A. unedo* (Pavlović *et al.*, 2009), *Vaccinium corymbosum* -mirtilo (Kittipongpatana *et al.*, 2007), *Arctostaphylos uva-ursi* -uva-ursina (Parejo *et al.*, 2001), e corresponde a um dos seus principais glucósidos fenólicos (Mostafa *et al.*, 2010).

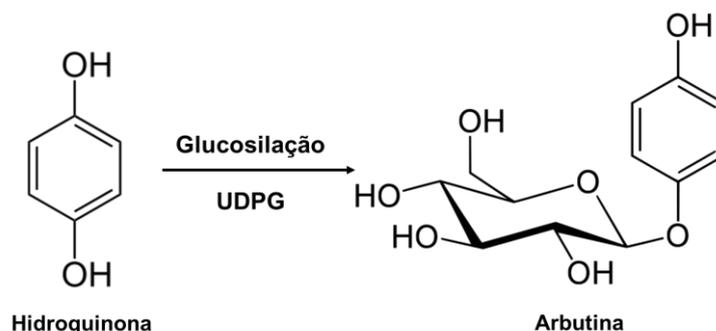


Figura 4- Processo de biotransformação da hidroquinona em arbutina.

Com o passar dos anos, a arbutina tem vindo a ganhar importância e a ser cada vez mais procurada pela indústria médica e farmacêutica (Seo *et al.*, 2012). A sua ampla utilização em formulações cosméticas deve-se principalmente às suas propriedades como agente branqueador da pele, devido à sua capacidade inibitória da síntese de melanina. A arbutina inibe a produção de melanina, inibindo a atividade da tirosinase, uma enzima essencial na formação de pigmentos (Liu *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2012). Assim, esta propriedade faz da arbutina um constituinte de interesse no “combate” a distúrbios de pigmentação como sardas, melasmas, manchas de idade, que se devem à hiperpigmentação resultante da exposição solar (Hu *et al.*, 2009; Thongchai *et al.*, 2007).

Além do seu efeito de clareamento, a arbutina apresenta propriedades antioxidantes, anti-envelhecimento, analgésicas e atua como filtro das radiações UVB/UVC, pelo que é largamente usada na cosmética (Alam *et al.*, 2011). É também utilizada na medicina moderna e tradicional como agente anti-inflamatório e antibacteriano, no tratamento de infecções urinárias, pedras nos rins e como diurético (Nycz *et al.*, 2010; Thongchai *et al.*, 2007)

A arbutina também é mais segura e apresenta características mais vantajosas comparativamente à hidroquinona, que se relacionam com a sua maior estabilidade e não toxicidade, com ausência de odor desagradável e de efeitos colaterais secundários, além de ser menos irritante para a pele (Kittipongpatana *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos prévios, realizados no medronheiro, demonstram a presença de arbutina nas folhas (Malheiro *et al.*, 2012; Pavlović *et al.*, 2011; Pavlović *et al.*, 2009) e frutos (Pawłowska *et al.*, 2006) de plantas colhidas em campo. Estes estudos permitiram a identificação e quantificação do teor de arbutina, a sua comparação entre espécies provenientes de locais diferentes, e permitiram verificar o seu efeito antioxidante.

Assim, tendo em conta as diversas propriedades atribuídas à arbutina com aplicações em diferentes áreas económicas, e com base nos estudos anteriormente realizados, revela-se importante desenvolver e otimizar protocolos que permitam aumentar a sua produção.

1.5 Objetivos

O medronheiro é uma espécie que apesar de ainda ser pouco estudada e considerada uma espécie subvalorizada, tem vindo a ganhar importância nos últimos anos e um maior interesse científico.

O presente trabalho surge com o intuito de se explorarem novas áreas de interesse no medronheiro e pretende ser um contributo para a aquisição de novos conhecimentos relacionados principalmente com a cultura de calo, o estudo de compostos de interesse do medronheiro e de um novo método de enraizamento.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos principais:

- Desenvolvimento de um protocolo de indução de calo, bem como o posterior estudo do perfil de crescimento dos calos e a otimização das suas condições de cultura em meio agarizado e líquido. Para se concretizarem estes objetivos propõe-se a realização de vários ensaios nos quais se testam diferentes condições de indução de calo, recipientes e razões massa de calo/ volume de meio de cultura. Posteriormente, proceder-se-á

igualmente à sua análise histológica por microscopia ótica de forma a detetar possíveis diferenças histológicas relacionadas com as diferentes características dos calos.

- Avaliação da capacidade de culturas *in vitro* de medronheiro produzirem arbutina durante o seu metabolismo normal, ou por um processo de bioconversão, quando sujeitas a um tratamento com hidroquinona. Além disso, pretende-se igualmente averiguar a produção de arbutina em plantas de medronheiro no seu ambiente natural, usando para isso a cromatografia líquida de alta resolução hifenada a um detetor de fotodíodos, a fim de identificar e quantificar a arbutina e/ou a hidroquinona presentes nas amostras.

- Aplicação de um novo método de enraizamento – *dipping*, baseado na indução da formação de raízes por choque auxínico. Neste ensaio pretende-se testar o efeito de diferentes tempos de exposição ao choque auxínico e do método de propagação empregue na obtenção das plantas em estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para a realização deste trabalho foi utilizado material vegetal proveniente de plantas de medronheiros, bem como de dois clones previamente estabelecidos *in vitro*: C1 e P. Estes clones possuem origens diferentes, sendo o C1 proveniente de linhas clonais obtidas a partir de material adulto e o P obtido a partir da germinação de sementes de uma planta proveniente de Penamacor.

Nos ensaios de indução de calo foram utilizadas folhas do clone P, previamente estabelecido *in vitro* como explante de partida. Estes calos foram depois usados no estabelecimento de culturas para os ensaios de avaliação de crescimento de calo e estudos histológicos.

Para o estudo dos compostos fenólicos usaram-se folhas e frutos colhidos em Coimbra - no Polo II da Universidade de Coimbra, em Outubro de 2014. As folhas e os frutos foram colhidos com diferentes fases de desenvolvimento e maturação (folhas jovens e maduras; frutos de cor verde, amarela, laranja, vermelha e vermelha intenso), com o intuito de se compreender a influência destes dois parâmetros na composição fenólica, nomeadamente, da arbutina. Além do material colhido em campo, também foram utilizadas plantas do clone C1, estabelecidas em meio líquido para a realização dos ensaios de biotransformação de hidroquinona em arbutina e posterior análise química.

Para a realização dos ensaios de enraizamento, foram utilizadas plantas de medronheiro do clone C1, cultivadas em meio de cultura agarizado e líquido.

2.2 Metodologia

2.2.1 Propagação *in vitro* do medronheiro

Neste trabalho, a micropropagação do medronheiro constituiu uma etapa fundamental pois permitiu assegurar material necessário à realização de todos os outros ensaios.

A multiplicação dos diferentes clones de medronheiro foi feita a partir de fitómeros dos clones C1 e P cultivados em meio de Fossard modificado suplementado por um regulador de crescimento, a citocinina BAP (benzilaminopurina).

O meio de Fossard modificado consiste na combinação do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) e do meio de Fossard (De Fossard *et al.*, 1974), e é constituído pelos macronutrientes e vitaminas de Fossard e pelos micronutrientes e FeEDTA do meio MS. A esse meio foi então adicionado a citocinina BAP (8,9 μ M). Como fonte de carbono utilizou-se sacarose numa concentração de 3 % (w/v). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 – 5,8 recorrendo a soluções de HCl e NaOH (0,01 – 1,0 M). Por fim, foi adicionado agar (6 g/L), o meio foi aquecido e distribuído por frascos de cultura (25 mL cada) que foram posteriormente autoclavados a 120°C durante 20 minutos. Após a preparação e autoclavagem dos meios, os explantes foram inoculados (5 por frasco) numa câmara de fluxo laminar de forma a evitar a contaminação por agentes fúngicos ou bacterianos. Todo o material utilizado ao longo dos procedimentos, tais como pinças, bisturis, ansas de inoculação, foram frequentemente flamejados após imersão em etanol a 95 % (v/v). As caixas de Petri utilizadas durante os diversos procedimentos, também foram previamente esterilizadas. Posteriormente, todas as culturas foram mantidas numa câmara climatizada, a uma temperatura de 25 °C e com um fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro.

2.2.2 Ensaio de estabelecimento de calo e suspensões celulares

2.2.2.1 Indução de calo

Com o objetivo de induzir a formação de calo e promover o seu crescimento, foi realizado um ensaio onde se testou o efeito, da adição de diferentes combinações hormonais ao meio de cultura, na indução e formação de calo a partir de folhas do clone P.

Neste ensaio foram utilizadas folhas jovens e maduras, como explante inicial, às quais foram feitas pequenas “incisões transversais” na página inferior. Estas foram posteriormente inoculadas, uma por cada tubo de ensaio, no meio de cultura de Fossard

modificado descrito em 2.2.1, suplementado com diferentes reguladores de crescimento (PGRs, Tabela 1).

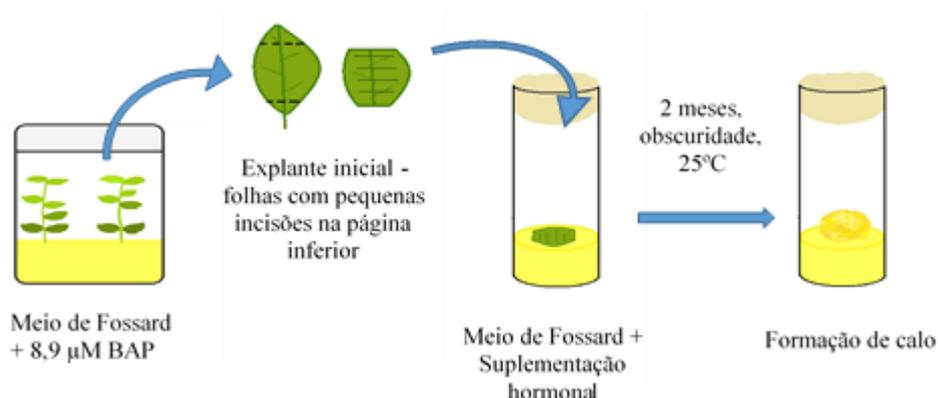


Figura 5- Esquema representativo da indução de calo a partir de folhas do clone P.

Tabela 1. Meios de cultura utilizados no ensaio de indução de calo.

Designação do meio de cultura	PGRs
M1	1mg/L ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)
M2	1mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L cinetina (KIN)
M3	1mg/L 2,4-D + 1 mg/L tidiazurão (TDZ)
M4	2mg/L 2,4-D
M5	2mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L cinetina (KIN)

Após a inoculação dos explantes, a culturas foram mantidas na obscuridade, numa estufa à temperatura de 25 °C (Fig. 5). As taxas de indução de calo e a percentagem de sobrevivência foram registadas 4 e 8 semanas após o início da cultura, respetivamente. Para cada tratamento foi usado um número total de 30 explantes (3 réplicas de 10 explantes). Os resultados foram posteriormente analisados estatisticamente (ver secção 2.2.5).

2.2.2.2 Avaliação do perfil de crescimento e otimização das condições de cultura

Para analisar o perfil de crescimento dos calos e otimizar as suas condições de cultura foram realizados paralelamente, dois ensaios, um em meio sólido e outro em meio líquido. Nestes foram analisados os efeitos de vários parâmetros no aumento de biomassa do calo em função do tempo.

No ensaio realizado em meio sólido, o parâmetro a analisar foi o tipo de recipiente utilizado. Nesta experiência foram testado três recipientes diferentes: tubos de vidro, caixas de Petri e caixas com tampas com filtro (Combiness microbox – 565 mL; filtro XXL). Para cada experiência foi utilizado como explante inicial uma massa de calo com aproximadamente 200 mg, que foi inoculado num meio de Fossard modificado suplementado com 1mg/L 2,4-D + 1 mg/L tidiazurão (TDZ). Nas caixas de Petri e de filtro foram inoculados 5 calos por caixa, num total de 6 caixas (30 explantes - 3 réplicas de 10 explantes correspondentes a 2 caixas) e nos tubos de ensaio, foi colocada apenas um calo, num total de 30 tubos (3 réplicas de 10).

No segundo ensaio, realizado em meio líquido, os calos foram colocados a crescer num meio semelhante ao meio sólido, à exceção do agar. Nestas culturas pretendeu-se avaliar o efeito de dois parâmetros: a massa inicial de calo e o volume de meio de cultura, no crescimento e incremento em massa das suspensões celulares ao longo do tempo.

Foram então testadas três massas iniciais de calo: 100 mg (m100), 200 mg (m200) e 300 mg (m300) e para cada massa de calo testaram-se também dois volumes de meio de cultura: 5 ml (V5) e 10 ml (V10). Os calos foram inoculados em balões de Erlenmeyer de 50 ml sendo depois mantidos numa câmara de cultura no escuro a uma temperatura de 25 °C e sob agitação orbital de 140 rpm. Cada tratamento foi constituído por 5 réplicas biológicas, correspondentes a 5 balões de Erlenmeyer.

O incremento em massa dos calos foi determinado nos dois ensaios, com intervalos de 7 dias, desde o início do estabelecimento de culturas t0 e durante um período de 5 semanas. Para isso, os calos foram pesados frescos e inoculados de novo no meio de cultura. As suspensões celulares passaram pelo mesmo procedimento, mas foram previamente filtradas por filtro de papel (porosidade 4-7 µm), pesadas e novamente inoculadas num novo meio de cultura. Todos estes procedimentos foram realizados numa

câmara de fluxo para evitar qualquer tipo de contaminação e permitir a “continuação” do crescimento das culturas.

O incremento foi calculado pela diferença das massas final (mf) e massa do inóculo inicial (mi) nos cinco tempos de cultura, sendo que a massa final foi a última medida para cada tratamento. Passadas as 5 semanas de cultura, foi portanto possível obter-se a curva representativa do crescimento dos calos ao longo do tempo. Estes resultados foram posteriormente analisados estatisticamente (ver 2.2.5).

2.2.2.3 Estudos histológicos

Com o objetivo de avaliar possíveis diferenças nos calos resultantes dos ensaios descritos em 2.2.2.2, foram realizados estudos histológicos em calos com diferentes características: 1) friáveis, 2) compactos com boa taxa de crescimento e 3) calos com reduzida taxa de crescimento.

Este material foi fixado numa solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, ao qual se adicionou uma gota de cloreto de cálcio 0,01 M. A fixação foi feita à temperatura ambiente durante um período de 3 horas após o qual o material foi lavado três vezes em tampão cacodilato, durante 10 minutos. As amostras foram posteriormente pós-fixadas durante 1,5 h em tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão cacodilato. Em seguida, foram realizadas três lavagens: uma lavagem *overnight* numa solução tampão, outra numa solução tampão e água (1:1) durante 15 minutos e por fim, em água destilada, também durante 15 minutos. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas num gradiente ascendente de soluções de etanol (70, 80, 90, 95 e duas passagens em álcool a 100 %), durante 15 minutos. O material foi posteriormente impregnado num gradiente de três soluções de resina e álcool na proporção de 1:2; 1:1 e 2:1, durante 2 horas cada. Por fim, foi impregnado em resina pura *overnight* e depois colocado em moldes, blocos com resina onde permaneceu dois dias, numa estufa a 60°C.

O material presente nos blocos foi cortado com 1 µm de espessura com o auxílio de um ultramicrotomo LKB Ultratome III utilizando facas de vidro. Os cortes foram transferidos para uma lâmina de vidro e deixados a secar numa estufa a 60 °C, durante aproximadamente 24 horas. Procedeu-se posteriormente à coloração dos cortes com azul

de toluidina através da sua imersão no corante durante 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente tendo sido posteriormente lavados com água destilada e deixados a secar numa estufa a 60 °C.

O material foi observado num microscópio ótico Leica DM 4000 B e as fotografias captadas com uma máquina fotográfica Nikon Digital Sight DS-U1 e o software LAS V4.0.

2.2.3 Análise dos compostos fenólicos

2.2.3.1 Biotransformação

Este ensaio de biotransformação pretendeu avaliar a capacidade de conversão da hidroquinona em arbutina por parte das culturas *in vitro*, bem como analisar de que modo é que a adição de hidroquinona ao meio de cultura influencia a produção de arbutina por parte das plantas.

Neste ensaio foram testadas duas variáveis: a concentração de hidroquinona no meio de cultura e o seu tempo de exposição. Para tal as culturas em meio líquido foram expostas a duas concentrações de hidroquinona (50 mg/L e 200 mg/L) e três tempos de exposição (24 h, 48 h e 168 h). Para cada concentração testada foram preparadas 9 amostras (3 réplicas para cada tempo analisado). Também foram preparadas 3 amostras às quais não foi adicionado qualquer substrato, servindo assim de controlo.

Para a realização deste ensaio foi inicialmente necessário estabelecer as culturas em meio líquido. Nesta etapa, 5 rebentos caulinares desprovidos de folhas e provenientes de plantas do clone C1, foram multiplicadas em meio de cultura líquido num balão de Erlenmeyer de 100 mL contendo 50 mL de meio De Fossard modificado suplementado com 8,9 µM BAP. As culturas cresceram sob agitação rotativa a 125 rpm, numa câmara de cultura, a uma temperatura de 25 °C, intensidade luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro.

Dois meses após o início das culturas realizaram-se os ensaios de biotransformação (Fig. 6). O meio de cultura inicial foi removido e 1 ml de uma solução de hidroquinona dissolvida em água (2 g/L e 8 g/L), foi adicionada aseticamente aos frascos de cultura

através de uma seringa com filtro Millipore (0,22 μm). Adicionalmente 39 mL de meio fresco foi acrescentado a cada frasco de cultura para se obter a concentração final de hidroquinona pretendida. O material vegetal e o meio líquido foram separados e guardados 24 h, 48 h e 168 h após a adição do precursor. A biomassa foi macerada e congelada com azoto líquido e posteriormente guardada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O meio de cultura líquido também foi recuperado e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

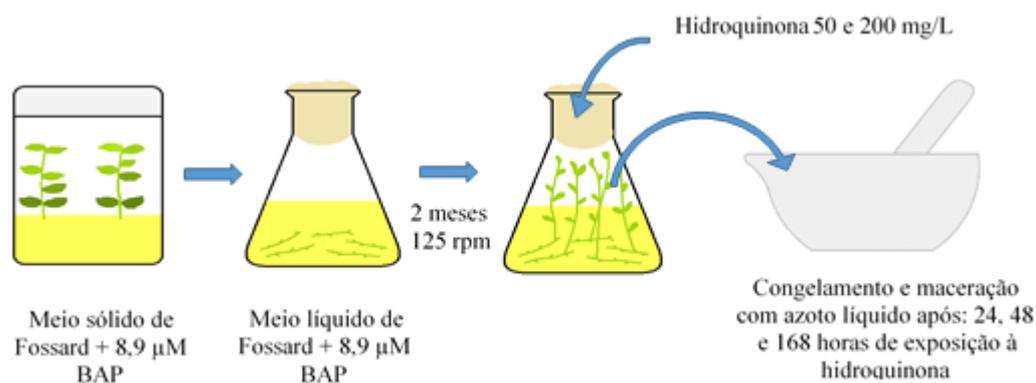


Figura 6- Esquema representativo do ensaio de biotransformação de hidroquinona em arbutina realizado nos meios líquidos de propagação de medronheiro por proliferação de rebentos axilares.

2.2.3.2 Extração de compostos fenólicos no material *in vivo* e *in vitro*

Para o estudo dos compostos fenólicos foi necessário proceder-se à preparação dos extratos a partir do material vegetal. Para tal, os frutos e as folhas colhidos no campo em diferentes fases de maturação (frutos de cor verde, amarela, laranja, vermelha e vermelha intenso, folhas jovens e maduras), bem como o material obtido *in vitro* (2.2.3.1), foram congelados com azoto líquido e armazenados num *biofreezer* à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização.

A extração foi realizada com metanol puro 99,8 % (Merck,), na proporção de 10 mL de solvente para cada 1 g de amostra. O processo extrativo decorreu num homogeneizador durante 5 minutos, seguindo-se uma centrifugação durante 15 minutos a 2500 rpm e à temperatura ambiente. Após a centrifugação das amostras, separou-se o sobrenadante do pellet e realizou-se uma segunda extração de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Por fim, os sobrenadantes das duas extrações, de cada amostra foram recolhidos, juntos e armazenados a uma temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem analisados (Fig. 7).

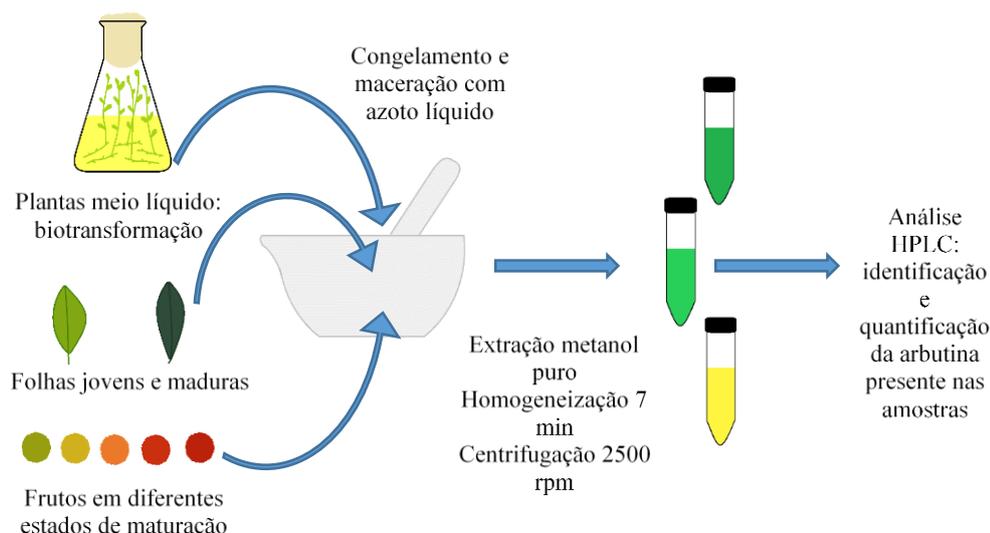


Figura 7- Esquema representativo do processo de congelamento do material vegetal e extração dos seus compostos fenólicos para posterior análise por HPLC.

2.2.3.3 Determinação do rendimento extrativo

Para a determinação do rendimento extrativo, usaram-se para cada amostra, 3 alíquotas de 500 μ L que foram mantidas numa estufa de vácuo a uma temperatura de 40°C e pressão de 123 mbar até à eliminação total do solvente extrativo, ou seja, até peso constante.

2.2.3.4 Dosagem de fenóis totais

A dosagem dos fenóis totais presentes nos extratos das amostras foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu (Julkunen-Tiitto, 1985; Wang *et al.*, 1997).

Num balão aferido de 10 mL colocou-se um volume conhecido de extrato que foi levado a resíduo seco com azoto e posteriormente solubilizado em 100 μ L de acetona. Adicionou-se 1,9 mL de água de Milli-Q (Millipore Corporation) e de seguida 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e agitou-se vigorosamente no vórtex durante 1 minuto. Após este processo, adicionou-se de imediato 5 mL de carbonato de sódio a 20 % e perfez-se a capacidade do balão com água de Milli-Q. Agitou-se de novo no vórtex durante 1 minuto e colocou-se a solução ao abrigo da luz durante 20 minutos após os quais se leu a

absorvância a 700 e 735 nm num espectrofotómetro de duplo feixe - CINTRO 101, GBC® (Victoria, Australia).

A dosagem dos fenóis totais foi realizada em triplicado (3n) e a quantidade de fenóis foi expressa em equivalentes de ácido gálgico, g/100g de extrato.

2.2.3.5 Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

Os compostos fenólicos presentes nos extratos das amostras foram separados por cromatografia líquida de alta resolução hifenada a um detetor de fotodíodos (HPLC-PDA), com o objetivo de identificar e quantificar a arbutina e/ou a hidroquinona.

Para tal recorreu-se a um cromatógrafo Gilson equipado com duas bombas (modelo 305 e 306), um misturador (modelo 811 B) e um módulo manométrico (modelo 805), acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) (modelo 170) e a uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint ® 2.10, Gilson).

Antes de se efetuar a análise cromatográfica procedeu-se à preparação das amostras. Os extratos foram inicialmente concentrados num evaporador rotativo (Bucchi®, acoplado a bomba de vácuo Huber Minichiller®) a uma temperatura aproximadamente de 35 °C, sob vácuo. Após a sua concentração, foram solubilizados em metanol a 10%, microfiltrados com o auxílio de uma seringa com filtro milipore de 0,22 µm de porosidade e posteriormente desgaseificados num aparelho de ultra-sons, Por fim foram injetados no cromatógrafo líquido de alta resolução.

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa, Spherisorb S5 ODS-2 Waters ® (250 mm x 4,6 mm d.i., partícula de 5 µm), a 24°C, protegida por uma pré-coluna C18 HICHROM (4,30 mm x 4 mm d.i, partícula de 5 µm). Foram utilizados dois eluentes na fase móvel; uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% (HCOOH, Merck), na bomba A, e metanol puro (MeOH, Licrosolv, Merck), na bomba B. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, durante 65 minutos. O gradiente usado resultou de um processo de otimização que permitiu separar os dois constituintes fenólicos em estudo (arbutina e hidroquinona). Para isso recorreu-se a dois períodos de eluição isocrática (dos 0 aos 7 min e dos 60 aos 65 min) e a um gradiente descontínuo dos 7 aos 60 min, segundo as condições que a seguir se transcrevem:

Gradiente:

0 % de B dos 0 aos 7 minutos

5 % de B aos 10 minutos

25 % de B aos 20 minutos

30 % de B aos 40 minutos

50 % de B aos 50 minutos

80 % de B aos 60 minutos

80 % de B aos 65 minutos

Os espectros de ultra violeta-visível foram adquiridos entre 200 e 600 nm e os perfis cromatográficos registados a 280 e 320 nm.

A deteção e/ou identificação da hidroquinona e da arbutina foi feita com base nos tempos de retenção e espectros de absorção (perfil espectral e máximos de absorção) dos constituintes das amostras, comparativamente com os dos respetivos padrões.

Para a quantificação da arbutina presente nas amostras recorreu-se ao método do padrão externo, através da equação da reta obtida com o padrão de arbutina.

2.2.4 Enraizamento de plantas - *dipping*

O método de enraizamento, *dipping*, é baseado na indução da formação de raízes por choque auxínico. Este método é bastante simples e rápido e foi testado neste trabalho com o intuito de se tentar diminuir algumas limitações existentes no processo usado tradicionalmente, nomeadamente os elevados custos de produção dos meios de cultura e o tempo demorado.

Na primeira fase deste ensaio as plantas do clone C1 foram retiradas do seu meio de cultura sólido e líquido e foram removidas as raízes das plantas que já as possuíam.

Estas plantas foram posteriormente sujeitas a um choque auxínico, quando colocadas numa solução de IBA (ácido-3-indol-butírico) a 9,8 mM durante um período de 10 (plantas cultivadas em meio líquido ou agarizado) ou 30 segundos (plantas cultivadas em meio líquido). Após esta etapa as plantas foram transferidas para um recipiente contendo um substrato constituído por areia e perlite (2:1 v/v), onde

permaneceram durante 20 dias, cobertas por um plástico, numa câmara de cultura (Fitoclima 1000 EHHF) a 20 °C, 70% de humidade e fotoperíodo de 12 horas. No final deste período determinou-se a percentagem de enraizamento e o comprimento máximo das raízes formadas em cada planta. Estas foram posteriormente transferidas para recipientes individuais contendo terra, areia e turfa (2:2:1 v/v).

2.2.5 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi feito no programa GraphPad Prism 6, pela análise de variância (ANOVA) e as médias significativamente diferentes foram analisadas pelo teste de Tuckey ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de estabelecimento de calo e suspensões celulares

3.1.1 Indução de calo

As auxinas e citocininas são dois reguladores de crescimento, fundamentais na cultura *in vitro* uma vez que desempenham papéis importantes no desenvolvimento e crescimento das plantas, e o balanço das suas concentrações é essencial na determinação da morfologia das culturas (Skoog & Miller, 1957). O estudo e a manipulação das concentrações de auxinas e citocininas, presentes no meio de cultura, são portanto dois parâmetros fundamentais quando se pretende iniciar uma cultura de calo.

Este ensaio foi realizado com o propósito de compreender o efeito de diferentes combinações hormonais na indução e crescimento de calo a partir de explantes foliares de medronheiro do clone P. Os explantes inoculados foram observados periodicamente com o intuito de se registarem os diferentes estados do seu desenvolvimento e detetar possíveis diferenças morfológicas, entre tratamentos. A figura 8 mostra a evolução da formação do calo desde a fase inicial de cultura até à desdiferenciação dos tecidos.

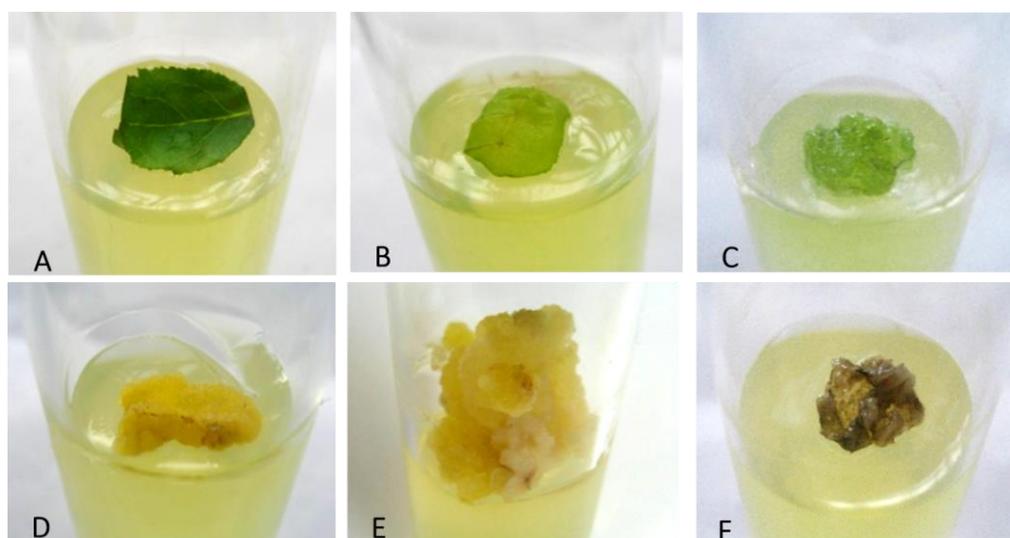


Figura 8 - Aspeto de vários estádios de desenvolvimento dos explantes foliares de medronheiro (clone P) cultivados *in vitro*, ao longo do processo de indução de calo. (A) Inoculação do explante foliar no meio de cultura. (B) Expansão do explante foliar, 14 dias após a sua inoculação no meio M1. (C) Início da formação do calo no meio M5, 20 após o início da cultura. (D) Calo formado no meio M3 com 8 semanas e 16 semanas (E); (F) Oxidação e necrose do explante em meio M4.

Tabela 2 - Resumo do tipo de resposta obtida nos diferentes meios utilizados para a indução de calo. Os resultados foram registados ao longo das 4 primeiras semanas de cultura.

Explante	Suplementação hormonal (mg/L)	Tipo de resposta verificada
Folhas com cortes transversais na página inferior	M1: (1) 2,4-D	- Boa desdiferenciação inicial;
	M2: (1) 2,4-D + (0,5) KIN	- Formação de calo com crescimento lento - Rápida oxidação e degeneração precoce dos calos
	M3: (1) 2,4-D + (1) TDZ	- Fácil desdiferenciação; - Rápido desenvolvimento e crescimento de calos (amarelos/ esbranquiçados constituídos por zonas friáveis e compactas) - Nenhuma oxidação
	M4: (2) 2,4-D	- Formação de massas de calo com zonas esbranquiçadas
	M5: (2) 2,4-D + (0,5) KIN	- Bom desenvolvimento e crescimento dos calos - Oxidação e degeneração dos calos

Neste ensaio não se verificaram diferenças morfológicas muito pronunciadas entre os diferentes tratamentos, exceto para o meio M3 que demonstrou desde o início da cultura uma rápida indução e desenvolvimento dos calos, sem existência de oxidação. Os restantes meios de cultura desencadearam uma desdiferenciação inicial dos explantes muito boa, no entanto, após a formação dos calos, estes não prosseguiram o seu crescimento, acabando por degenerar pouco tempo depois devido à oxidação e necrose dos tecidos. Os meios M1 e M2, foram os que apresentaram visualmente, uma maior e mais rápida oxidação dos calos, enquanto os meios M4 e M5 induziram um maior crescimento e desenvolvimento dos calos. Não foram verificadas quaisquer outras diferenças nos calos formados nos diferentes tratamentos, talvez pelo facto das concentrações utilizadas não terem sido suficientemente distintas para desencadear e promover diferentes respostas e desenvolvimento dos calos.

Como se pode observar na figura 8F, alguns dos explantes inoculados não prolongaram o seu desenvolvimento devido à oxidação e morte dos tecidos. Antes de serem inoculados os explantes foliares foram feridos na página inferior, com o objetivo de induzir stresse e aumentar a exposição dos tecidos aos reguladores de crescimento.

Esta etapa pode ter sido responsável pela necrose ou oxidação de alguns explantes, uma vez que as plantas têm tendência a libertar compostos fenólicos, após serem feridas. A oxidação dos constituintes fenólicos pode resultar na formação de metabolitos que podem ser tóxicos para a planta ou resultar no acastanhamento dos tecidos vegetais (Vermerris & Nicholson, 2006).

As taxas de indução de calo nos diferentes meios de cultura foram igualmente avaliadas (tabela 2). Para tal, considerou-se que ocorreu indução de calo nos explantes foliares que sofreram um processo de expansão e dediferenciação celular, seguindo-se da formação de massas desorganizadas de células (Fig. 8C). A análise periódica das culturas permitiu constatar que, quatro semanas após o início do ensaio, todos os tratamentos tinham induzido a formação de calo. A maior taxa de indução (83,33 %) foi observada no meio suplementado com 2 mg/L de 2,4-D e 0,5 mg/L de KIN (M5) e foi cerca de 30% superior à menor taxa de indução obtida nos meios de cultura M1 e M2 (Tabela 2).

Pela análise estatística dos dados, verificou-se que a auxina (2,4-D) presente no meio de cultura teve um efeito mais acentuado na taxa de indução de calo que a citocinina (KIN). De facto, na presença de 0,5 mg/L de KIN, a adição de 1 mg/L de 2,4D (M3) ou 2 mg/L de 2,4-D (M5), levou a taxas de indução significativamente diferentes. Uma maior concentração de 2,4-D (2 mg/L) foi mais favorável à indução de calo (83,33%) comparativamente à concentração mais baixa de 1 mg/L que apenas promoveu a indução de calo em 50% dos explantes. Por outro lado, os meios de cultura suplementados com a mesma concentração de 2,4-D (M1-M2 e M4-M5) na presença ou ausência de KIN, não apresentaram diferenças significativas nas suas taxas de indução de calo.

O 2,4-D é uma auxina frequentemente utilizada na indução de calo, uma vez que é capaz de reverter o estado de diferenciação celular, promover a divisão celular e controlar o crescimento e alongamento das células (George *et al.*, 2008). Neste ensaio verificou-se que quando conjugada à KIN, uma maior concentração de 2,4-D foi mais favorável à indução de calo (meio M5), tendo sido responsável pela maior taxa de indução. No entanto, quando associada ao tidiazurão, uma concentração de 1 mg/L (meio M3) foi suficiente para obter taxas de indução de calo semelhantes às verificadas no meio M5.

Tabela 3 - Indução de calo em folhas do clone P de medronheiro. Os resultados apresentados consistem na percentagem de indução e de sobrevivência de calo e foram registados, 4 e 8 semanas, respetivamente, após o início das culturas.

Explante	Suplementação hormonal (mg/L)	Indução calo (%)*	Sobrevivência calo (%)
Folhas com cortes transversais na página inferior	M1: (1) 2,4-D	50,00 ± 26,46 ^b	0
	M2: (1) 2,4-D + (0,5) KIN	50,00 ± 40,00 ^b	0
	M3: (1) 2,4-D + (1) TDZ	73,33 ± 5,77 ^{a, b}	100
	M4: (2) 2,4-D	56,67 ± 28,87 ^{a, b}	0
	M5: (2) 2,4-D + (0,5) KIN	83,33 ± 11,55 ^a	0

* Cada valor consiste na média em percentagem e respetivo desvio padrão de 3 réplicas de 10 explantes para cada tratamento. Letras diferentes, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (p<0,05).

Apesar de todos os tratamentos terem originado calo, este apenas sobreviveu durante todo o ensaio, no meio M3, suplementado com 1 mg/L 2,4-D e 1 mg/L de tidiazurão. Nesse meio o calo formado apresentou uma cor amarela e esbranquiçada constituída por zonas bastante friáveis, juntamente com outras mais compactas. A taxa de sobrevivência e crescimento dos calos obtidos nesse meio de cultura foi de 100%, sendo por isso considerado o meio mais apropriado para a sua indução e crescimento. Todos os calos produzidos nos restantes meios de cultura acabaram por não prosseguir a sua divisão celular, e por isso, degenerar ou oxidar (0% de sobrevivência).

O tidiazurão é um composto utilizado como regulador de crescimento que tem demonstrado atividades semelhantes às das citocininas, na promoção do crescimento de culturas de calo, pelo seu efeito na divisão celular (Trivedi *et al.*, 2010). Uma vez que a indução de calo depende do balanço hormonal existente no meio de cultura, é provável que a adição de tidiazurão (1 mg/ L) ao 2,4-D (1 mg/L), tenha sido suficiente para estimular o crescimento de calo e permitir o seu desenvolvimento, contrariamente ao que aconteceu nos meios M1 e M3. Alguns autores consideram ainda que o tidiazurão pode modificar os níveis de auxinas endógenas, aumentando a quantidade de compostos com atividade semelhante às auxinas, responsáveis pela proliferação celular (Gomes, 2011).

No medronheiro, e em *Arbutus andrachne*, já foi observada a indução e crescimento de calo em meio de cultura suplementado por TDZ (El-Mahrouk *et al.*, 2010; Gomes, 2011). Num dos trabalhos realizado por El-Mahrouk *et al.* (2010) foi também verificado, nas condições de cultura testadas, o maior crescimento de calo nos meios suplementados com 2 mg/L de TDZ.

Após a realização deste ensaio considerou-se que o meio M3 constituído por 1 mg/L de 2,4-D e 1 mg/L de TDZ foi o que apresentou resultados mais consistentes e mais propícios à obtenção de calo. Por este motivo, este foi o meio utilizado para a obtenção de calo com vista aos ensaios de avaliação do perfil de crescimento dos calos em meio sólido e líquido e otimização das condições de cultura.

3.1.2 Avaliação do perfil de crescimento e otimização das condições de cultura

O primeiro ensaio realizado para a avaliação do perfil de crescimento dos calos teve como objetivo determinar se o tipo de recipiente utilizado no cultivo de calo em meio sólido influencia o seu crescimento e caso isso aconteça, perceber qual o recipiente mais adequado para o efeito.

O incremento da massa inicial de calo foi analisado semanalmente nos três tipos de recipientes, durante um período de cinco semanas. No fim do tempo de cultura, verificou-se que as curvas de crescimento dos calos apresentaram algumas diferenças, dependendo do tipo de recipiente utilizado (Fig. 9). No que diz respeito à cinética de crescimento das culturas, é possível verificar, pela análise da figura 9, que as massas de calo crescidas em tubos de ensaio e caixas com tampas de filtro apresentaram um perfil de crescimento sigmoidal, enquanto as mantidas em caixas com tampas com filtro exibiram um crescimento tipo linear, sem uma fase exponencial evidente.

Após a análise estatística dos resultados e analisando mais em pormenor os dados obtidos, constatou-se que, para os três recipientes, ocorreu um incremento em massa significativo ao longo das cinco semanas de cultura (Fig. 10). Os tubos de ensaio revelaram ser a melhor opção para o crescimento dos calos, na medida em que demonstraram o maior incremento das massas de calo ao longo de todos os períodos da cultura, comparativamente aos outros recipientes. Por consequência, as caixas de filtro

foram os recipientes responsáveis pelo segundo melhor incremento, seguindo-se, por fim, as caixas de Petri (Fig. 10).

Nas duas primeiras semanas de cultura, o incremento em massa dos calos foi muito semelhante nos vários recipientes, não tendo sido verificadas diferenças significativas. Nesse período, a taxa de incremento não foi muito elevada, o que pode estar relacionado com o facto das massas celulares se encontrarem em fase de latência, a preparar para a divisão celular. Já a partir da terceira semana de cultura, as massas de calo colocadas a crescer nos tubos de ensaio e caixas de filtro apresentaram incrementos significativamente maiores que as massas de calo crescidas nas caixas de Petri. Este aumento em massa traduziu-se no aparecimento de uma curva de crescimento sigmóide (Figs. 9 e 10), e corresponde ao início da fase do crescimento exponencial. Tanto nos tubos de ensaio, como nas caixas de filtro, deu-se o maior incremento na quinta semana de cultura (t_5), tendo ocorrido um aumento em massa de mais de 200 mg nessa semana. Este aumento, no entanto, não sucedeu nos calos cultivados em caixas de Petri, uma vez que estes apresentaram um crescimento linear ao longo do tempo de cultura (Fig. 9).

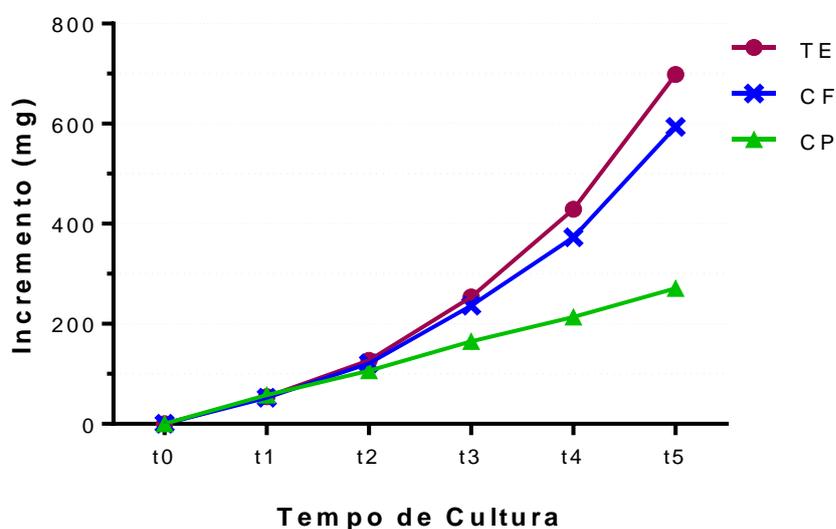


Figura 9 – Curva de crescimento / incremento em massa dos calos crescidos em meio de cultura agarizado, em três tipos de recipientes: tubos de ensaio (TE), caixas com tampas de filtro (CF) e caixas de Petri (CP) ao longo do tempo de cultura de 5 semanas (t). Os valores consistem nas médias do incremento em massa (mg) para três réplicas, em cada tratamento.

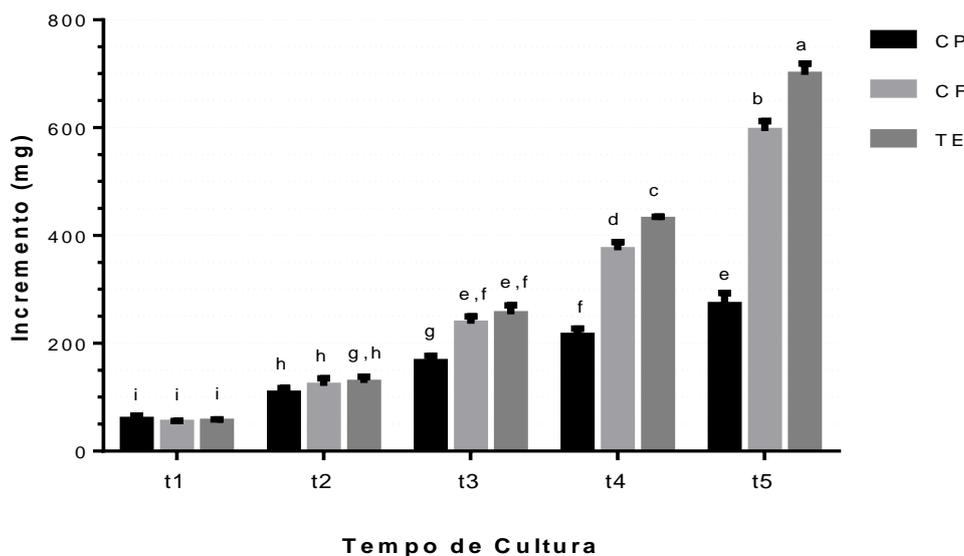


Figura 10 – Efeito de três tipos de recipientes: tubos de ensaio (TE), caixas com tampa de filtro (CF), caixas de Petri (CP), no incremento em massa de calos cultivados em meio de cultura agarizado, ao longo do tempo de cultura de 5 semanas (t). Os valores de incremento correspondem à média de 3 réplicas por tratamento e respectivo desvio padrão. Letras diferentes, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

De um modo geral, este ensaio permitiu constatar que o tipo de recipiente utilizado influenciou o crescimento dos calos em meio sólido. O recipiente mais favorável para a cultura de calo revelou ser o tubo de ensaio, seguindo-se das caixas com tampas de filtro e caixas de Petri. Estas diferenças podem ser explicadas com base nas trocas gasosas permitidas pelos diferentes recipientes. Neste caso, os resultados demonstram que ocorre um estímulo do crescimento dos calos quando as trocas gasosas são facilitadas pelas rolhas de algodão dos tubos de ensaio e com as tampas de filtro das caixas. Na ausência de luz as células não realizam a fotossíntese e por isso a energia é obtida através do processo de respiração, dependente de oxigénio. Um estudo realizado em calos de batata comprovaram que o crescimento do calo duplicou quando colocado num meio de cultura com 70% de oxigénio. Além disso, de acordo com George *et al.* (2008), é essencial existir uma troca gasosa adequada para permitir um elevado crescimento dos tecidos, uma vez que culturas não fotossintéticas apresentam uma diminuição do seu crescimento, quando os níveis de oxigénio são diminuídos. Ainda é importante referir que, existe um nível crítico de oxigénio necessário para permitir a sobrevivência das células e que apesar destas conseguirem sobreviver com baixas taxas de oxigénio, não existem evidências de que os tecidos se desenvolvam nessas condições.

É também plausível referir que o maior crescimento verificado nos tubos de ensaio possa estar relacionado com a acumulação, nos outros recipientes, de componentes gasosos que possam afetar o crescimento das culturas. É o caso do etileno e, eventualmente, do óxido nítrico, dois compostos que são bem conhecidos por condicionarem vários processos de morfogênese. A utilização de rolhas de algodão cardado nos tubos permite a renovação da atmosfera circundante dos explantes, podendo contribuir para a diminuição da pressão parcial destes gases e o conseqüente aumento de crescimento.

No segundo ensaio realizado pretendeu-se averiguar qual a razão entre a massa inicial de calo e o volume de meio de cultura, mais propícia ao incremento das suspensões celulares. Tal como referido anteriormente, foram realizados seis tratamentos diferentes nos quais foram testadas três massas iniciais de calo: 100 mg (m100), 200 mg (m200) e 300 mg (m300) e dois volumes de meio de cultura: 5 mL (V5) e 10 mL (V10), ao longo de um período de 5 semanas (t0 a t5).

A figura 11 mostra algumas fases das culturas de calo em meio líquido.

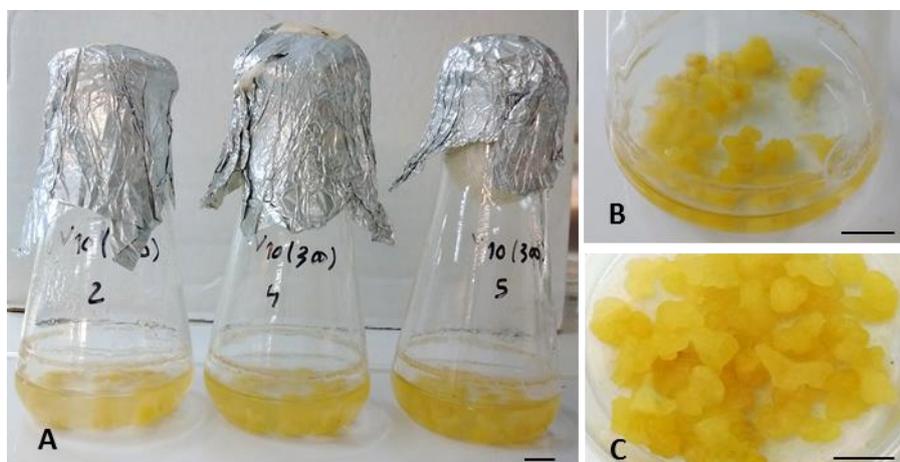


Figura 11– (A, B) Calo em meio de cultura líquido após 3 semanas de cultura. (C) Calo crescido em meio líquido após 5 semanas de cultura. A linha corresponde a 1 cm.

Na figura 12A encontram-se representadas as curvas de crescimento das massas celulares para os vários tratamentos ao longo do período de cultura.

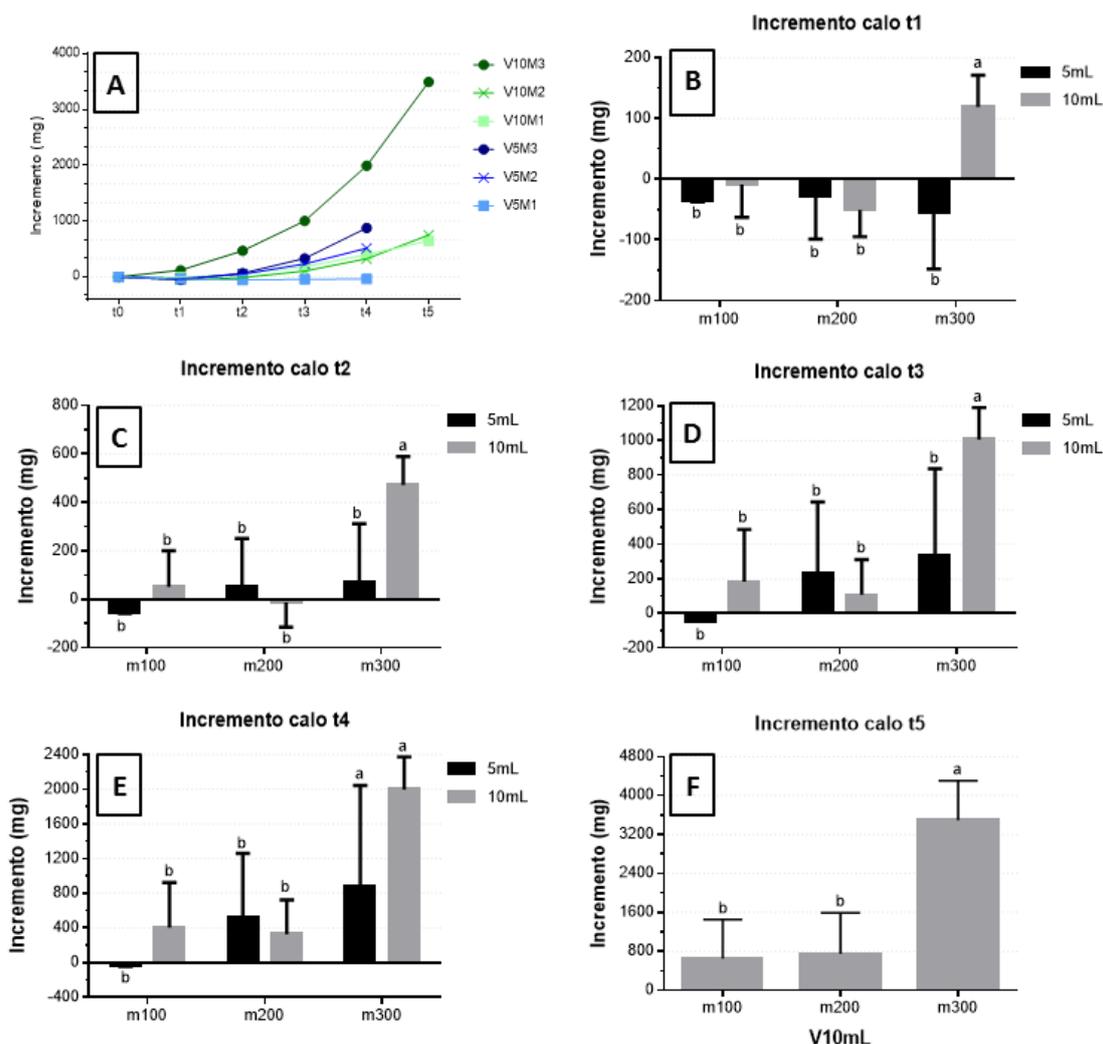


Figura 12 - Dados representativos do efeito de seis diferentes tratamentos (razões massa inicial de calo/ volume de meio), no incremento em massa, de suspensões celulares. Nos seis diferentes tratamentos foram testadas três massas iniciais de calo (100, 200 e 300 mg) e dois volumes de meio de cultura (5 e 10 mL). O crescimento das massas de calo (peso) foi avaliado semanalmente ao longo de cinco semanas (A). O Incremento em massa foi calculado semanalmente a partir da massa inicial de calo, ao longo das cinco semanas de cultura: t1 (B), t2 (C), t3 (D), t4 (E), t5 (F). Os resultados correspondem ao valor da média de 6 réplicas por tratamento e respectivo desvio padrão. Letras diferentes, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nas figuras 12A e 12F não se encontram apresentados os valores do incremento da sexta semana de cultura (t5) para os calos cultivados em 5 mL de meio, uma vez que ocorreu contaminação do material vegetal. A contaminação ocorreu provavelmente devido a um erro no manuseamento do material vegetal ou laboratorial durante o processo de filtração e pesagem do calo na quinta semana de cultura, daí ter afetado grande parte do material vegetal.

Como se depreende pela observação da figura 12A, verificou-se um crescimento exponencial dos calos na maior parte dos tratamentos, tendo sido verificados os maiores incrementos nas culturas iniciadas com uma massa de 300 mg e volumes de 10 e 5 mL de meio de cultura, na sexta (t5) e quinta semana (t4) de cultura, respetivamente.

A análise mais pormenorizada da evolução do crescimento das culturas ao longo dos diferentes períodos do ensaio permitiu avaliar e compreender o efeito da relação massa de calo/volume de meio, no desenvolvimento das culturas.

Antes de se analisarem os resultados é importante referir que, tal como é possível notar nos diferentes gráficos, o desvio padrão associado ao incremento em massa dos calos, é de um modo geral, bastante elevado. De facto os calos exibiram uma resposta de crescimento bastante diversa para o mesmo tratamento. Esta diversidade de resposta pode ter sido causada pela dificuldade de adaptação dos calos provenientes do meio sólido ao novo meio de cultura e sua conseqüente degeneração. Além disso, segundo Mustafa *et al.* (2011), após a iniciação de uma cultura de calo em meio líquido as culturas passam por um período de adaptação ao novo meio, que pode demorar alguns meses. A ausência deste período de adaptação neste ensaio, pode ter sido responsável pela não homogeneidade dos resultados e inicial degeneração dos calos. Outra explicação prende-se com o facto de as culturas não estarem sincronizadas e as células não se encontrarem na mesma fase do ciclo mitótico (Canhoto, 2010).

Pela observação e análise estatística dos resultados, verificou-se que após uma semana de cultura (t1), as massas iniciais de calo provenientes de meio sólido, sofreram um decréscimo de peso quando inoculadas em meio líquido. Esta situação ocorreu em todos os tratamentos, exceto para massas de 300 mg de calo inoculadas em 10 mL de meio (m100V10) (Fig. 12B). Uma possível explicação para esta situação prende-se com o facto de que algumas massas de células possam ter tido dificuldades na adaptação ao meio de cultura líquido e terem degenerado, tal como acima referido.

Na segunda semana de cultura já foi verificado um incremento positivo em todos os tratamentos, exceto para as culturas iniciadas com 100 mg de calo e 5 mL de meio de cultura (m100V5) e com 200 mg de calo e 10 mL de meio de cultura (m200V10). No entanto não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, exceto para

as culturas iniciadas com um inóculo inicial de calo de 300 mg e 10 mL de meio de cultura (m300V10) (Fig. 12C).

Já, a partir da terceira semana (t3) apenas as culturas iniciadas com 100 mg de calo e volume de meio de cultura de 5 mL (m100V5) continuaram a demonstrar um incremento negativo, que se prolongou até ao final do ensaio (Fig.12D). Neste tratamento, embora os valores do incremento tenham sido negativos, foi verificado um ligeiro crescimento das suspensões celulares ao longo do ensaio. Além disso, a par do que aconteceu na terceira semana de cultura, também se constatou que apenas as culturas iniciadas com 300 mg de calo e 10 mL de meio de cultura tiveram um crescimento significativamente superior às restantes. Face a estes resultados, não é possível tirar-se conclusões quanto ao efeito do volume no crescimento das culturas iniciadas com 100 e 200 mg de inóculo.

Para as culturas iniciadas com 10 mL de meio de cultura, verificou-se que o maior incremento ocorreu na quinta semana, tendo ocorrido, nessa semana um crescimento de cerca de 1500 mg, 349 mg e 248 mg para as culturas iniciadas com 300, 200 e 100 mg, respetivamente (Fig. 12E). Estes resultados indicam que para um volume de 10 mL, uma massa inicial de inóculo mais elevada origina incrementos mais rápidos e maiores. De forma análoga ao verificado nas culturas iniciadas com 10 mL de meio, também se constatou que para um volume de 5 mL, uma maior massa inicial de calo foi mais favorável ao desenvolvimento das culturas. Assim, as duas melhores taxas de crescimento (3497 mg e 878 mg) foram obtidas nas culturas de calo iniciadas com uma massa de 300 mg e volumes de 10 e 5 mL de meio de cultura, na sexta (t5) e quinta semana (t4) de cultura, respetivamente (Fig. 12E e F).

Tendo em conta estes dados, pode-se inferir, que volumes maiores são mais apropriados para a cultura de suspensões. Volumes mais pequenos podem ser fatores limitativos, na medida em que a saturação do meio é mais precoce e o acesso aos nutrientes é dificultado. Adicionalmente, verificou-se que o tamanho do inóculo é fundamental para se iniciar a cultura, neste caso, um maior inóculo de calo teve efeitos mais pronunciados no crescimento das culturas.

Estes resultados estão relacionados com a razão massa de calo/volume de meio existente na cultura uma vez que, de acordo com o trabalho de Mustafa *et al.* (2011) quanto menor for o tamanho do inóculo inicial, maior será a fase de latência, e, abaixo de

uma massa mínima, a cultura não cresce. Pelo contrário, quanto maior for o tamanho do inóculo, mais cedo ocorrerá a fase estacionária, isto é, mais precoce será o desenvolvimento, tal como verificado na figura 12A.

3.1.3 Estudos histológicos

Os estudos histológicos realizados neste trabalho tiveram como principal objetivo comparar a anatomia de diferentes tipos de calos, nomeadamente friáveis e compactos (meio líquido e agarizado) com boa taxa de crescimento e calos com reduzida taxa de crescimento (meio líquido).

O calo é um tecido amorfo formado por células indiferenciadas resultantes da divisão ativa do explante que lhe deu origem. Este pode apresentar uma consistência compacta ou friável, conforme a parede das suas células apresente uma maior ou menor quantidade de pectinas e hemicelulose, respetivamente (Lindsey & Jones, 1992).

Na figura 13 é possível visualizar os diferentes tipos de calos em estudo neste ensaio, bem como as respetivas microfotografias dos seus cortes histológicos. Pela observação da figura 13 é possível constatar algumas diferenças visuais, no que diz respeito à cor e à consistência dos calos. Os calos que apresentaram elevada taxa de crescimento (Figs 13 A, B, E e G) exibiram uma coloração amarela e esbranquiçada, enquanto os calos com reduzida taxa de desenvolvimento (Figs. 13 I e J) apresentam uma coloração mais rosa acastanhada. É importante referir que os calos da figura 13 (A, B) são provenientes do meio líquido, e, apesar de estarem distribuídos em pequenos aglomerados, apresentam uma consistência compacta, tais como os calos compactos provenientes de meio sólido (Fig. 13 E). A figura 13 G é representativa do calo friável.

A análise microscópica dos calos corados com azul de toluidina permitiu observar diferenças bastante notórias na sua organização celular, principalmente entre os calos que apresentaram uma boa taxa de crescimento e os que apresentaram um reduzido desenvolvimento.

Nos calos compactos provenientes de meio líquido foi possível observar zonas com células muito agregadas e pequenas, intercaladas com zonas possuindo células de maiores dimensões (Figs. 13 C e D). As regiões mais densas apresentavam-se constituídas por um células relativamente homogéneas, pequenas e justapostas, de forma mais ou menos

isodiamétrica. Estas zonas correspondem, provavelmente, a locais de divisão celular ativa do calo. As células de maiores dimensões são muito vacuolizadas e mais alongadas, e podem ser células em processo de degenerescência. Nos calos compactos provenientes de meio sólido também foi notória a presença de zonas mais ou menos densas de células e verificou-se que as células se apresentavam mais alongadas comparativamente às células dos calos provenientes de meio líquido (Fig. 13F).

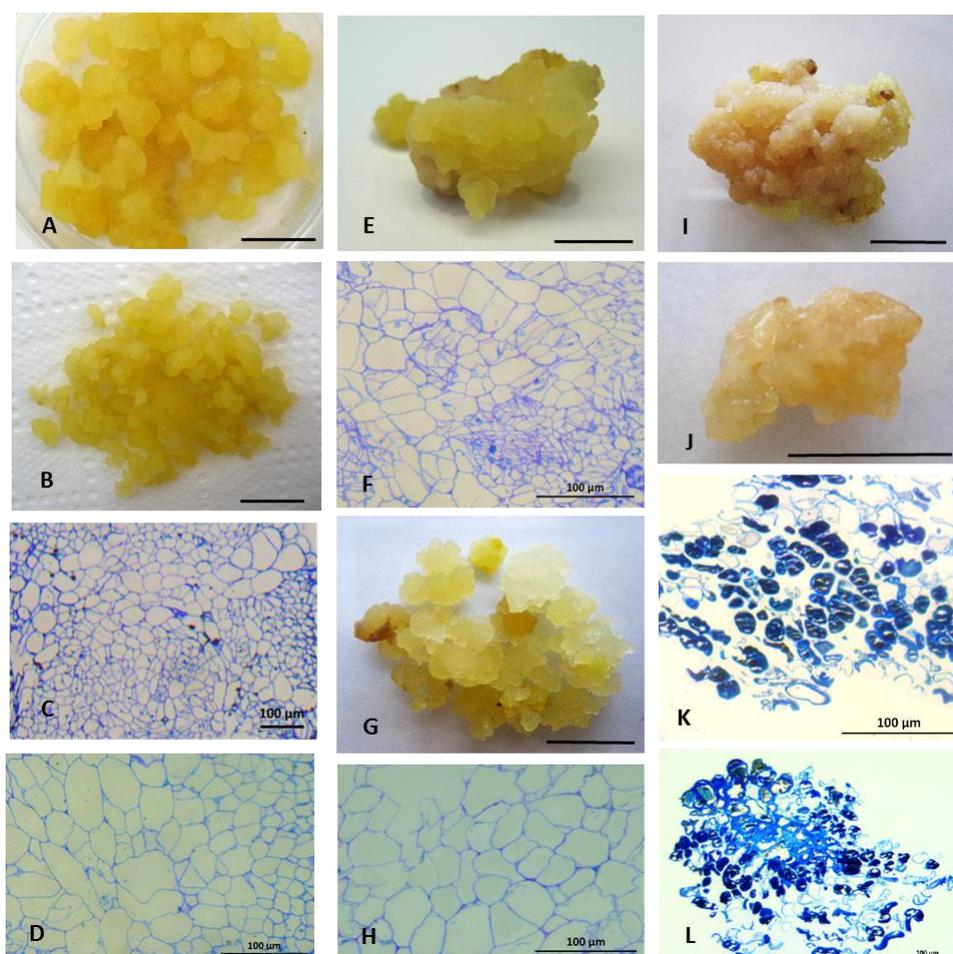


Figura 13 – Calos de medronheiro e respetiva análise histológica. (A, B) Calo compacto proveniente da cultura em meio líquido. (C,D) Secções de calo compacto proveniente de meio de cultura líquido coradas com azul de toluidina. (E) Calo compacto crescido em meio de cultura agarizado. (F) Secção de um calo compacto crescido em meio de cultura agarizado. (G) Calo friável cultivado em meio de cultura sólido. (H) Secção de um calo friável cultivado em meio de cultura sólido. (I, J) Calo com reduzida taxa de crescimento, desenvolvido em meio de cultura agarizado. (K,L) Secções de calos com reduzida taxa de crescimento crescido em meio de cultura agarizado. A linha nas figuras (A, B, E, G, I, J) correspondem a 1 cm.

De uma maneira geral, os calos compactos apresentam uma elevada agregação e organização celular, provavelmente associada à quantidade de pectinas e celulose presente na sua parede celular (Street, 1977).

Nos calos friáveis verificou-se a presença de células com vacúolos muito grandes, citoplasma reduzido e com formas variáveis. Assim, apesar da diferente organização celular e grau de agregação das células, os calos compactos e friáveis não demonstraram grandes diferenças histológicas (Fig. 13H).

Nos calos com reduzida taxa de crescimento (Fig. 13K e L) verificou-se a presença de células muito coradas com a ocorrência de grandes espaços intercelulares. A coloração destas células é provavelmente devida à forte acumulação de compostos polifenólicos nos vacúolos, uma situação muito comum em cultura de células vegetais, particularmente de espécies lenhosas. No entanto, a confirmação da natureza fenólica destes compostos necessita de estudos ulteriores utilizando técnicas de histoquímica específicas para a deteção destes metabolitos.

3.2 Análise dos compostos fenólicos

O estudo dos compostos fenólicos do medronheiro foi realizado com o objetivo de avaliar a presença de arbutina no material *in vivo* e a capacidade de culturas *in vitro* produzirem arbutina durante o seu metabolismo normal ou quando sujeitas a tratamentos com hidroquinona.

3.2.1 Determinação do rendimento extrativo no material *in vivo* e *in vitro*.

Foi determinado o rendimento de extratos metanólicos obtidos a partir do material colhido em Coimbra, nomeadamente de folhas jovens (FJ) e maduras (FM) e de frutos em diferentes fases de maturação: verde (FR1), amarela (FR2), laranja (FR3), vermelha (FR4), vermelha intensa (FR5), bem como do material *in vitro* resultante do ensaio de biotransformação. O rendimento extrativo foi expresso em g de extrato por 100 g de amostra fresca (Tabela 4).

Tabela 4 – Rendimento extrativo das amostras *in vivo* (folhas e frutos colhidos em Coimbra no polo II da Universidade) e *in vitro* (ensaio de biotransformação de hidroquinona em arbutina) expresso em g extrato / 100 g amostra fresca.

Amostras		Rendimento extrativo (g extrato/ 100 g amostra fresca)*
Folhas <i>in vivo</i>	FJ	$10,95 \pm 1,46^a$
	FM	$17,26 \pm 1,03^b$
Frutos <i>in vivo</i>	FR1	$19,88 \pm 0,21^a$
	FR2	$17,96 \pm 0,94^a$
	FR3	$22,52 \pm 1,76^a$
	FR4	$22,49 \pm 3,95^a$
	FR5	$24,23 \pm 4,77^a$
	Controlo	$6,16 \pm 0,20^a$
Ensaio de biotransformação	[50] 24h	$6,82 \pm 0,31^a$
	[50] 48h	$6,48 \pm 0,46^a$
	[50] 168h	$6,47 \pm 1,32^a$
	[200] 24h	$6,59 \pm 0,86^a$
	[200] 48h	$7,04 \pm 0,56^a$
	[200] 168h	$7,62 \pm 0,52^a$

* Os valores correspondem às médias de três réplicas e respetivo desvio padrão. Letras diferentes, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após análise dos resultados, constatou-se que as amostras *in vivo* apresentaram um maior rendimento extrativo quando comparadas às amostras *in vitro*, provenientes dos ensaios de biotransformação. Este resultado leva nos a crer que as plantas cultivadas *in vitro*, em meio líquido, apresentam uma composição química diferente das restantes, mas também pode ser explicado pelo facto destas apresentarem um elevado teor em água, responsável pelo aumento do peso da amostra fresca.

Verificou-se também que as folhas jovens não apresentaram um rendimento tão elevado quanto às folhas maduras, talvez por ainda estarem em fase de desenvolvimento e, conseqüentemente, apresentarem uma composição química qualitativa e/ou quantitativa diferente.

No que diz respeito ao rendimento extrativo dos frutos, não foram verificadas diferenças significativas associadas ao seu estado de maturação. No entanto, foi observado um “ligeiro” aumento do rendimento extrativo, associado ao aumento do estado de maturação dos frutos. Tal foi também verificado por Oliveira *et al.* (2011) no seu estudo realizado sobre o efeito do estado de maturação dos frutos na sua composição química e atividade antioxidante.

Uma das características mais importantes dos compostos fenólicos prende-se com a sua propensão para se oxidarem, tanto por enzimas específicas presentes nas plantas, como pela sua exposição à luz ou contacto com o oxigénio. Além disso, estes compostos são muitas vezes encontrados nas plantas em forma de glicósidos, facilmente oxidados. Deste modo, para garantir a manutenção dos compostos fenólicos, é necessário ter em consideração a natureza do solvente extrativo a utilizar e optar por solventes que reduzam o processo oxidativo. Segundo Harborne, os solventes de natureza alcoólica previnem a ocorrência de oxidação de natureza enzimática (Harborne, 1998).

Neste trabalho o solvente extrativo utilizado foi o metanol e as amostras foram protegidas da luz, no decorrer de todos os ensaios de forma a minimizar possíveis alterações dos compostos fenólicos.

3.2.2 Dosagem dos fenóis totais

O teor de fenóis totais presentes nas amostras foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Este método fundamenta-se numa reação de oxidação redução na qual, em meio alcalino, ocorre a oxidação do ião fenolato e a redução do reagente (ácido fosfomolibdico-túngstico), originando uma solução corada de azul (Watermann e Mole, 1994).

O teor de fenóis totais presente nos extratos foi expresso em g de fenóis totais, equivalentes a ácido gálgico, por 100 g de extrato. Este foi determinado por recurso à equação da reta de calibração do padrão de ácido gálgico: $y = 0,0807x + 0,0085$ ($R^2 = 0,9947$).

Esta reta foi obtida a partir dos valores das diferenças entre as duas absorvâncias a 700 e a 735 nm, das várias concentrações da solução padrão de ácido gálgico em acetona a 70 %.

A par do que aconteceu com o rendimento extrativo, também o teor em fenóis totais mostrou ser mais elevado nas folhas maduras, face às jovens (Tabela 5). Além disso, os extratos metanólicos das folhas jovens ($18,93 \pm 2,52$ g FT /100 g extrato) e maduras ($25,23 \pm 2,284$ g FT /100 g extrato) ainda apresentaram um conteúdo de fenóis totais cerca de 10 vezes superior ao encontrado nos frutos, que variou de $1,36 \pm 0,52$ a $2,74 \pm 0,18$ g FT /100 g extrato. Estes resultados estão próximos dos valores de fenóis totais descritos noutros trabalhos da literatura, para as folhas (Oliveira *et al.*, 2009) e os frutos (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2011), respetivamente.

Tabela 5 - Teor de fenóis totais presentes nas amostras *in vivo* (folhas e frutos colhidos em Coimbra no polo II da Universidade) e *in vitro* (ensaio de biotransformação de hidroquinona em arbutina) expresso em g de ácido gálgico /100 g extrato.

Amostras		Fenóis totais (g FT/ 100 g extrato) *
Folhas <i>in vivo</i>	FJ	$18,93 \pm 2,52^a$
	FM	$25,23 \pm 2,28^a$
Frutos <i>in vivo</i>	FR1	$1,73 \pm 0,26^a$
	FR2	$2,74 \pm 0,18^a$
	FR3	$1,36 \pm 0,52^a$
	FR4	$1,56 \pm 0,54^a$
	FR5	$1,67 \pm 0,74^a$
Ensaio de biotransformação	Controlo	$15,17 \pm 0,34$
	[50] 24h	$16,85 \pm 1,78^a$
	[50] 48h	$12,15 \pm 3,50^{a,b}$
	[50] 168h	$10,35 \pm 2,16^b$
	[200] 24h	$16,89 \pm 3,43^a$
	[200] 48h	$15,66 \pm 0,74^{a,b}$
	[200] 168h	$13,28 \pm 1,37^{a,b}$

* Os valores correspondem às médias de três réplicas e respetivo desvio padrão. Letras diferentes, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nos frutos, o teor de fenóis totais mostrou um padrão diferente do padrão obtido no rendimento extrativo. Apesar das diferenças obtidas não serem significativas, os frutos amarelos exibiram um teor de fenóis totais mais elevado que os frutos verdes e maduros (laranja e vermelhos). No trabalho de Oliveira *et al.* (2011), foi demonstrado que ambos os frutos verdes e maduros exibiram valores semelhantes de fenóis totais, tendo, os frutos com estado de maturação intermédio, apresentado na sua constituição, quantidades de fenóis totais superiores.

As amostras do ensaio de biotransformação de hidroquinona em arbutina apresentaram algumas diferenças quanto ao teor de compostos fenólicos. Pela análise estatística dos resultados obtidos é possível perceber que o tempo de exposição à hidroquinona foi o fator mais importante nas diferenças de fenóis totais obtidas entre as amostras. De facto, constatou-se que quando expostas a uma concentração de 50 mg/L de hidroquinona, as plantas inoculadas 24 h com hidroquinona exibiram uma quantidade de fenóis totais significativamente superior às plantas inoculadas durante 168 h. Por outro lado, comparando o teor de fenóis totais num período de tempo específico, verificou-se que a quantidade de fenóis totais produzida nas duas concentrações não apresentou uma grande variação.

Os valores de fenóis totais podem provavelmente estar relacionados com a quantidade de hidroquinona ou arbutina presente nas amostras o que será analisado na secção 3.2.3. No entanto, é já possível indicar que um período de tempo maior de exposição à hidroquinona pode ter desencadeado um processo de desintoxicação por parte das plantas e libertação dos compostos para o meio de cultura, tendo em consideração que o teor de fenóis totais apresentou um padrão evolutivo característico, com tendência para diminuir com o aumento do tempo de exposição à hidroquinona.

3.2.3 Cromatografia líquida de alta resolução

A Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) é uma técnica que permite a separação dos compostos de uma mistura através da sua afinidade e interação com uma fase móvel (solvente) e uma fase estacionária (coluna com partículas muito finas).

Neste trabalho foi utilizada uma coluna de fase reversa, com fase estacionária apolar e fase móvel polar (metanol e ácido fórmico a 5%), assim os compostos foram separados tendo em conta com a sua polaridade. Os compostos polares das amostras, solúveis na fase móvel, foram os primeiros eluídos, seguindo-se posteriormente dos compostos apolares que ficaram retidos mais tempo pela fase estacionária (Bird, 1989). O detetor de fotodíodos permitiu, após separação cromatográfica, detetar os diferentes constituintes da amostra que absorvem no ultra-violeta (UV) e/ou no visível (V), obtendo-se, deste modo para cada composto, o respetivo tempo de retenção e, simultaneamente, o seu perfil espectral (UV-V). Uma vez que os compostos fenólicos apresentam uma sequência de eluição e um perfil espectral específico, dependendo da sua natureza, estes dois parâmetros são fundamentais para a identificação dos compostos e para elucidar quanto à sua diversidade estrutural (Rodrigues, 2008). Estes parâmetros permitiram ainda averiguar a presença de arbutina e hidroquinona nas amostras em estudo.

Na figura 14 encontra-se representado o material vegetal analisado no estudo dos compostos fenólicos e na análise por HPLC.

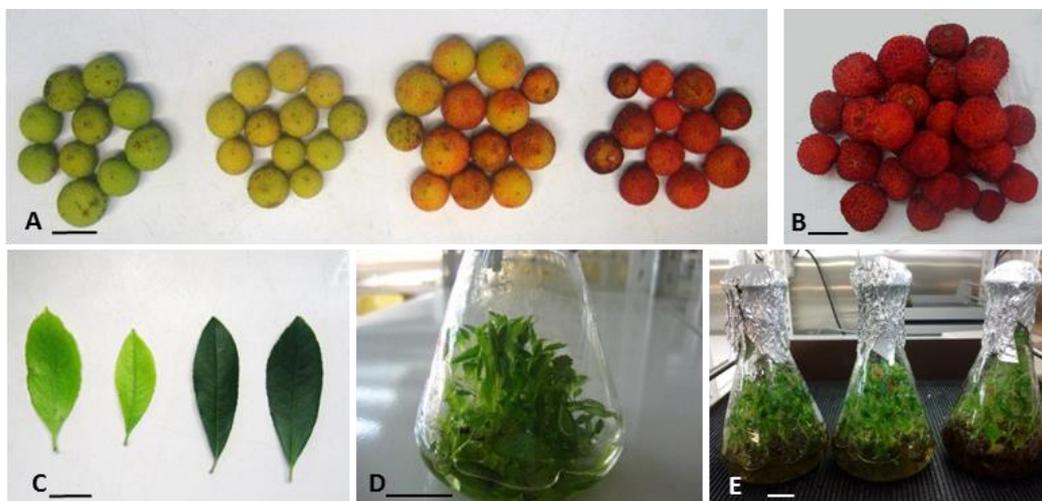


Figura 14 – (A, B) Frutos de medronheiro em diferentes fases de maturação (verdes, amarelos, laranjas, vermelhos e vermelho intenso). (C) Folhas em diferentes fases de desenvolvimento (jovens e maduras). (D, E) Proliferação de rebentos caulinares em meio líquido. As linhas correspondem a 1 cm.

Neste trabalho, a análise cromatográfica das amostras *in vivo* e *in vitro* revelou a presença de arbutina nos extratos metanólicos das folhas colhidas no campo e das plantas cultivadas *in vitro*, não tendo sido encontrada nos frutos. Pelo contrário, não foi detetada hidroquinona em nenhuma amostra analisada, quer do material *in vivo*, quer *in vitro*. Estes

resultados indicam que o medronheiro consegue sintetizar naturalmente hidroquinona nas suas folhas e que, quando cultivado *in vitro* com hidroquinona, consegue metabolizá-la e transformá-la em arbutina.

A identificação da arbutina foi feita por comparação do perfil cromatográfico das amostras com o perfil do padrão da arbutina, nomeadamente pela comparação do tempo de retenção, perfil espectral e máximo de absorção UV do composto.

As figuras 15, 16, 17, ilustram o perfil espectral da arbutina, da hidroquinona e o cromatograma do padrão da arbutina e hidroquinona, respetivamente. As figuras 18, 19, 20, 21, 22, correspondem aos cromatogramas das folhas maduras, folhas jovens, frutos verdes e duas amostras do ensaio de biotransformação expostas durante 24 horas a 50 e 200 mg/L de hidroquinona, respetivamente.

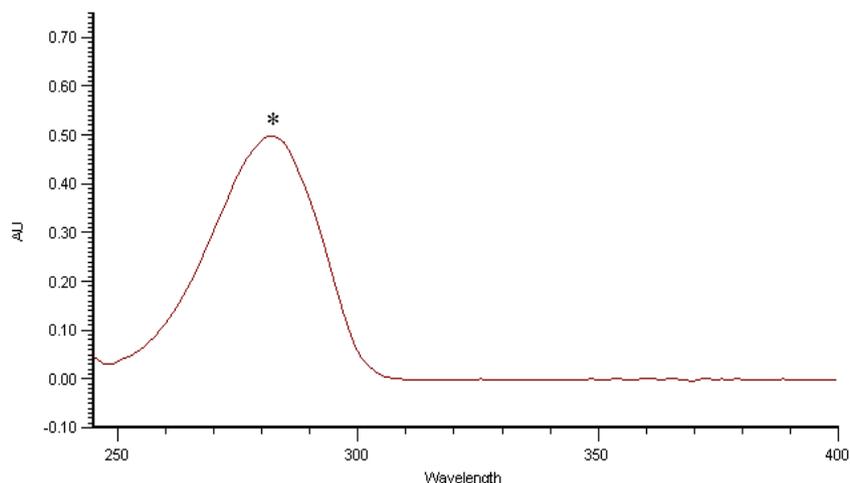


Figura 15 - Perfil espectral da arbutina, com máximo de absorção aos 283 nm (*) e tempo de retenção de 4,6 minutos.

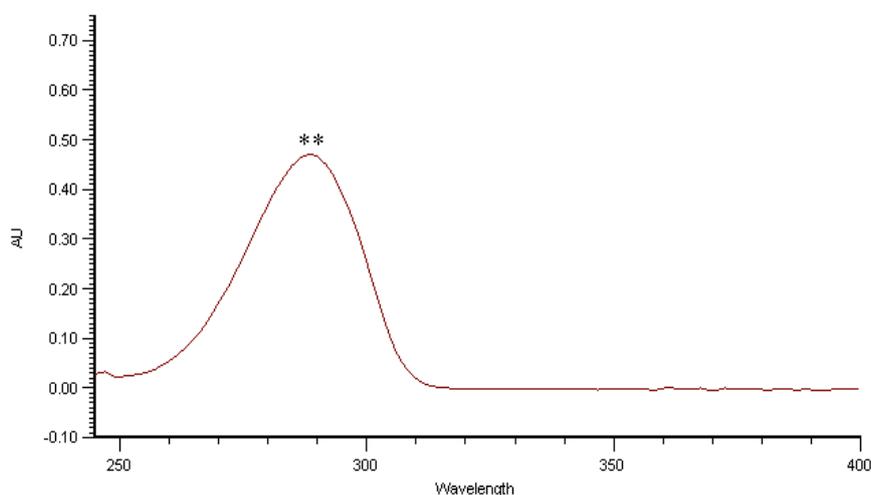


Figura 16 - Perfil espectral da hidroquinona, com máximo de absorção aos 289 nm (**) e tempo de retenção de 5,3 minutos.

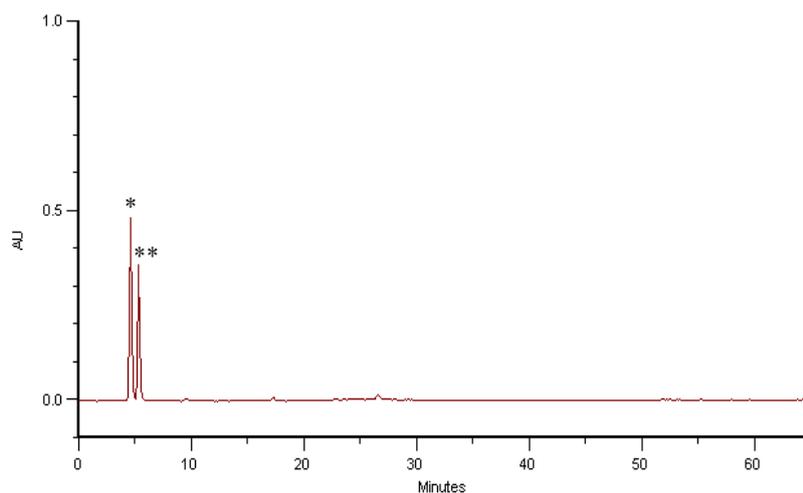


Figura 17 - Cromatograma padrão da mistura de arbutina (*) e hidroquinona (**).

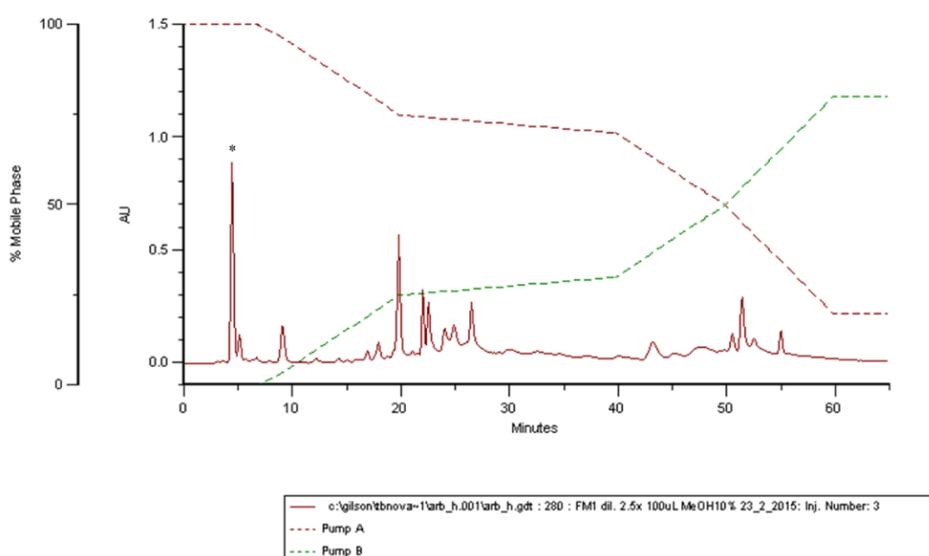


Figura 18 - Cromatograma das folhas maduras de medronheiro, colhidas em Coimbra - no Polo II da Universidade de Coimbra em Outubro de 2014. (*) Arbutina

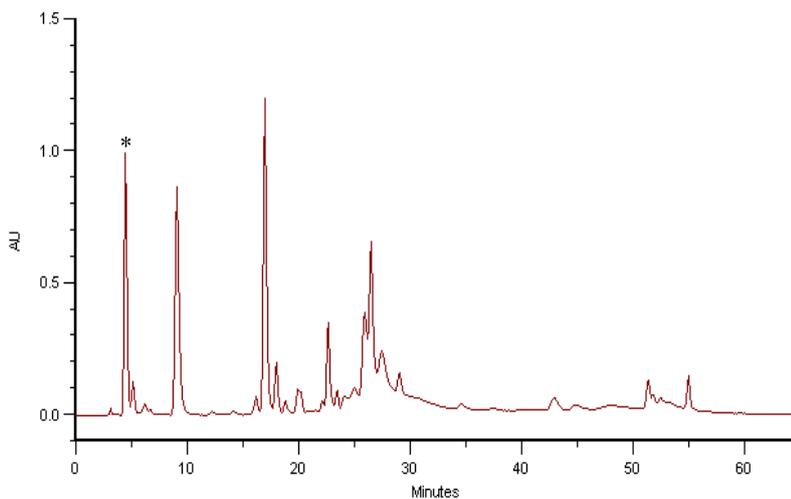


Figura 19 - Cromatograma das folhas jovens de medronheiro colhidas em Coimbra - no Polo II da Universidade de Coimbra em Outubro de 2014. (*) Arbutina.

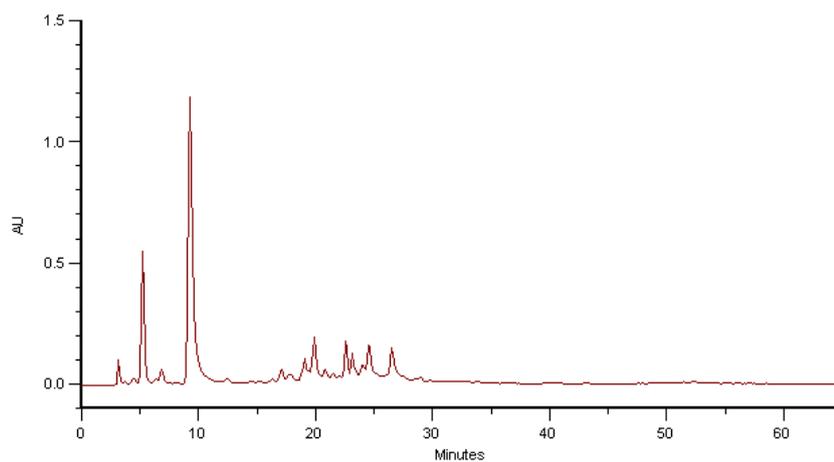


Figura 20 - Cromatograma do fruto verde (FR1) de medronheiro, colhido em Coimbra - no Polo II da Universidade de Coimbra em Outubro de 2014.

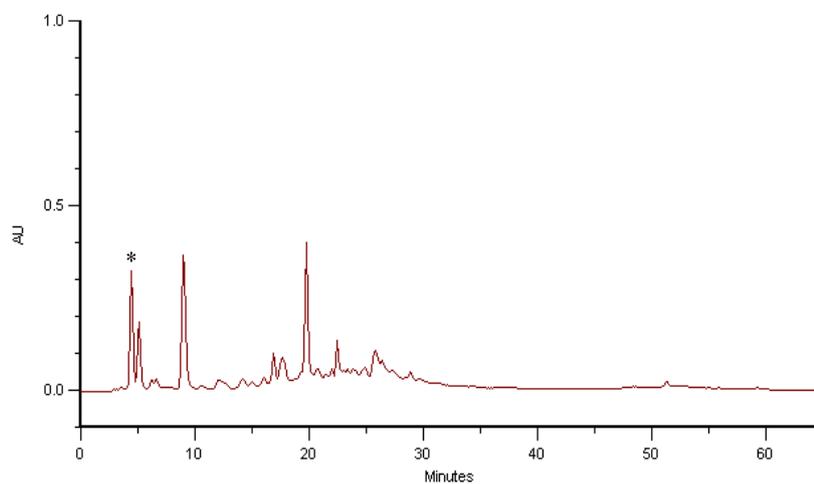


Figura 21 - Cromatograma de uma amostra do ensaio de biotransformação exposta a uma concentração de 50 mg/L hidroquinona durante um período de 24 horas ([50] 24h). (*) Arbutina.

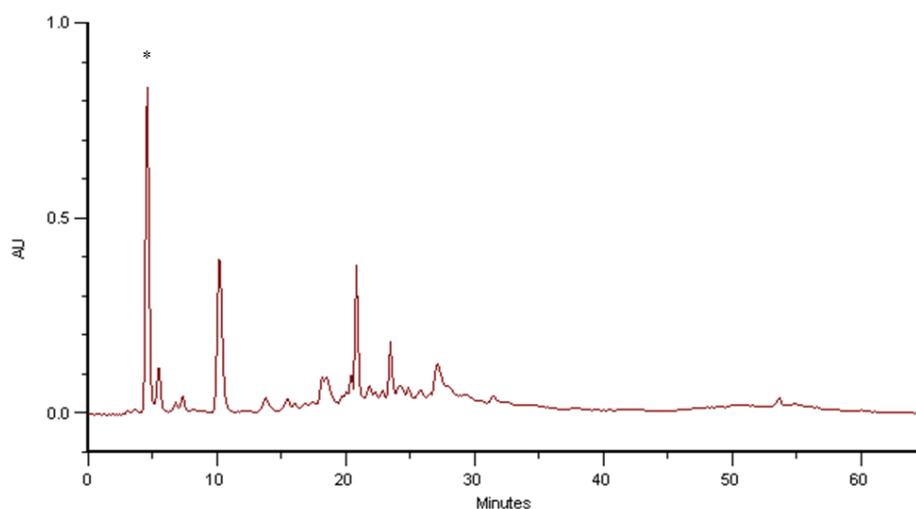


Figura 22- Cromatograma de uma amostra do ensaio de biotransformação exposta a uma concentração de 200 mg/L hidroquinona durante um período de 24 horas ([200] 24h). (*) Arbutina.

Após a injeção das amostras em estudo e dos padrões de arbutina e hidroquinona, foi possível quantificar a arbutina existente nas amostras das folhas e dos ensaios de biotransformação. A quantificação foi feita, recorrendo à equação da reta de calibração da arbutina: $y = 563.450,17400x + 561.419,96498$, $R^2 = 0,99990$

Esta equação foi construída recorrendo aos valores das áreas sob a curva (AUC), obtidos para as diferentes concentrações da solução padrão de arbutina. Assim, sabendo os valores de AUC (y) obtidos para as nossas amostras após análise cromatográfica, foi possível calcular a concentração de arbutina presente nas mesmas (x), por substituição dos valores na reta de calibração.

Os resultados obtidos demonstram a presença de arbutina nas folhas *in vivo* (jovens e maduras) do medronheiro e por isso comprovam a sua capacidade de síntese em condições naturais, tal como descrito na literatura (Malheiro *et al.*, 2012; Pavlović *et al.*, 2011).

Tal como verificado no teor de fenóis totais presentes nas folhas jovens e maduras (Figs. 23 B), a quantidade de arbutina presente nas folhas maduras foi igualmente superior à das folhas jovens (Fig. 23A). Estes resultados indicam que existe portanto uma correlação entre o teor de fenóis totais e a quantidade de arbutina presente nas folhas.

No que se refere ao ensaio de biotransformação de hidroquinona em arbutina, verificou-se que as culturas *in vitro* de medronheiro demonstraram a capacidade de produzir arbutina. Neste ensaio constatou-se que, além das plantas sujeitas a um tratamento com hidroquinona, também as plantas cultivadas em meio líquido, sem exposição à hidroquinona – ensaio controlo, apresentaram na sua constituição uma pequena quantidade de arbutina (0,75 g /100 g extrato) (Fig. 23C). Estes resultados sugerem que, tal como as plantas crescidas no seu ambiente natural, também as plantas cultivadas *in vitro* detêm a capacidade de produzir arbutina, durante o seu metabolismo natural. Verificou-se, porém, que essa quantidade de arbutina foi cerca de 8 vezes inferior à obtida neste trabalho, para as folhas maduras do medronheiro, no seu ambiente natural (6,36 g/100 g extrato). Resultados similares foram obtidos em *Arbutus andrachne*, tendo sido verificados níveis de arbutina de 3 - 8 g/ 100 g amostra seca em folhas crescidas *in*

vivo e 0,9 g /100 g amostra seca em folhas provenientes de plantas cultivadas *in vitro* (Mostafa *et al.*, 2010).

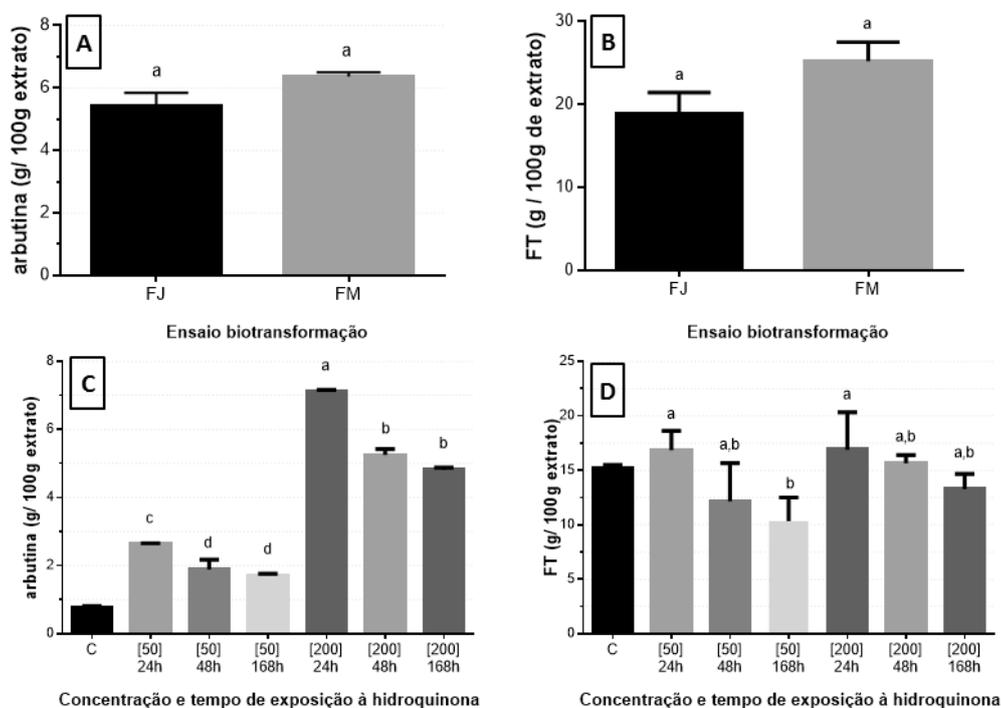


Figura 23 - Dados representativos da quantidade de arbutina presente nas amostras *in vivo* (folhas jovens e maduras) (A) e *in vitro*, no ensaio de biotransformação (C), e dos respectivos teores em fenóis totais – FT (B) e (D). O ensaio de biotransformação consistiu em avaliar a capacidade de biotransformação de hidroquinona em arbutina por parte de culturas *in vitro* de medronheiro. Neste ensaio foi testado o efeito de duas concentrações de hidroquinona (50 mg/L e 200 mg/L) e três tempos de exposição (24, 48 e 168h) na produção de arbutina. Os valores encontram-se expressos em g de arbutina ou de fenóis totais /100 g extrato e correspondem à média das réplicas de cada tratamento e respetivo desvio padrão. Letras diferentes, representam diferenças significativas segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A inclusão de hidroquinona nos meios de cultura líquidos permitiu verificar a capacidade de biotransformação de hidroquinona em arbutina, por parte das plantas. A arbutina foi encontrada em todos os extratos metanólicos do ensaio, mas em quantidades significativamente superiores nas plantas expostas a uma concentração de 200 mg/L de hidroquinona. Quando expostas a uma mais baixa concentração de hidroquinona (50 mg/L) os níveis de arbutina nas plantas foram igualmente mais baixos, variando entre os 1,70 e 2,65 g por 100 g de extrato, enquanto sob a maior concentração de hidroquinona (200 mg/L), a quantidade de arbutina foi mais elevada, variando entre os 4,81 e 7,10 g por 100 g de extrato de acordo com o tempo de exposição (Fig. 23C). Uma relação semelhante foi também comprovada em trabalhos realizados noutras espécies, como *Aronia melanocarpa*, *Hypericum perforatum*, *Ruta graveolens*, (Kwiecien *et al.*, 2013;

Piekoszewska *et al.*, 2010). Destes resultados se interfere, que a adição de hidroquinona, intensificou a produção natural de arbutina nas culturas *in vitro* e que a exposição a uma concentração de 200 mg/L de hidroquinona durante 24 horas, proporcionou uma produção de arbutina (7,10 g/ 100 g extrato) superior à quantidade existente nas folhas maduras do material estudado (6,36 g /100 g extrato). Tais resultados demonstram o provável potencial deste processo de biotransformação na produção de arbutina em grande escala.

Constatou-se ainda que o tempo de exposição à hidroquinona teve uma influência significativa na quantidade de arbutina presente nas plantas, tendo sido verificada uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de arbutina e o tempo de exposição à hidroquinona. Isto é, plantas expostas à hidroquinona por um maior período de tempo apresentaram uma menor quantidade de arbutina, do que plantas expostas por um período menos prolongado. Este efeito foi verificado para as duas concentrações de hidroquinona e revela a existência de uma relação inversa entre a quantidade de arbutina sintetizada pelas amostras e o tempo de exposição à hidroquinona. Assim, as plantas expostas a uma concentração de 200 mg/L de hidroquinona apresentaram concentrações sucessivamente decrescentes de arbutina, quando expostas a períodos de tratamento de 24h, 48h e 168h, respetivamente. O mesmo aconteceu no material cultivado com uma concentração de 50 mg/L de hidroquinona (Fig. 23C). Este comportamento foi também verificado em trabalhos com outras espécies, entre as quais *Echinacea purpurea*, *Exacum affine*, *Melittis melissophyllum*, *Ruta graveolens* (Skrzypczak-Pietraszek *et al.*, 2005). Destes resultados pode-se inferir que, quando expostas por um período prolongado à hidroquinona as plantas desencadeiam um mecanismo de desintoxicação e libertam a arbutina produzida. Uma vez que neste trabalho não foi avaliada a quantidade de arbutina presente no meio de cultura, não se podem tirar mais conclusões quanto aos resultados obtidos, e ensaios suplementares teriam de ser realizados no sentido de se compreender essa relação.

Tal como sucedido para as folhas *in vivo*, também as plantas cultivadas *in vitro* neste ensaio de biotransformação apresentaram uma relação diretamente proporcional entre o teor de fenóis totais e a quantidade de arbutina (Figs. 23C e D). Com isto, é possível considerar que a quantidade de arbutina produzida nas plantas contribui para a variação do teor de fenóis totais exibidos pelos diferentes materiais estudados.

3.3 Ensaio enraizamento

Com vista a otimizar o protocolo de enraizamento de plântulas de medronheiro por choque auxínico com IBA foi realizado um ensaio no qual se avaliou o efeito do método de propagação das culturas (meio sólido e líquido) e dois tempos de exposição à auxina, no enraizamento das plântulas (Fig. 24).

Vinte dias após a indução do enraizamento por choque auxínico em IBA, foram registados os resultados obtidos em cada tratamento. Os parâmetros analisados foram a taxa de sobrevivência e de enraizamento dos explantes, o número de raízes formadas por explante e por fim, o comprimento da maior raiz formada por explante.



Figura 24 – Etapas da indução do enraizamento, por choque auxínico em IBA (9,8 mM), de plantas de medronheiro cultivadas *in vitro*. Multiplicação em meio líquido (A) e sólido (B) de plantas de medronheiro. (C) Plantas com 10 dias de aclimatização em areia e perlite (2:1 v/v) após choque auxínico. (D) Estado do desenvolvimento das raízes 20 dias após o choque auxínico. (E) Crescimento em terra, areia e turfa (2:2:1 v/v) das plantas enraizadas.

Os resultados demonstraram que a maioria das plantas respondeu de forma positiva ao choque auxínico e à adaptação ao novo meio. As plantas propagadas em meio agarizado foram as que melhor se adaptaram, tendo apresentado uma taxa de sobrevivência de 100 %. Apesar da aparente fragilidade das plantas provenientes do meio líquido, registou-se uma taxa de sobrevivência de 95 % para as plantas expostas a um choque auxínico de 10 segundos. No entanto, quando expostas por um período mais prolongado ao IBA (30 segundos) as plantas provenientes de meio líquido apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente inferior (66,67 %) (Tabela 6). Estes resultados indicam que o tempo de exposição ao IBA foi um fator importante no processo de enraizamento de plantas provenientes de meio líquido. Neste caso, contactou-se que o menor tempo de exposição ao IBA (10 segundos) foi mais favorável ao enraizamento.

Isto pode ter acontecido pelo facto da exposição ter sido prolongada para a concentração de IBA usada, o que pode ter determinado a morte de grande parte das plantas. No que diz respeito ao método de propagação das plântulas, este não foi um fator limitativo, uma vez que as plantas propagadas pelos dois métodos, apresentaram taxas de sobrevivência bastante próximas.

Tabela 6 – Parâmetros analisados no ensaio de enraizamento de plantas expostas a 2 tempos de exposição a 9,8 mM IBA (10 e 30 segundos) e provenientes de métodos de propagação diferentes: meio sólido MS e meio líquido ML. Percentagem de enraizamento, número de raízes formadas por explante e comprimento da maior raiz.

Proveniência do explante	Tempo de exposição a 9,8 mM IBA (segundos)	Sobrevivência (%)[*]
Plantas meio agarizado	10	100,0 ± 0,0 ^a
Plantas meio líquido	10	95,00 ± 5,77 ^a
	30	66,67 ± 5,77 ^b

* Os valores correspondem à média e respetivo desvio padrão das três réplicas. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas segundo o teste de Tukey.

No que diz respeito à percentagem de enraizamento, o teste da anova demonstrou que tanto a origem do explante como o tempo de exposição à auxina afetaram a formação de raízes. Verificou-se que para um período de exposição ao IBA de 10 segundos a taxa de enraizamento obtida para as plantas provenientes do meio agarizado (93,98 %) foi significativamente superior à obtida para as plantas provenientes do meio líquido (72,50%) (Tabela 7). Destes resultados se interfere que o processo de enraizamento foi mais efetivo nos rebentos provenientes de meio de cultura sólido. Uma possível explicação para este acontecimento prende-se com o facto das plantas provenientes do meio agarizado possuírem calos mais lenhoso e resistentes, permitindo uma maior facilidade de aclimatização. Além disso, a menor taxa de enraizamento das plantas propagadas em meio líquido pode estar correlacionada com a vitrificação observada nessas plantas. A vitrificação é uma anomalia fisiológica que se traduz na formação de plantas com folhas translúcidas, de aspeto muito hidratado, com uma reduzida biossíntese

de clorofila o que interfere por isso com a fotossíntese e trocas gasosas nas plantas (Canhoto, 2010). Segundo Hazarika (2006) plantas com esta anomalia apresentam uma maior dificuldade de aclimatização por possuírem menor teor de massa seca e serem menos lenhificadas. Frequências de enraizamento similares às verificadas neste trabalho para as plantas provenientes do meio sólido, também foram obtidas por (Gomes & Canhoto, 2009) após a indução do enraizamento em rebentos caulinares expostos a um choque auxínico de 15 segundos e seu posterior alongamento em meio de cultura com carvão ativado.

Tal como referido anteriormente, o tempo de exposição ao IBA teve também um papel determinante no enraizamento das plantas propagadas em meio de cultura líquido. A maior percentagem de indução de raízes (84,92%) foi alcançada após um choque auxínico com IBA durante 30 segundos e foi cerca de 10% superior à taxa obtida para um tempo de exposição de 10 segundos. Uma vez que as plantas provenientes do meio líquido e expostas ao IBA durante 30 segundos apresentaram uma baixa taxa de sobrevivência, os valores de enraizamento, são apenas referentes aos dados obtidos para as plantas sobreviventes. Os resultados obtidos revelam que apesar do maior tempo de exposição ao IBA ter efeitos negativos na sobrevivência dos explantes, este promove, uma maior taxa de enraizamento. De facto, o IBA é uma das principais auxina utilizadas na indução do enraizamento no entanto esta é também responsável pela inibição do desenvolvimento e crescimento das raízes (Gomes, 2011).

Os resultados demonstram que o número de raízes formadas por explante apenas foi afetado pelo método de propagação utilizado, não tendo sido verificadas diferenças significativas induzidas pelo tempo de exposição à auxina. Tal como verificado anteriormente para a taxa de enraizamento, também o maior número de raízes formadas por explante foi obtido nas plantas cultivadas em meio sólido. Estas plantas exibiram um número médio de raízes de 8,09 bastante superior ao obtido nas plantas propagadas em meio líquido de 5,43.

Como foi referido anteriormente, o número de raízes produzidas por explante nas plantas propagadas em meio líquido foi bastante semelhante para os dois tempos de exposição ao IBA, o que revela que apesar da elevada concentração do IBA, o maior tempo de exposição não foi um fator limitativo na formação de raízes.

Tabela 7 - Parâmetros analisados no ensaio de enraizamento de plantas expostas a 2 tempos de exposição a 9,8 mM IBA (10 e 30 segundos) e provenientes de métodos de propagação diferentes: meio sólido MS e meio líquido ML. Percentagem de enraizamento, número de raízes formadas por explante e comprimento da maior raiz.

Proveniência do explante	Tempo de exposição a 9,8 mM IBA (segundos)	Enraizamento (%)[*]	Nº raízes / explante[*]	Comprimento da maior raiz / explante (cm)[*]
Plantas meio agarizado	10	94,44 ± 4,81 ^a	8,09 ± 0,24 ^a	2,69 ± 0,25 ^a
Plantas meio líquido	10	73,89 ± 4,49 ^b	5,43 ± 0,23 ^b	1,63 ± 0,11 ^b
	30	84,92 ± 1,38 ^a	5,66 ± 0,44 ^b	1,39 ± 0,17 ^b

^{*} Os valores correspondem à média e respectivo desvio padrão das três réplicas. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas segundo o teste de Tukey.

O comprimento das raízes formadas por um choque auxínico de 10 segundos, foi significativamente diferente entre plantas propagadas em meio sólido (2,69 cm) e líquido (1,63 cm). No entanto, o tempo de exposição ao IBA não interferiu significativamente no comprimento das raízes das plantas provenientes do meio de cultura líquido, não sendo possível, por isso, tirar ilações quanto ao efeito do tempo no alongamento radicular.

Podemos portanto concluir que, as plantas provenientes do meio de cultura sólido foram as que apresentaram os melhores resultados no enraizamento, para todos os parâmetros analisados. Além disso, quando sujeitas a um choque auxínico de 10 segundos, as plantas provenientes de meio sólido são as que respondem melhor ao enraizamento. Por sua vez, o tempo de exposição ao IBA apenas interferiu significativamente na taxa de sobrevivência e de enraizamento dos explantes provenientes de meio líquido

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho permitiu a exploração de novas áreas de interesse associadas ao medronheiro, essencialmente relacionadas com o estudo da cultura de calo; dos seus compostos fenólicos, nomeadamente arbutina e hidroquinona e do seu processo de enraizamento e aclimação.

O desenvolvimento e a otimização de protocolos de indução de calo é particularmente importante no cultivo *in vitro*, uma vez que muitos investigadores consideram que a cultura de células ou tecidos vegetais pode ser utilizada como um caminho alternativo à produção de metabolitos secundários. Assim, o presente trabalho pretendeu ser um contributo para a melhor compreensão deste tipo de cultura, a partir da qual poderão ser desenvolvidos outros trabalhos.

No ensaio de indução de calo verificou-se que a combinação hormonal de 1 mg/L de 2,4-D e 1 mg/L de tidiazurão demonstrou ser a mais favorável ao desenvolvimento e crescimento das culturas. Nos outros meios de cultura, suplementados unicamente com 1 ou 2 mg de 2,4-D ou com a adição de 0,5 mg/L de cinetina, verificou-se uma desdiferenciação inicial muito boa dos explante foliares, porém, o seu desenvolvimento foi interrompido antes do final do ensaio devido à oxidação e necrose dos tecidos. A adição de tidiazurão ao meio de cultura revelou ser fundamental para permitir o crescimento e desenvolvimento dos calos. A otimização de novos protocolos de indução, será, no entanto, necessária, para permitir o estabelecimento de um leque mais alargado de protocolos de indução de calo e minimizar os problemas de oxidação e necrose dos calos.

No trabalho realizado foram efetuados, paralelamente, dois ensaios para avaliar a cinética de crescimento das culturas de calo, em meio sólido e líquido. No ensaio realizado em meio sólido, os tubos de ensaio demonstraram ser os recipientes mais indicados para o crescimento do calo, uma vez que induziram os maiores incrementos ao longo de todo o período de cultura. As trocas gasosas e a renovação da atmosfera circundante dos explantes demonstraram ser fatores essenciais para o crescimento das culturas, contribuindo para diminuir a acumulação de alguns compostos gasosos que possam afetar o seu crescimento.

Em meio de cultura líquido, a maior massa de inóculo inicial (300 mg), com o maior e menor volume de meio (10 e 5 mL) utilizado, foram responsáveis, respetivamente, pelos

maiores incrementos em massa. Os restantes tratamentos induziram incrementos bastante mais reduzidos, e não significativos entre eles. Destes resultados se infere que uma massa inicial de calo maior é mais favorável ao desenvolvimento das culturas, no entanto, não podem ser tiradas mais conclusões quanto ao efeito do volume de meio nas culturas iniciadas com massas de 100 e 200 mg pelas razões acima referidas.

Os resultados fitoquímicos demonstraram que as folhas colhidas no campo possuem um teor fenólico cerca de 10 vezes superiores aos encontrados nos frutos. No entanto, o estado de desenvolvimento das folhas e de maturação dos frutos não demonstraram ter uma influência significativa no teor de fenóis totais.

A análise por HPLC da constituição fitoquímica do medronheiro, nomeadamente da arbutina e hidroquinona, demonstrou a presença de arbutina nas amostras de folhas jovens e maduras colhidas no campo e nas plantas cultivadas *in vitro* sujeitas ou não a um tratamento com hidroquinona. Deste resultado, se pode interferir, que tal como referenciado por alguns trabalhos da literatura, o medronheiro apresenta a capacidade de produzir arbutina durante o seu metabolismo natural. Os ensaios de biotransformação da hidroquinona em arbutina demonstraram que a concentração de hidroquinona adicionada ao meio de cultura foi o fator que mais influenciou a produção de arbutina nas plantas, tendo-se registado uma correlação direta entre a concentração de arbutina biossintetizada e a concentração de hidroquinona adicionada. Além disso, constatou-se que a produção de arbutina pode ser maximizada variando o tempo de exposição das plantas à hidroquinona. De acordo com os resultados obtidos, um tempo de exposição mais baixo (24 h), proporcionou a presença da maior quantidade de arbutina nas plantas, pelo que se infere a existência de uma relação inversa entre estes dois parâmetros. Um maior tempo de exposição desencadeou provavelmente um mecanismo de desintoxicação na planta, levando à libertação da arbutina para o meio de cultura. Face a estes resultados não se pôde, no entanto, tirar conclusões quanto à eficiência da biotransformação, uma vez que não foi avaliada a quantidade de arbutina presente no meio de cultura. Deste modo, seriam necessários estudos adicionais caso se pretenda utilizar este processo num potencial sistema de produção de arbutina. A presença de hidroquinona não foi verificada em nenhuma amostra do material vegetal provavelmente devido a mecanismos de proteção da planta face à sua elevada toxicidade.

No que diz respeito aos frutos, os resultados sugerem que estes não apresentam arbutina na sua constituição em nenhuma fase do seu estado de maturação. Ou, caso este composto esteja presente deve encontrar-se em pequenas quantidades, não detetadas por HPLC-PDA, nas condições utilizadas.

O enraizamento por choque auxínico com IBA revelou ser um método bastante eficaz para o enraizamento de plantas micropropagadas em meio agarizado. Estas plantas foram as que responderam de forma mais favorável ao choque auxínico, apresentando os melhores resultados em todos os parâmetros avaliados. Pode-se portanto concluir que o método de propagação em meio agarizado é o mais indicado quando se pretende um posterior enraizamento destas plantas, por choque auxínico, e que ainda existem algumas limitações no enraizamento de rebentos formados em meio líquido. Relativamente ao tempo de exposição ao IBA, este apenas interferiu nas taxas de sobrevivência e enraizamento dos explantes. Apesar do maior tempo de exposição ter desencadeado uma menor taxa de sobrevivência das plantas, foi o que permitiu um maior enraizamento. A utilização de um tempo de exposição intermédio e a realização de mais estudos seriam importantes para contornar essas limitações.

5. BIBLIOGRAFIA

Acquaah, G. (2009). Principles of Plant Genetics and Breeding. 2th ed. (John Wiley & Sons).

Aguiar, C., and Pinto, B. (2007). Paleo-história e história antiga das florestas de Portugal continental: até à Idade Média. In *Árvores e florestas de Portugal: Floresta e Sociedade, uma história comum*, J.S. Silva, ed. (Público, Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa), pp. 15-53.

Alam, P., Alqasoumi, S.I., Shakeel, F., and Abdel-Kader, M.S. (2011). HPTLC densitometric analysis of arbutin in bulk drug and methanolic extracts of *Arctostaphylos uva-ursi*. *Natural Product Research* 25, 1671-1675.

Alarcão-E-Silva, M.L.C.M.M., Leitão, A.E.B., Azinheira, H.G., and Leitão, M.C.A. (2001). The Arbutus Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 27-35.

Alfermann, A.W., and Petersen, M. (1995). Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43, 199-205.

Almeida, R., Gonçalves, S., and Romano, A. (2005). *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. baeticum (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodivers Conserv* 14, 1059-1069.

Ara, K. (2006). Plant Biotechnology for the Production of Natural Products. In *Natural Products from Plants, Second Edition*, H.L. Brielmann, P.B. Kaufman, J.A. Duke, L.J. Cseke, S.L. Warber, and A. Kirakosyan, eds. (CRC Press), pp. 221-262.

Bird, I.M. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *British Medical Journal* 299, 783-787.

Blanco, E., Casado, M., Costa, M., Escribano, R., García-Anton, M., Génova, M., Gómez-Manzaneque, A., Gómez-Manzaneque, F., Moreno, J., Morla, C., *et al.* (2005). *Los bosques ibéricos. Una interpretación geobotánica*, 4th ed. (Barcelona).

Bond, W.J., and Midgley, J.J. (2001). Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 45-51.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161, 839-851.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.

Canhoto, J.M. (2010). *Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética* (Imprensa Universidade de Coimbra, Coimbra).

Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J., and Soriano, C. (1993). *Flora Iberica*, Vol 3 (Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid).

Celikel, G., Demirsoy, L., and Demirsoy, H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae* 118, 115-119.

Chawla, H.S. (2009). *Introduction to plant biotechnology*, 3rd edn (Science Publishers, Enfield, N.H. USA).

Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem Rev* 11, 153-177.

Correia, A.V., and Oliveira, Â.C. (1999). *Principais espécies florestais com interesse para Portugal : zonas de influência mediterrânica*, 2^a edn (Direcção Geral das Florestas, Lisboa).

De Fossard, R.A., Myint, A., and Lee, E.C.M. (1974). A Broad Spectrum Tissue Culture Experiment with Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Pith Tissue Callus. *Physiologia Plantarum* 31, 125-130.

Dixon, R.A. (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In *Plant Cell Culture A Practical Approach*, D. R.A, ed. (IRL Press, Oxford, Washington), pp. 1-20.

Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.

Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant cell* 7, 1085-1097.

El-Mahrouk, M.E., Dewir, Y.H., Omar, A.M.K., and Kalifa, A.M. (2010). *In Vitro* Propagation of Adult Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Through Adventitious Shoots and Somatic Embryogenesis. *Propagation of Ornamental Plants* 10, 93-98.

FAO, IFAD, and WFP (2015). The State of Food Insecurity in the World. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. (FAO, Rome), pp. 61.

Ferreira, A.G., Gonçalves, A.C., Pinheiro, A.C., Gomes, C.P., Ilhéu, M., Neves, N., Ribeiro, N., and Santos, P. (2001). Plano específico de ordenamento florestal para o Alentejo (Universidade de Évora).

George, E.F., Hall, M.A., and Klerk, G.-J.D. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Springer, London), pp. 501.

Gleason, F., and Chollet, R. (2011). *Plant Biochemistry* (Jones & Bartlett Learning).

Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A., and Rego, F. (2005). Carta da Tipologia Florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana* 13, 1-34.

Gomes, F. (2011). Strategies for the improvement of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree): *in vitro* propagation, mycorrhization and diversity analysis (Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra).

Gomes, F., and Canhoto, J.M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant* 45, 72-82.

Gomes, F., Simoes, M., Lopes, M.L., and Canhoto, J.M. (2010). Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnology* 27, 882-892.

González, G.A.L. (2007). Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares: (especies silvestres y las cultivadas más comunes), 3rd edn. (Mundi-Prensa Libros).

Gratani, L., and Ghia, E. (2002). Adaptive strategy at the leaf level of *Arbutus unedo* L. to cope with Mediterranean climate. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 197, 275-284.

Harborne, J.B. (1998). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 3rd edn (Chapman and Hall, London) pp 40–106.

Harborne, J.B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports* 18, 361-379.

Hazarika, B.N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108, 105-120.

Herrmann, K.M. (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* 7, 907-919.

Hileman, L.C., Vasey, M.C., and Parker, V.T. (2001). Phylogeny and Biogeography of the Arbutioideae (Ericaceae): Implications for the Madrean-Tethyan Hypothesis. *Systematic Botany* 26, 131-143.

Hu, Z.M., Zhou, Q., Lei, T.C., Ding, S.F., and Xu, S.Z. (2009). Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *Journal of Dermatological Science* 55, 179-184.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell* 25, 3159-3173.

Jones, P., and Vogt, T. (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213, 164-174.

Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33, 213-217.

Kirakosyan, A., Cseke, L.J., and Kaufman, P.B. (2009). The Use of Plant Cell Biotechnology for the Production of Phytochemicals In: *Recent Advances in Plant Biotechnology*, A. Kirakosyan, and P.B. Kaufman, eds. (Springer US), pp. 3 - 13.

Kittipongpatana, N., Chaiwan, A., Pusod, U., and Kittipongpatana, O.S. (2007). High-performance liquid chromatographic method for separation and quantitative analysis of arbutin in plant tissue cultures. *Journal of Natural Science*. 6, 65-74.

Konstantinidis, P., Tsiourlis, G., and Xofis, P. (2006). Effect of fire season, aspect and pre-fire plant size on the growth of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree) resprouts. *Forest Ecology and Management* 225, 359-367.

Kwiecien, I., Szopa, A., Madej, K., and Ekiert, H. (2013). Arbutin production via biotransformation of hydroquinone in *in vitro* cultures of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. *Acta Biochimica Polonica* 60, 865-870.

Lindsey, K., and Jones, M.G.K. (1992). *Plant Biotechnology in Agriculture* (Wiley Biotechnology Series: Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore).

Liu, C.-Q., Deng, L., Zhang, P., Zhang, S.-R., Xu, T., Wang, F., and Tan, T.-W. (2013). Efficient production of α -arbutin by whole-cell biocatalysis using immobilized hydroquinone as a glucosyl acceptor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 91, 1-7.

Loyola-Vargas, V.M., and Vázquez-Flota, F. (2006). An Introduction to Plant Cell Culture Back to the Future. In *Plant Cell Culture Protocols*, V.M. Loyola-Vargas, and F. Vázquez-Flota, eds. (Humana Press, Totowa, New Jersey), pp. 3 - 8.

Mackay, W.A. (1996). Micropropagation of Texas madrone, *Arbutus xalapensis* HBK. *HortScience* 31, 1028-1029.

Maeda, H., and Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* 63, 73-105.

Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., and Pereira, J.A. (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products* 37, 473-478.

Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., and Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 49, 2285-2291.

Mereti, M., Grigoriadou, K., Nanos, G.D., Mereti, M., Grigoriadou, K., and Nanos, G.D. (2002). Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia Horticulturae* 93, 143-148.

Molina, M., Pardo-De-Santayana, M., Aceituno, L., Morales, R., and Tardío, J. (2011). Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry*.

Mostafa, S., Karam, N., Shibli, R., and Alali, F. (2010). Micropropagation and production of arbutin in oriental strawberry tree (*Arbutus andrachne* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103, 111-121.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum* 15, 73-497.

Mustafa, N.R., de Winter, W., van Iren, F., and Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols* 6, 715-742.

Nycz, J.E., Malecki, G., Morag, M., Nowak, G., Ponikiewski, L., Kusz, J., Switlicka, A., Nycz, J.E., Malecki, G., Morag, M., *et al.* (2010). Arbutin: Isolation, X-ray structure and computational studies. *Journal of Molecular Structure* 980, 13-17.

Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., and Pereira, J.A. (2011). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International* 44, 1401-1407.

Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J.A., and Baptista, P. (2009). Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47, 1507-1511.

Özcan, M.M., and Haciseferoğulları, H. (2007). The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineering* 78, 1022-1028.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., and Codina, C. (2001). A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical analysis*. 12, 336-339.

Pascual, M.S., Ginovés, J.R.A., and Aguilar, M.d.A. (1993). *Arbutus* × *androsterilis*, a New Interspecific Hybrid between *A. canariensis* and *A. unedo* from the Canary Islands. *Taxon* 42, 789-792.

Pavlović, D.R., Branković, S., Kovacević, N., Kitic, D., and Veljković, S. (2011). Comparative study of spasmolytic properties, antioxidant activity and phenolic content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece. *Phytotherapy Research*. 25, 749-754.

Pavlović, R.D., Lakusić, B., Doslov-Kokorus, Z., and Kovacević, N. (2009). Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Pharmazie* 64, 656-659.

Pawlowska, A.M., De Leo, M., and Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 10234-10238.

Pedro, J.G. (1994). Carta da distribuição de figueira e medronheiro - Notícia explicativa (Lisboa: Direcção Geral do Ambiente, Ministério do Ambiente e Recursos Naturais).

Pereira Coutinho, A.X. (1913). A flora de Portugal (plantas vasculares) disposta em chaves dichotomicas (Aillaud, Alves, Paris).

Piekoszewska, A., Ekiert, H., and Zubek, S. (2010). Arbutin production in *Ruta graveolens* L. and *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. *Acta Physiologiae Plantarum* 32, 223-229.

Piotto, B., Bartolini, G., and F, B. (2001). Schede informative sulla propagaione per seme degli alberi e degli arbusti più diffusi della flora mediterranea. In: Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. B. Piotta, and A. Noi, eds. (Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali, Manuale ANPA: Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente), pp. 109-149.

Piotto, B.P., C., and Arcadu, P. (2001). La ripresa della vegetazione dopo gli incendi nella regione mediterranea. In Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea, B. Piotta, and A. Noi, eds. (Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali, Manuale ANPA: Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente), pp. 32–38.

Prada, M.A., and Arizpe, D. (2008). Riparian Tree and Shrub Propagation Handbook: An Aid to Riverine Restoration in the Mediterranean Region (Generalitat Valenciana), pp. 27-29.

Rao, S.R., and Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20, 101-153.

Rodrigues, L.M. (2008). Efeitos alelopáticos de juglona e de extractos de *J. regia* L. e de *J. nigra* L. em *Hakea salicifolia* (Vent.) B. L. Burt e *Acacia melanoxylon* R. Br. Tese de mestrado, Universidade de Coimbra).

Rodríguez-Sahagún, A., Gutierrez-Lomelí, M., and Castellanos-Hernández, O.A. (2012). Plant cell and tissue culture as a source of secondary metabolites. In: Biotechnological production of plant secondary metabolites O. Ilkay, ed. (Bentham Science Publishers, Sharjah, United Arab Emirates), pp. 3-20.

Ruiz-Rodríguez, B.-M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.-C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Molina, M., and Tardío, J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International* 44, 1244-1253.

Rychlinska, I., and Nowak, S. (2012). Quantitative Determination of Arbutin and Hydroquinone in Different Plant Materials by HPLC. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 40, 109-113.

Santo, D.E., Galego, L., Gonçalves, T., and Quintas, C. (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International* 47, 45-50.

Seigler, D.S. (1998). *Plant Secondary Metabolism*, 1st ed. (Springer US), pp 94-105.

Seo, D.H., Jung, J.H., Ha, S.J., Cho, H.K., Jung, D.H., Kim, T.J., Baek, N.I., Yoo, S.H., and Park, C.S. (2012). High-yield enzymatic bioconversion of hydroquinone to alpha-arbutin, a powerful skin lightening agent, by amylosucrase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, 1189-1197.

Shibli, R.A., and Smith, M.A.L. (1996). Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (ohelo) and *V. myrtillos* (bilberry) leaf explants. *HortScience* 31, 1225-1228.

Skoog, F., and Miller, C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11, 118-130.

Skrzypczak-Pietraszek, E., Szewczyk, A., Piekoszewska, A., and Ekiert, H. (2005). Biotransformation of hydroquinone to arbutin in plant *in vitro* cultures — preliminary results. *Acta Physiologiae Plantarum* 27, 79-87.

Smiris, P., Pipinis, E., Aslanidou, M., Mavrokordopoulou, O., Milios, E., and Kouridakis, A. (2006). Germination study on *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) and *Podocytisus caramanicus* Boiss. & Heldr. (Fabaceae). *Journal of Biological Research* 5, 85 - 91.

Soro, A., and Paxton, R.J. (1999). The strawberry tree: a significant source of nectar around the Mediterranean basin. *Bee World* 80, 140-144.

Stafford, A., and Warren, G. (1991). *Plant cell and tissue culture* (Open University Press).

Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website, Version 12, July 2012. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acedido em: 05.04.2015

Stevens, P.F. (1971). A classification of the Ericaceae: subfamilies and tribes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 64, 1-53.

Street, H.E. (1977). Plant tissue and cell culture, 2nd edn (Blackwell Scientific), pp 614.

Taiz, L., and Zeiger, E. (2015). Plant physiology, 5th edn (Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA).

Thongchai, W., Liawruangrath, B., and Liawruangrath, S. (2007). High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts. *Journal of Cosmetic Science* 58, 35-44.

Torres, J.A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C., and Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology* 160, 207-223.

Trivedi, M., Yadav, S.K., Yadav, G.K., Bhaskar, R., and Tiwari, R.K. (2010). Thidiazuron induced callus induction and *in-vitro* regeneration of *Asparagus (Asparagus racemosus* Wild). Indian Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA 1, 27-30.

Tuberoso, C.I., Bifulco, E., Caboni, P., Cottiglia, F., Cabras, P., and Floris, I. (2010). Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 384-389.

Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., and Webb, D.A. (1972). *Flora Europaea*, Vol 3 (Cambridge University Press, Cambridge).

Vasques, A., Vallejo, V.R., Santos, M.C., and Keizer, J.J. (2014). The role of cold storage and seed source in the germination of three Mediterranean shrub species with contrasting dormancy types. *Annals of Forest Science* 71, 863-872.

Vermerris, W., and Nicholson, R. (2006). The role of phenols in plant defense. In *Phenolic Compound Biochemistry* (Springer), pp. 211-234.

Vermerris, W., and Nicholson, R. (2007). *Phenolic Compound Biochemistry* (Springer Netherlands), pp 276.

Verpoorte, R., and Memelink, J. (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 181-187.

Wang, C.-K., Lee, W.-H., and Peng, C.-H. (1997). Contents of Phenolics and Alkaloids in *Areca catechu* Linn. during Maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1185-1188.